

UNIVERSIDAD DE MURCIA

FACULTAD DE QUÍMICA

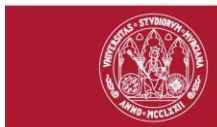
Estudios de Citotoxicidad, Localización Celular e
Interacción con Biomacromoléculas de
Metalofármacos Anticancerígenos

D. Sergio Alejo Pérez Henarejos

2017

Estudios de Citotoxicidad, Localización Celular e
Interacción con Biomacromoléculas de
Metalofármacos Anticancerígenos

Memoria presentada por
D. Sergio Alejo Pérez Henarejos
para optar al grado de Doctor por la
Universidad de Murcia



UNIVERSIDAD DE
MURCIA

Antonio Donaire González y José Ruiz López, Catedráticos de Universidad, ambos del Área de Química Inorgánica del Departamento de Química Inorgánica de la Universidad de Murcia, AUTORIZAMOS:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada "Estudios de Citotoxicidad, Localización Celular e Interacción con Biomacromoléculas de Metalofármacos Anticancerígenos", realizada por D. Sergio Alejo Pérez Henarejos, bajo nuestra inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 24 de abril de 2017

Fdo. Antonio Donaire González

Fdo. José Ruiz López

Agradecimientos

Es de reconocida obligación agradecer a todas esas personas que de un modo u otro han estado en el camino durante la realización de esta Tesis Doctoral, y así lo dice el refranero español, “es de bien nacido, ser agradecido”.

Es un gran placer expresar mi gratitud al Dr. Antonio Donaire González, por aceptar la dirección de esta Tesis. Su apoyo para introducirme en el mundo de los metalofármacos ha sido esencial para guiar mis ideas, y especialmente en mi formación como investigador.

Al Dr. José Ruiz López, por trabajar en la codirección de esta Tesis y que me ha proporcionado los medios económicos que han estado a su alcance para poder llevar a cabo este trabajo, además de grandes ratos de discusiones y correcciones que han hecho posible la publicación de grandes artículos.

Al Grupo de Metalofármacos del Departamento de Química Inorgánica de la Universidad de Murcia. A la Dra. Natalia Cutillas por introducirme en el mundo de las nanopartículas. Al Dr. Venancio Rodríguez, por su inestimable ayuda en muchos momentos durante la Tesis y en los trabajos con platino. A la Dra. Concepción de Haro, quien me dio mi primera clase en la Universidad, y la Dra. Consuelo Vicente, ambas con las que empecé a trabajar con compuestos de oro y que han dado para toda una Tesis. A la Dra. M^a Dolores Santana que aunque hayamos trabajado menos juntos siempre ha estado ahí con una sonrisa.

A todas las personas que conocí durante mi estancia en Dinamarca. Al Dr. Ian H. Lambert, Belinda H. Sorensen, Celina S. Dam, Dr. Stefan Stürup y Dorte Nielsen por hacer que mi estancia en Dinamarca fuera una experiencia muy positiva en mi formación como investigador.

En estas líneas no puede faltar mi gratitud al Servicio de Cultivo de Tejidos de la Universidad de Murcia, y en especial a la Dra. Antonia Bernabeu (Toñi) por su inestimable ayuda ante cualquier problema. Al Dr. José Muñoz por todas esas conversaciones de hombres que hemos tenido. A mi mamá de laboratorio, Juana por todas esas discusiones y enfados del día a día. A Vero, Pilar, Azucena y Laura por la paciencia que habéis tenido.

Al servicio de Microscopía y su personal, la Dra. María García (Maruja), Manoli, Paco y Joaquín por hacer de esa sección otra casa para mí y abrirme el mundo de la Microscopía.

A la Dra. M^a Dolores Alcaraz, de la sección de Radioprotección y residuos por permitir que esta Tesis fuera mas rápida.

Por supuesto no podía faltar la Directora del SAI (Servicio de Apoyo a la Investigación de la Universidad de Murcia), la Dra. M^a Teresa Castells por esas charlas docentes o no de mitad de pasillo.

A la, ahora ya, Dra. Ana Zamora, con la que empecé esta etapa y con la que he trabajado día a día para poder hacer de esta Tesis un gran trabajo, y con la que he compartido en este tiempo penas, alegrías, enfados y logros.

A todos los compañeros que han pasado por el laboratorio para hacer sus TFG o TFM. A Jose y Ana Luisa, los “nanopartner” que seguro que no se figuraban lo que podían dar de sí los gusanos de seda. A Fran, por permitirme que fuera el codirector de su TFG. A Gloria por todos los sustos que le he dado en el laboratorio.

A las chicas del arén de Biología Celular, Elena, Nuria y Victoria por esas raticos que te hacían seguir adelante.

Al Dr. José Neptuno Rodríguez, a Fernanda y a Luís del Departamento de Bioquímica por estar ahí siempre que he necesitado ayuda.

Al grupo de investigación de Hematología y Oncología Clínico Experimental, con los que hice el Máster y con quien nunca he perdido el contacto, especialmente con Nuria, Ginés y Ana.

A mis padres por apoyarme siempre en lo moral y económico cuando más difícil era.

A María José, porque necesitaría los agradecimientos de otra Tesis Doctoral para agradecer todo lo que has hecho y sacrificado para que esta Tesis sea una realidad.
GRACIAS.

Sergio Alejo Pérez Henarejos

“El hombre nunca sabe de lo que es capaz

hasta que lo intenta.”

Charles Dickens

ÍNDICE

Acrónimos

Capítulo 1. Introducción...	1
1.1. Generalidades...	3
1.1.1. ¿Qué es el cáncer?...	3
1.1.2. El cáncer en cifras...	4
1.2. Tipos de cáncer más relevantes	6
1.2.1. Cáncer de mama...	6
1.2.2. Cáncer de ovario...	9
1.2.3. Cáncer de pulmón...	10
1.2.4. Cáncer de colon...	12
1.3. Fisiología alterada por el cáncer	14
1.3.1. Ciclo celular...	14
1.3.1.1. Control del ciclo celular...	14
1.3.1.2. Ciclo celular y cáncer...	16
1.3.2. Apoptosis	17
1.3.2.1. Tipos de muerte celular: necrosis y apoptosis...	17
1.3.2.2. Características morfológicas...	19
1.3.3. Actividad caspasa...	20
1.3.3.1. Caspasas	20
1.3.3.2. Caspasas y cáncer...	21
1.3.3.3. El gen CASP3 y caspasa-3	21
1.3.4. Muerte celular independiente de caspasas...	22
1.3.5. Angiogénesis...	23
1.3.5.1. Definición...	23
1.3.5.2. Fisiología...	24
1.3.5.3. Angiogénesis tumoral...	26
1.4. Metalofármacos...	28
1.4.1. Química inorgánica médica...	28
1.4.2. Platino...	30
1.4.2.1. Platino(II)	30
1.4.2.2. Platino(IV)	32
1.4.3. Rutenio...	34
1.4.4. Iridio...	37
1.4.5. Oro...	38
1.4.6. Otros iones metálicos.....	40
1.4.6.1. Complejos de Ti(IV)	40
1.4.6.2. Complejos de Sn(IV)...	41
1.4.6.3. Complejos de Ga(III)...	42
1.4.7. Nanopartículas de seda...	43
1.5. Bibliografía...	45

Capítulo 2. Materiales y Métodos	57
2.1. Compuestos... ..	59
2.2. Líneas celulares... ..	59
2.2.1. Líneas celulares no neoplásicas... ..	60
2.2.1.1. De riñón de cerdo, LLC-PK1... ..	60
2.2.1.2. De riñón de mono, BGM... ..	60
2.2.1.3. Endoteliales humanas EA.hy926... ..	60
2.2.2. Líneas celulares neoplásicas... ..	61
2.2.2.1. Tumor de mama... ..	61
2.2.2.2. Tumor de ovario... ..	62
2.2.2.3. Tumor de vejiga urinaria... ..	63
2.2.2.4. Tumor de pulmón... ..	63
2.2.2.5. Tumor de cérvix... ..	64
2.2.2.6. Tumor de colon	64
2.3. Subcultivos... ..	65
2.4. Ensayo de citotoxicidad... ..	66
2.4.1. Procedimiento... ..	66
2.4.2. Tratamiento de datos... ..	68
2.4.3. Factores de resistencia y selectividad... ..	69
2.5. Detención del ciclo celular... ..	69
2.6. Evaluación del efecto apoptótico... ..	71
2.7. Localización celular... ..	72
2.7.1. Microscopía confocal de fluorescencia... ..	72
2.7.2. Microscopía electrónica de transmisión... ..	73
2.8. Angiogénesis... ..	74
2.8.1. Ensayo angiogénico <i>in vitro</i>	74
2.8.2. Ensayo de migración: <i>Wound healing assay</i>	76
2.9. Estudios de acumulación celular... ..	77
2.10. Caspasa-3... ..	78
2.11. Determinación de especies reactivas de oxígeno... ..	79
2.12. Fraccionamiento subcelular... ..	80
2.13. Western blot... ..	82
2.14. Determinación de proteínas... ..	84
2.14.1. Ensayo de Lowry... ..	84
2.14.2. Reacción de Bimet... ..	85
2.15. Ensayos de transporte con taurina... ..	85
2.16. Extracción y cuantificación de ADN... ..	87
2.17. Bibliografía... ..	88
Capítulo 3. Objetivos	89
Capítulo 4. Actividad Biológica y Mecanismo de Acción de Compuestos de Oro(I)	93
4.1. Introducción... ..	95

4.2. Resultados y discusión...	97
4.2.1. Estudios citotóxicos...	97
4.2.2. Selectividad celular...	98
4.2.3. Estudios de apoptosis y activación de caspasa-3...	99
4.2.4. Detención del ciclo celular...	101
4.2.5. Localización celular mediante microscopía confocal...	101
4.2.6. Microscopía electrónica de transmisión...	103
4.2.7. Estudios de internalización celular y acumulación...	104
4.2.8. Actividad mitocondrial...	106
4.2.9. Inhibición de la topoisomerasa I ...	108
4.2.10. Inhibición de la formación de tubos vasculares...	109
4.2.11. Inhibición de la mimetización vascular en células MDA-MB-231...	110
4.3. Conclusiones...	112
4.4. Bibliografía...	112
Capítulo 5. Actividad Biológica de Compuestos de rutenio(II) e iridio(III) basados en benzimidazol...	117
Sección 5A. Actividad Biológica y Mecanismo de Acción de un C^N ciclorutenado...	119
5A.1. Introducción...	121
5A.2. Resultados y discusión...	122
5A.2.1. Estabilidad de GY34...	122
5A.2.2. Distribución intracelular...	125
5A.2.3. Unión de GY34 con biomoléculas citosólicas...	130
5A.2.4. Efecto de GY34 sobre el flujo de osmolitos orgánicos...	131
5A.3. Conclusiones...	133
5A.4. Bibliografía...	133
Sección 5B. Estudio SAR de 2-fenil-benzimidazol C^N ciclometalados semi-sándwich de rutenio(II) e iridio(III)...	137
5B.1. Introducción...	139
5B.2. Resultados y discusión...	141
5B.2.1. Estudios de citotoxicidad...	141
5B.2.2. Resistencia adquirida...	143
5B.2.3. Estudios de acumulación celular...	144
5B.2.4. Metal unido a ADN celular...	144
5B.2.5. Estudios de apoptosis...	145
5B.2.6. Activación de caspasa-3...	146
5B.2.7. Detención del ciclo celular...	146
5B.2.8. Determinación de especies reactivas de oxígeno ...	147
5B.2.9. Inhibición de la formación de tubos vasculares...	148
5B.3. Conclusiones...	150
5B.4. Bibliografía...	150
Sección 5C. Actividad teranóstica de derivados heterolépticos de iridio(III)...	153
5C.1. Introducción...	155

5C.2. Resultados y discusión...	155
5C.2.1. Citotoxicidad...	155
5C.2.2. Microscopía confocal...	157
5C.2.3. Detención del ciclo celular...	158
5C.2.4. Apoptosis y caspasa-3...	159
5C.2.5. Acumulación celular...	159
5C.3. Conclusiones...	161
5C.4. Bibliografía...	161
Capítulo 6. Actividad Biológica de Organoderivados de Platino(II)...	163
Sección 6.A. Actividad antiangiogénica y antitumoral de compuestos C^N cicloplatinados...	165
6A.1. Introducción...	167
6A.2. Resultados y discusión...	169
6A.2.1. Ensayos de citotoxicidad...	169
6A.2.2. Resistencia adquirida...	171
6A.2.3. Selectividad de los complejos con DMSO...	172
6A.2.4. Distribución de platino intracelular...	173
6A.2.5. Estudio de acumulación...	174
6A.2.6. Detención del ciclo celular...	175
6A.2.7. Estudios de apoptosis...	176
6A.2.8. Inhibición de angiogénesis...	178
6A.2.9. Migración de células EA.hy926...	180
6A.3. Conclusiones...	181
6A.4. Bibliografía...	182
Sección 6.B. Influencia de la aromaticidad en el efecto anticancerígeno y antiangiogénico de compuestos de organoplatino(II)...	185
6B.1. Introducción...	187
6B.2. Resultados y discusión...	189
6B.2.1. Actividad citotóxica...	189
6B.2.2. Estudios de apoptosis...	191
6B.2.3. Hidrofobicidad y acumulación celular...	192
6B.2.4. Localización y distribución celular...	194
6B.2.5. Actividad antivascular <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> ...	195
6B.2.6. Estudio de microtúbulos...	197
6B.3. Conclusiones...	199
6B.4. Bibliografía...	199
Sección 6.C. Actividad teranóstica de derivados polipiridínicos de platino(II)...	203
6C.1. Introducción...	205
6C.2. Resultados y discusión...	206
6C.2.1. Estudio de citotoxicidad...	206
6C.2.2. Localización celular...	208
6C.3. Conclusiones...	209
6C.4. Bibliografía...	210

Capítulo 7. Actividad Biológica de Nanopartículas de Fibroina de seda portadoras de un profármaco de platino(IV)...	213
7.1. Introducción...	215
7.2. Resultados y discusión...	216
7.2.1. Preparación y caracterización de PtBZ-SFNs...	216
7.2.2. Internalización celular...	220
7.2.3. Actividad antitumoral...	221
7.2.4. Localización celular...	221
7.2.5. Determinación del ciclo celular...	222
7.3. Conclusiones...	226
7.4. Bibliografía...	227
Capítulo 8. Conclusiones...	229

ACRÓNIMOS

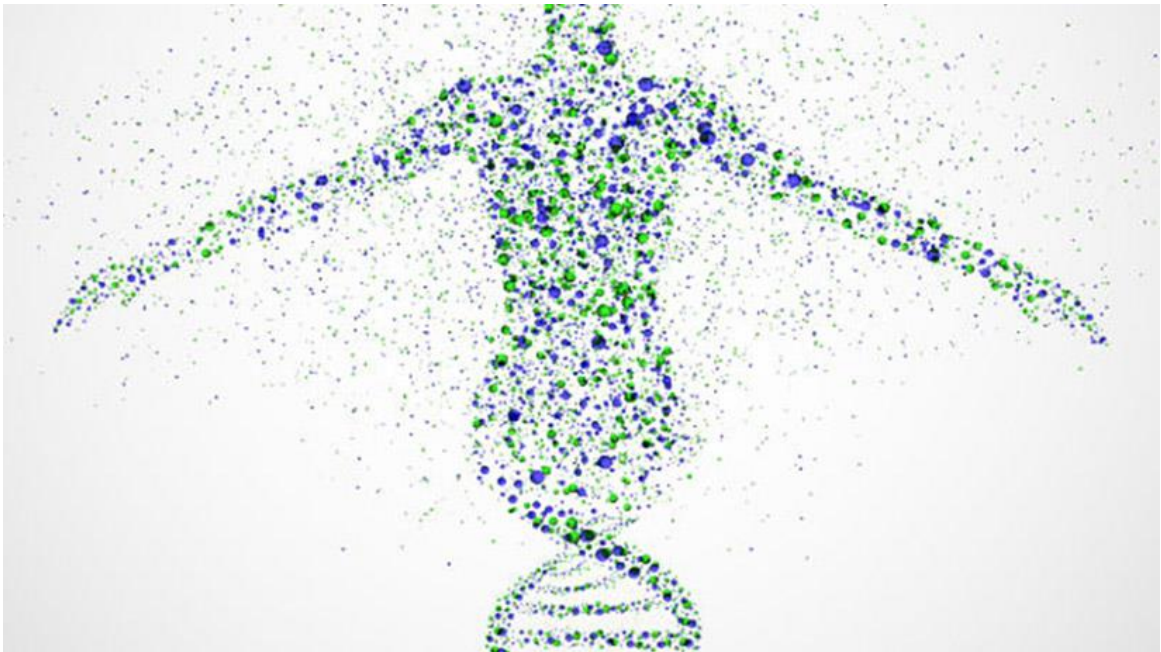
9-EtG	9-etilguanina
AAS	Espectroscopía de absorción atómica
ADN	Ácido dexosirribonucleico
Ala	Alanina
AO	Naranja de acridina
ARN	Ácido ribonucleico
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	Adenosín trifosfato
BCIP	Fosfato dipotásico de 5-bromo-4-cloro-3-indolilo
Bq	Becquerel
BSA	Albúmina de suero bovino
CA-4	Combretastina-4
CDDP	Cisplatino
Cdk	Ciclinas dependientes de quinasas
CK	Citoquina
cpm	Cuentas por minuto
DAPI	4',6-diamino-2-fenilindol
DCFH-DA	Diacetato de dicloro-dihidro-fluoresceína
ddH ₂ O	Agua bidestilada
DDT	Dicloro difenil tricloroetano
DED	Dominios efectores de muerte
DEVD-pNA	Péptido acetil-Asp-Glu-Val-Asp-P-nitroanilida
DMEM	Medio modificado Dubelcco 's
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
DTT	Ditiotreitol
EATC	Células tumorales ascíticas
ECACC	Colección europea de cultivos celulares autenticados
ECs	Células endoteliales
EDTA	Ácido etilendiamintetracético
EFTA	Ensayo de formación de estructuras tubulares endoteliales
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico
EHS	<i>Engelbreth-Holm-Swarm</i>
ESI-MS	Ionización por electrospray para espectroscopía de masas
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorter</i>
FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos
FID	Indicador de desplazamiento fluorescente
FITC	Isocianato de fluoresceína
Gln	Glutamina
Gly	Glicina

GRB7	Proteína-7 ligada al factor de crecimiento
GSH	Glutación
HER2	Receptor de crecimiento epidérmico humano-2
HIST	Histona
HNPPC	Cáncer colorrectal hereditario no polipósico
HUVEC	Células endoteliales de vena umbilical humana
IC ₅₀	Concentración inhibitoria del 50 %
ICP-MS	Espectrometría de masas de plasma acoplado inductivamente
IP	Ioduro de propidio
IR	Espectroscopía de infrarrojos
KDa	Kilodalton
LDH	Lactato deshidrogenasa
LPS	Lipopolisacárido
MCR	Resistencia multicelular
MDH2	Malato deshidrogenasa-2
TEM	Microscopio electrónico de transmisión
MMP	Metalopeptidasa de membrana
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio
NADP ⁺	Nicotinamida adenina dinucleótido fostato (oxidada)
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fostato (reducida)
NBT	Azul de nitrotetrazolio
NFS	Nanopartículas de fibroína de seda
NPs	Nanopartículas
NS-CLC	Cáncer de pulmón de células no pequeñas
P/S	Penicilina/estreptomicina
PAF	Poliposis adenomatosa familiar
PARP-1	ADP ribosa polimerasa 1
PBS	Tampón fosfato salino
Ph	Fenilo
pNa	p-nitroanilida
PS	Fosfatidilserina
RE	Receptor de estrógenos
RF	Factor de resistencia
Rho123	Rodamina 123
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RP	Receptor de progesterona
RP-HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
RPMI	Medio <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SAI	Servicio de Apoyo a la Investigación
SAR	Relación estructura-actividad
SBF	Suero bovino fetal
SCCHN	Carcinoma de células escamosas de cuello y cabeza

SCLC	Cáncer de pulmón de células pequeñas
SDS	Docecilsulfato sódico
SEC	Cromatografía de exclusión por tamaños
SEM	Microscopio electrónico de barrido
Ser	Serina
SF	Factor de selectividad
SFN	Nanopartículas de fibroína de seda
SNC	Sistema nervioso central
STIC	Carcinoma intraepitelial seroso tubárico
TauT	Transportador de taurina
TBST	Tampón salino Tris con polisorbato 20
TIC	Cromatograma iónico total
TNM	Tumor, nodo, metástasis
TrxR	Tiorredoxina reductasa
TSP-1	Tromboespondina 1
UV	Ultravioleta
VEGF	Factor de crecimiento vascular endotelial
VEGFR	Receptor de factor de crecimiento vascular endotelial
VEGFR3	Receptor del factor de crecimiento vascular endotelial 3
VM	Mimetismo vascular
XRD	Difracción de rayos X

Capítulo 1

Introducción



1.1 Generalidades

1.1.1. ¿Qué es el cáncer?

El cáncer es una enfermedad en la cual células, originariamente sanas, se transforman en células que proliferan de manera anormal e incontrolada.¹ Con el avance de la enfermedad estas células cancerígenas invaden progresivamente órganos próximos o incluso otros más distantes vía linfática o hematológica. Las células tumorales son células que han perdido el control en los procesos de crecimiento y división. Al llevarse a cabo de forma anárquica, su proliferación es desorganizada, lo que da lugar a una masa tumoral que invade los tejidos circundantes rompiendo las membranas límites de las distintas estructuras.^{2,3} Las células cancerígenas se duplican más rápidamente que las sanas, de forma que colonizan dichos órganos impidiendo su normal funcionamiento, lo que provoca, cuando la enfermedad se encuentra extendida, fallo multiorgánico y la muerte del paciente.

El término "cáncer" engloba más de 150 tipos de enfermedades atendiendo a su origen. Así pues, hablamos de carcinomas cuando se producen en epitelios y/o mucosas, sarcomas en tejido conjuntivo, leucemias provenientes de medula ósea, linfomas y mielomas derivados del sistema inmunitario, osteomas en hueso y otros derivados del sistema nervioso central, por ejemplo, astrocitomas.

Hoy en día se sabe que los tumores poseen una gran variabilidad, constituyendo el resultado de la transformación geno- y fenotípica de la célula normal, y que se caracteriza, fundamentalmente, por la pérdida del control del crecimiento célula. No obstante, todos los tumores poseen unas propiedades comunes. En el año 2000, *Hanahan* y *Weinberg* simplificaron estas características afines a todos ellos en seis, a saber:⁴

- Capacidad y microambiente de las células que forman el tumor para producir señales de proliferación continuamente.
- Capacidad de evitar la apoptosis.
- Aumento de señales anticrecimiento.
- Inducción de angiogénesis.
- Invasión de tejidos y metástasis.
- Potencial ilimitado de crecimiento.

Posteriormente, basándose en nuevos datos del metabolismo celular cancerígeno,^{5,6} las ampliaron a diez:⁷

- Desregulación energética celular.
- Mutación e inestabilidad del genoma.
- Evasión de destrucción por el sistema inmune.
- Inflamación promovida por el tumor.

Todas estas características indicadas permiten comprender la diversidad de las neoplasias.

La diseminación de algunas células migradas del tumor conduce a la colonización de nuevos órganos, determinando la aparición de metástasis a distancia. Las células tumorales presentan alteraciones en sus membranas (proteínas transmembrana, receptores, etc.), núcleos (oncogenes),⁸ y ciclos celulares (división rápida,⁹ ver más adelante). A su vez, se dividen a gran velocidad, constituyendo rápidamente la masa tumoral y, así mismo, sintetizan una serie de compuestos que se distinguen de las aportadas por la célula normal, bien en su estructura, bien en su concentración en las matrices extracelulares.

1.1.2. El cáncer en cifras

El cáncer es una de las principales causas de muerte en todo el mundo. Según la Organización Mundial de la Salud, en 2012 causó 8,2 millones de defunciones¹⁰ y se prevé que, en los próximos 20 años, estas cifras se estiman que llegarán a 22 millones. En la Figura 1.1 se muestran algunas estadísticas relevantes respecto a los diferentes tipos de cánceres diagnosticados.¹¹

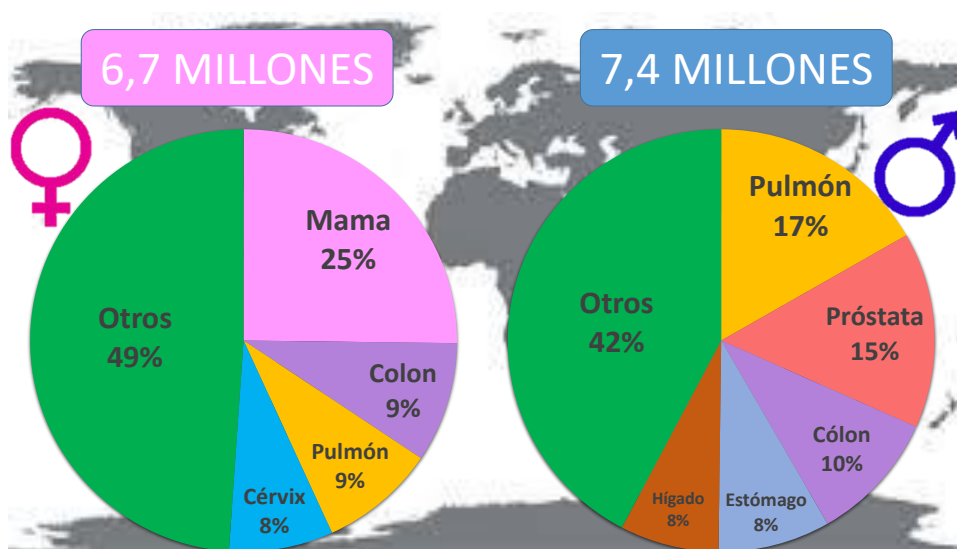


Figura 1.1. Tipos de cánceres más comunes. Adaptado de referencia 11.

La inmensa mayoría (90-95 %) de los cánceres tienen su origen en agentes externos, tales como el medio ambiente o el estilo de vida. Sólo el 5-10 % restante se pueden atribuir a causas de tipo genético.¹² De todas las muertes provocadas por el cáncer (Figura 1.2), aproximadamente un tercio están relacionadas con la dieta, un porcentaje ligeramente inferior se deben al tabaco, alrededor del 15-20 % son consecuencia de infecciones y, el resto, resultan de otros factores, como la radiación, el estrés, la actividad física y los contaminantes ambientales, entre otros.

En España, según los datos del Instituto Nacional de Estadística¹³ correspondientes al año 2013, las enfermedades del sistema circulatorio se mantuvieron como la primera causa de muerte (tasa de 252,1 fallecidos por cada 100.000 habitantes), seguida de los tumores (238,3) y de las enfermedades del sistema respiratorio (91,4). Las enfermedades del sistema nervioso, que incluyen el Alzheimer, fueron la cuarta causa de muerte (46,1). Cada tres años la incidencia de cáncer se incrementa aproximadamente en un 5 % en la población española.¹⁴ Este incremento se explicaría fundamentalmente en base al envejecimiento de nuestra población.

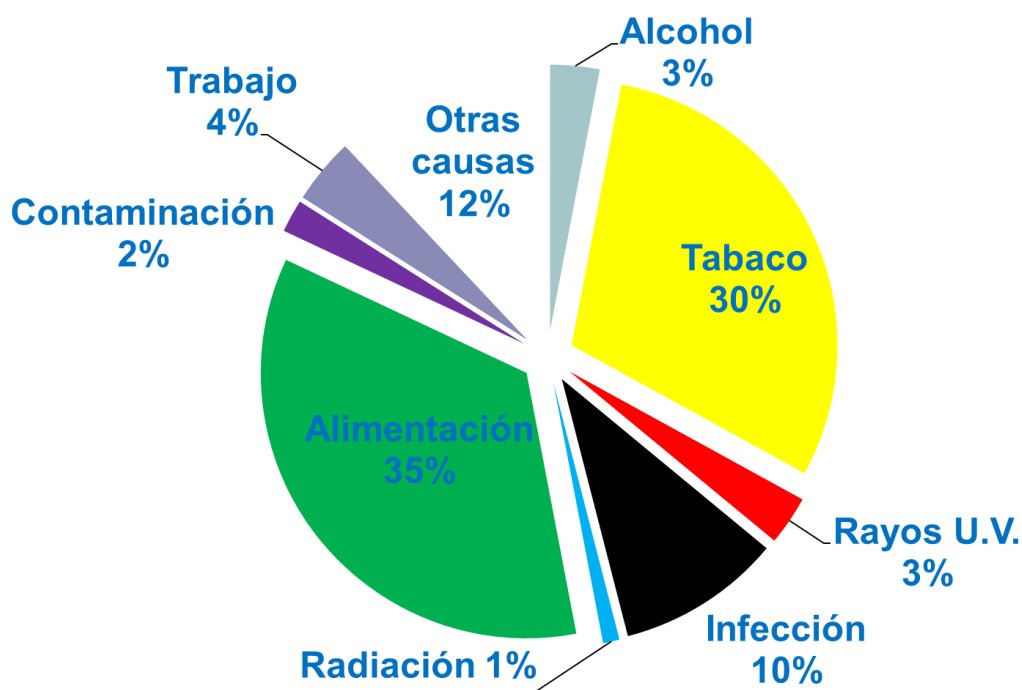


Figura 1.2. Factores externos desencadenantes de enfermedades cancerígenas.

Según los mismos datos para nuestro país,¹³ los tumores fueron la primera causa de muerte en hombres y la segunda, por detrás de enfermedades del aparato circulatorio en mujeres, siendo responsables de 28,4 de cada 100 defunciones en 2013. Entre los tumores, los responsables de una mayor mortalidad fueron el cáncer de bronquios y pulmón y el cáncer de colon (con aumentos del 0,8 % y 0,7 %, respectivamente). Por sexo, ambos tipos de cáncer causaron más defunciones entre los hombres. Por su lado, entre las mujeres, el cáncer con mayor mortalidad fue el de mama (aumento del 3,1 %) seguido del cáncer de bronquios y pulmón (7,3 %).

1.2. Tipos de cánceres más relevantes

Como hemos indicado, existen más de 150 tipos de cánceres diferentes. En la Figura 1.1 se indican los más importantes de acuerdo con su frecuencia y por sexo. Comentaremos aquí los que consideramos más relevantes, tanto desde el punto de vista de su incidencia y mortalidad, como de su relación con la presente Tesis.

1.2.1. Cáncer de mama

El cáncer de mama es el tumor maligno más frecuente entre las mujeres de todo el mundo.¹⁵ El mayor acceso a la sanidad y los controles preventivos hace que la detección sea cada vez más precoz, aumentando la incidencia con respecto a los países menos desarrollados. En España se diagnostican 26.000 nuevos casos al año, lo que representa casi el 30 % de todos los tumores del sexo femenino.¹⁶

Tanto el número de casos como las tasas de incidencia aumentan lentamente en España y en el mundo, probablemente debido al envejecimiento de la población y a un diagnóstico cada vez más precoz. En la Figura 1.3 se describen los factores asociados al cáncer de mama.¹⁷

La mayoría de las neoplasias malignas de mama se deben a elementos epiteliales y se clasifican como carcinomas. Los carcinomas de mama son un grupo diverso de lesiones que difieren en apariencia microscópica y comportamiento biológico.

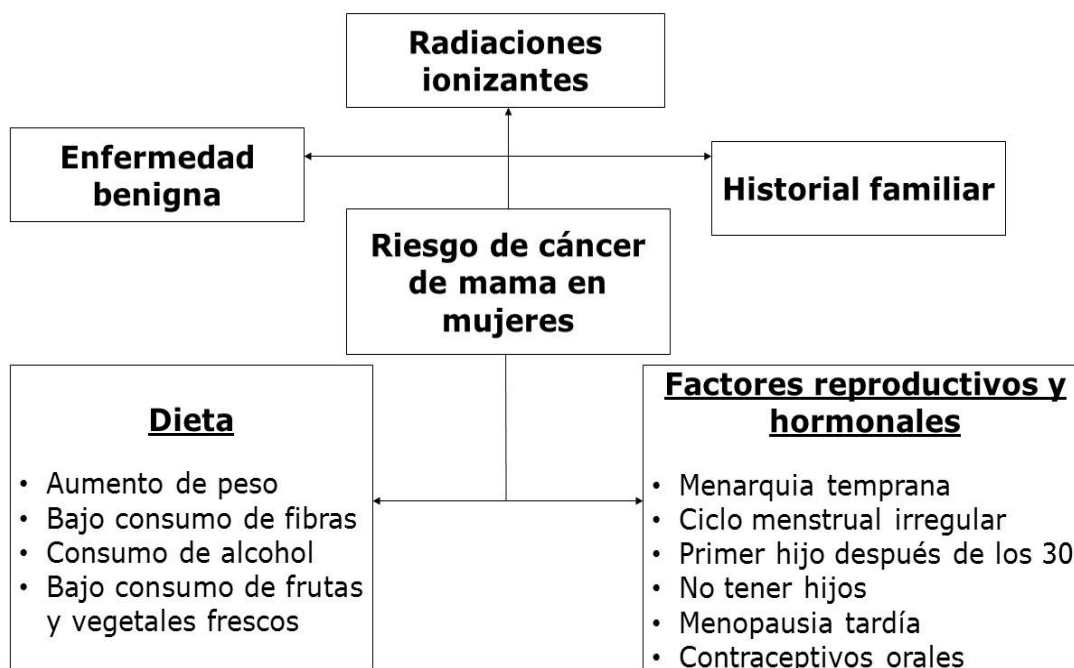


Figura 1.3. Factores asociados al cáncer de mama. Adaptado de referencia 17.

Tanto los carcinomas *in situ* (localizados) de la mama como los carcinomas infiltrantes pertenecen con más frecuencia al tipo histológico ductal; del resto de tipos histológicos, el más frecuente es el lobulillar.¹⁸ A pesar de esta cierta homogeneidad histológica, el cáncer de mama es extremadamente heterogéneo en su comportamiento biológico y clínico. De hecho, las variables pronósticas clásicas, tanto clínicas (edad, status menstrual) como anatomo-patológicas (grado, estadio, inmunohistoquímica), no son suficientes para estratificar a las pacientes desde el punto de vista del pronóstico y de la decisión terapéutica.

Las nuevas técnicas de biología molecular han contribuido a la clasificación del cáncer de mama. El trabajo más relevante en este sentido es el publicado por Perou,¹⁸ que condujo a una nueva clasificación molecular del cáncer de mama (Tabla 1.1). En función de la respuesta a los receptores de estrógeno, Perou clasificó los tumores de mama en dos grandes grupos, a saber: tumores con receptores de estrógeno (receptores de estrógeno positivo); y, tumores sin receptores de estrógeno (receptores de estrógeno negativo).

a) Tumores receptores de estrógeno positivo.

Este grupo de tumores está formado por los tumores luminales, los cuales poseen un patrón inmunofenotípico similar al componente epitelial luminal de la glándula mamaria. Expresan citoqueratinas luminales, receptores de estrógeno (RE) y los genes asociados a su activación (LIV1 y CCND1). Habitualmente son de bajo grado histológico y tienen mutación de p53 en menos del 20 % de los casos. Para estos casos de tumores de mama, en la presente Tesis se usó como representante la línea celular MCF-7. Los tumores luminales mejor caracterizados son:

- Luminal A. Es el más frecuente, correspondiendo al 67 % de los tumores. Posee alta expresión de genes relacionados con los receptores hormonales (RE+) y baja expresión de genes relacionados con la proliferación celular.
- Luminal B. El subtipo Luminal B presenta niveles menores de receptores de estrógeno y altos niveles de genes de proliferación comparados con el subtipo A.

b) Tumores receptores de estrógeno negativo.

Existen dos grandes grupos de tumores de este tipo:

- Subtipo basal (o triple negativo): se describió originalmente por su patrón de expresión inmunohistoquímico, al comprobarse que expresan citoqueratinas de alto peso molecular en sus células mioepiteliales. A este subtipo corresponde entre el 2 y el 18 % del total de los cánceres de mama. Fue reconocido como triple negativo por ser RE negativo, RP (receptor de progesterona) negativo y HER2/neu negativo (Tabla 1.1). Es un subgrupo que expresa genes asociados a células mioepiteliales cuyo inmunofenotipo corresponde a CK5, CK17, c-kit (una tirosina quinasa del epitelio

mamario),^{19,20} factores de crecimiento de hepatocito e insulina, calponina, caveolina y laminina. Los datos clínicos actuales muestran que es el subtipo más agresivo. La supervivencia de las mujeres que lo padecen y su período “libre de enfermedad” es baja, debido a que las terapias endocrinas y con trastuzumab (uno de los fármacos más comunes empleados contra el cáncer de mama) son ineficaces en este grupo de tumores. En estos tumores hay además alteraciones de genes reparadores del ADN. El promotor de BRCA1 (gen supresor de tumores) está metilado, lo cual ocasiona un silenciamiento de la expresión génica, también inactivación transcripcional de BRCA1 o ambos. Aquí, como caso representativo de este subgrupo se usó la línea celular MDA-MB-231.

- Subtipo de sobreexpresión de HER2/neu: Corresponde entre el 10 y el 15 % de los cánceres de mama y sobreexpresa genes ubicados en el cromosoma 17q, tales como el gen del EGFR-2 (*ERBB2*) y el *growth factor receptor bound protein 7* (GRB7). Además, sobreexpresan genes de proliferación y presentan escasos genes asociados al fenotipo luminal. El *ERBB2* es un protooncogén que, cuando se encuentra amplificado,¹⁹ se asocia con caracteres histopatológicos relacionados con baja expresión de RE y RP. Este subtipo corresponde a la mitad de los cánceres de mama que sobreexpresan HER2/neu. El subtipo HER2/neu presenta mala respuesta a terapia; de hecho, es particularmente resistente a la terapia hormonal, debido a la ausencia de receptores hormonales. Para representar este subgrupo en esta Tesis se empleó la línea celular SK-BR-3.

Tabla 1.1. Tipos de cáncer de mama.

Subtipo	Inmuno-fenotipo	Comportamiento
Luminal A	RE(+) y/o RP(+); HER2/neu(-)	<ul style="list-style-type: none"> • Más común y menos agresivo • Respuesta hormonal • Asociado al incremento de edad
Luminal B	RE(+) y/o RP(+); HER2/neu(+)	<ul style="list-style-type: none"> • Similar Luminal A • Peor resultado • Más frecuente RE(+) RP(-)
Basal	RE(-)/RP(-); HER2/neu(-); CK5/6(+) y/o EGFR(+)	<ul style="list-style-type: none"> • Agresivo • Alto índice mitótico • Riesgo (<40 años) • Premenopáusicas afroamericanas
HER2/neu(+); RE(-)	RE(-) y/o RP(-); HER2/neu(+)	<ul style="list-style-type: none"> • Menos común • Muy agresivo • Riesgo (<40 años)

Cada uno de estos subtipos tiene unas características clínico-patológicas específicas,²¹ así como diferente pronóstico. Tanto la anterior clasificación como un sistema predictivo derivado de la misma y basado en un subgrupo con 50 genes (PAM50) han mostrado valor de pronóstico, predictivo o ambos en pacientes con cáncer de mama.²² En la práctica, y hasta que los sistemas de clasificación molecular estén accesibles clínicamente, se suelen emplear sistemas basados en la inmunohistoquímica convencional. Esta técnica permite determinar qué tumores son hormonosensibles (luminales), triple negativos o HER2 positivos.²¹

1.2.2. Cáncer de ovario

El cáncer de ovario epitelial es el tumor maligno ginecológico más letal.²³ Este tipo de cáncer se ha referido históricamente como "el asesino silencioso", debido a su falta de síntomas. De hecho, el 70 % de las mujeres que se diagnostican con cáncer de ovario, este se encuentra en estadio avanzado.²³ Actualmente, en España se diagnostican más de 3.000 nuevos casos de cáncer de ovario al año, produciéndose más de 1.900 defunciones anuales por esta causa en nuestro país. Esta enfermedad, que representa el 4,1 % de todos los cánceres en la mujer, ocupa el quinto puesto en cuanto a incidencia de cáncer en mujeres, por detrás del cáncer de mama, el cáncer colorrectal, el de pulmón y el cáncer de cérvix (Figura 1.1).²⁴

Los cánceres ováricos se pueden clasificar como tumores serosos, mucinosos, claros, endometriósicos, transicionales (Brenner) o escamosos.²⁵ No obstante, todavía se discute sobre la histopatología de estos subtipos, ya que cada vez más se reconocen los de origen extraovárico. Tradicionalmente se ha creído que los daños ocasionados en la superficie ovárica debido a la ovulación eran consecuencia de los carcinomas serosos. En la actualidad se ha demostrado que los quistes de inclusión cortical ovárica y del peritoneo también son candidatos a sitios de origen.²⁶ Las lesiones en las trompas de Falopio, denominadas carcinomas intraepiteliales serosos tubáricos (STIC), dieron asimismo lugar a la "hipótesis tubárica" para el cáncer de ovario seroso.²⁷ No siendo la lista de posibles lugares de origen de cáncer de ovario corta, también se postularon lesiones similares precursoras de estos tipos de cáncer en el endometrio.²⁸ Las lesiones atípicas de endometriosis fueron tema de estudio de los tumores endometrioides y de células claras, siendo estos el origen de los tumores no serosos.

La distinción entre enfermedades primaria y metastásica es complicada en un primer diagnóstico para los tumores clasificados como mucinosos. Estos tumores se consideran ahora poco frecuentes como primera enfermedad y son los más comunes como metástasis de otros gastrointestinales.²⁹

Tabla 1.2. Clasificación de tumores de ovario según tejido en el que se desarrollan (SEOM).

TIPO DE TUMOR	TEJIDO	SUBTIPOS	CASOS
Epiteliales	Tejido epitelial	Benignos	90 %
		Bajo potencial maligno	
		Malignos*	
		Seroso (40 %) Endometriode (15 %) Mucinoso (15 %) De células claras Indiferenciado (20 %)	
Células germinales	Tejido germinal	Teratoma	10 %
		Disgerminoma*	
		De seno endodérmico (saco vitelino)*	
		Coriocarcinoma*	
Células estromales	Tejido estromal	Benignos	10 %
		Malignos*	
		Tecomas Fibromas De células granulosas De teca granulosa De células de Sertoli-Leydig	

(*) Subtipos tumorales con malignidad asociada implican la aparición de cáncer de ovario.

1.2.3. Cáncer de pulmón

El cáncer de pulmón presenta una alta agresividad. De hecho, es aquel que provoca mayor mortalidad en hombres a nivel mundial.³⁰ El tabaquismo es la causa más común de este tipo de cáncer: el 90 % de las personas que desarrollan esta enfermedad son fumadores o exfumadores.³¹ El 10 % restante se debe a causas genéticas, factores externos o incluso a ser fumadores pasivos. Tras el diagnóstico, el 50 % de los pacientes fallecen en el primer año, y sólo el 15 % sobreviven más de un lustro.

Comúnmente, el cáncer de pulmón se clasifica en dos grupos: cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC) y de células no pequeñas (NS-CLC). Este último engloba el 85 % de los casos diagnosticados y, a su vez, está subdividido en tres: adenocarcinoma, carcinoma pulmonar de células escamosas y carcinoma pulmonar de células grandes. El adenocarcinoma lo comparten tanto individuos fumadores como no fumadores, y el carcinoma pulmonar de células grandes es el de mayor rapidez en su división.

El método TNM (*Tumor, Node, Metastasis*)³² clasifica el grado de desarrollo en función del tamaño tumor, de su afectación linfática y de la aparición o no de metástasis para

cualquier tipo de cáncer sólido. Según estas tres clasificaciones podremos tener los diferentes tipos de tumores, que a continuación se indican.

Clasificación según la categoría T:

- T1. Tumor de tamaño inferior a 3 cm. No ha alcanzado la pleura visceral y sin afectación de bronquios principales. Se hace una distinción si mide menos de 2 cm (T1a) o si se encuentra entre 2 y 3 cm (T1b).
- T2. Si el tumor presenta, al menos, una de las siguientes características:
 - Mide entre 3 y 7 cm.
 - Involucra un bronquio principal, se sitúa a más de 2 cm de la carina traqueal.
 - Ha crecido hacia el interior de la pleura visceral.
 - Obstruye parcialmente las vías respiratorias, sin colapso ni neumonía

Si el tamaño del tumor es inferior a 5 cm se denomina T2a y si su diámetro es superior se denomina T2b.

- T3. Si el tumor presenta una o más de las siguientes características:
 - Tamaño superior a 7 cm.
 - Ha crecido hacia la pared del interior del tórax (diafragma), hacia la pleura mediastínica o pericardio parietal.
 - Invade un bronquio principal y está a menos de 2 cm de la carina traqueal pero esta no se ve afectada.
 - Ha crecido lo suficiente para crear un colapso total del pulmón y provocar una neumonía en la totalidad del pulmón.
 - Existen dos o más nódulos tumorales en el mismo lóbulo del pulmón.
- T4. Cuando presenta una o más de las siguientes características:
 - El tumor ha crecido hacia el mediastino (espacio entre los pulmones), corazón o vasos sanguíneos grandes cercanos al corazón tales como la aorta, tráquea, estómago, columna vertebral o carina traqueal.
 - Dos o más nódulos tumorales separados se encuentran en lóbulos diferentes del pulmón.

Clasificación de las categorías N:

- N0. Cuando no hay propagación en los nódulos linfáticos.
- N1. Cuando el tumor se propaga a nódulos linfáticos dentro del pulmón y alrededor del área de los bronquios (ganglios linfáticos hilares). Los ganglios linfáticos se encuentran en el mismo lado del tumor primario.
- N2. Cuando los ganglios linfáticos afectados son los de alrededor de la carina o el mediastino. Los ganglios linfáticos se encuentran en el mismo lado del tumor primario.

- N3. Cuando se ha propagado a los ganglios cercanos a la clavícula en cualquiera de sus lados y a los hiliares o ganglios mediastínicos en el lado opuesto al tumor primario.

Clasificación de las categorías M:

- M0. Cuando no se ha propagado a órganos distantes.
- M1a. Cuando se producen algunos de estos casos:
 - Propagación al otro pulmón.
 - Se detectan células malignas en el líquido que rodea al pulmón (derrame pleural maligno).
 - Se detectan células malignas en el líquido que rodea al corazón (derrame pericárdico maligno).
- M1b. Cuando el cáncer se propaga a ganglios linfáticos distantes u órganos tales como hígado, huesos o cerebro.

1.2.4. Cáncer de colon

El cáncer colorrectal es una enfermedad que se desarrolla tanto por causas genéticas como por causas ambientales. La mayoría de los tumores colorrectales (70-85 %) no son derivados de una genética heredada, sino que se engloban dentro de los cánceres de tipo esporádico.³³ El resto de los casos podrían tener un componente hereditario, tanto de familiares de primer como de segundo grado.

De los pacientes que padecen cáncer de colón, un 5 % desarrollan los denominados síndromes hereditarios autosómicos dominantes (Poliposis Adenomatosa Familiar, PAF) y síndrome de cáncer colorrectal hereditario no polipósico (HNPPC).³⁴ Estos síndromes están relacionados con mutaciones germinales en distintos genes. Así ocurre con el gen APC en el síndrome PAF o con genes reparadores del ADN (MLH1, MSH2 y MSH6) en el síndrome HNPPC. Estos genes producen una pronta aparición del tumor o un incremento en la su velocidad de progresión, siendo las personas afectadas por este tipo de cáncer de una edad temprana (40 años), en contraposición de la aparición de los cánceres esporádicos donde la enfermedad se diagnostica sobre los 70 años.³⁵

Desde su establecimiento por Dukes³⁶ en la primera mitad del siglo XX el sistema de clasificación de los tumores colorrectales ha tenido siempre como referencia la extensión anatómica de los mismos. Así, para estos tumores, los tres parámetros fundamentales del método TNM se definen como:

- Extensión (T). Indica el grado de infiltración tumoral en la pared del intestino grueso.
- Ganglios afectados (N). Indica si el tumor se ha extendido a ganglios situados en las proximidades del tumor.

- Metástasis (M). Indica si ha existido invasión de otros órganos por parte del tumor.

Métodos posteriores para la evaluación del tumor, por ejemplo, el estudio anatomopatológico de un mínimo de doce ganglios linfático en los alrededores del tumor, han contribuido a establecer una clasificación más precisa. Aun así, actualmente todavía se utiliza la inicial para toma de decisiones a la hora de determinar qué tratamiento deben recibir los pacientes.³⁷ En la Tabla 1.3 se muestra un resumen detallado de la clasificación TNM del cáncer de colon.³⁸

Tabla 1.3. Clasificación del cáncer de colon. Adaptado de referencia 38.

T-tumor primario	
Tx	No se puede valorar la infiltración del tumor
T0	No hay evidencias de tumor primario
Tis	Carcinoma <i>in situ</i> : intrapitelial o invasión de la lamina
T1	El tumor invade la capa submucosa
T2	El tumor invade la capa muscular propia
T3	El tumor invade la subserosa
T4a	El tumor invade la superficie visceral del peritoneo
T4b	El tumor directamente invade o esta adherido a otros órganos.
N-Invasión de ganglios linfáticos	
Nx	No se puede valorar el nº de ganglios afectados
N0	No hay ganglios linfáticos regionales afectados
N1	Metástasis en 1-3 ganglios linfáticos regionales
N1a	Metástasis en un nódulo linfático regional
N1b	Metástasis en 2-3 nódulos linfáticos regionales
N1c	Depósitos tumorales en la subserosa o mesenterio
N2	Metástasis en más de 4 ganglios linfáticos regionales
N2a	Metástasis en 4-6 nódulos linfáticos regionales
N2b	Metástasis en 7 o más nódulos linfáticos regionales
M-Metástasis distantes	
M0	Sin metástasis distantes
M1	Metástasis distante
M1a	Metástasis localizada en un órgano concreto
M1b	Metástasis en más de un órgano o en peritoneo

1.3. Fisiología alterada por el cáncer

1.3.1. Ciclo celular

Las células proliferan aumentando su contenido de moléculas y organelas (crecimiento en masa y/o tamaño) y duplicando sus cromosomas, para posteriormente dividirse en dos células hijas que son genéticamente iguales. La proliferación celular tiene lugar de un modo controlado de acuerdo a las necesidades generales del organismo.³⁹ La célula puede encontrarse en dos estados como muestra la Figura 1.4: en la interfase o estado de no división; o en el estado de división o mitosis (fase M).

La interfase es el período comprendido entre dos mitosis. Ocupa casi el 90 % del tiempo ciclo celular y engloba las fases G₁, S y G₂. La fase G₁ (G de *gap*) es la primera fase del ciclo celular. En esta fase la célula puede quedar en estado latente durante un tiempo variable según el tipo celular, llamada fase G₀. En la fase G₁ existe crecimiento celular con síntesis de proteínas y de ARN. Es el período que transcurre entre el fin de una mitosis y el inicio de la síntesis de ADN. En la fase S (de síntesis), la segunda del ciclo, se produce la replicación o síntesis del ADN. En la siguiente fase, G₂, se continúa la síntesis de proteínas y ARN, con el ADN ya duplicado. La fase G₂ termina cuando la cromatina se condensa al inicio de la mitosis. Por último, la fase M comprende la división celular, en la cual una célula eucariota somática progenitora se divide en dos células hijas idénticas. La fase de mitosis se divide, a su vez, en función de los diferentes estadios de los cromosomas, en profase, metafase, anafase y telofase. Finalmente, se produce la citocinesis, que se inicia en la telofase mitótica.⁴⁰

1.3.1.1. Control del ciclo celular

La regulación del ciclo celular se produce de forma heterogénea. Algunas células se dividen rápidamente, como las epiteliales; otras, como los glóbulos rojos, pierden la capacidad de dividirse; mientras otras, como las hepáticas, utilizan esta capacidad muy escasamente, solamente se activa la división si se secciona una parte del hígado hasta que retornan a su tamaño natural.

El ciclo celular está regulado. En cada una de las etapas concretas se comprueba que se cumplan las condiciones (tamaño celular, presencia de nutrientes, daño celular, temperatura, entre otras) antes de pasar a la siguiente fase. Si no se cumplen estas condiciones, el ciclo se detiene y la célula deja de crecer o de dividirse.⁴¹

El sistema de control depende de ciertos grupos de genes y de las proteínas y enzimas que codificadas por aquellos.⁴² Se pueden distinguir los siguientes:

- Genes que codifican proteínas para el ciclo, tales como enzimas y precursores de la síntesis de ADN, enzimas para la síntesis y ensamblaje de tubulina, etc. A este tipo pertenecen, por ejemplo, los genes que codifican las polimerasas.
- Genes codificadores de proteínas que regulan positivamente el ciclo (protooncogenes). Estas proteínas activan la proliferación celular para que las células pasen a la siguiente fase. Algunos de estos genes codifican las proteínas del sistema de ciclinas y quinasas dependientes de ellas. Las ciclinas son proteínas reguladoras, de vida corta, que se distinguen según el momento del ciclo en el que actúan y cuyo nivel fluctúa durante el mismo. Existen ciclinas G₁, ciclinas S, ciclinas G₂ y ciclinas M. Las quinasas dependientes de las ciclinas (Cdk) son enzimas que activan o inactivan otras proteínas fosforilándolas. La actividad de cada Cdk aumenta, alcanza un máximo y finalmente disminuye hasta su inactivación dentro de cada etapa del ciclo. Las ciclinas y las Cdk se asocian formando el complejo ciclina-Cdk, que determina la evolución de las distintas etapas del ciclo.
- Antioncogenes o genes supresores de tumores. Son genes que codifican proteínas que regulan negativamente el ciclo. Evitan que la mitosis continúe si se ha producido una alteración del proceso normal.

Los protooncogenes y antioncogenes también se denominan "de verificación". Entre estos se encuentran los que codifican:

- Proteínas que inactivan las Cdk por fosforilación/desfosforilación (por ejemplo, la quinasa WEE1 o la fosfatasa CDC25)
- Proteínas inhibidoras del ciclo (por ejemplo p53, p21 o p16).
- Proteínas que inducen la salida del ciclo hacia un estado celular diferenciado o hacia la apoptosis (por ejemplo, Bax, Bad, Bak o FasR)

La verificación se lleva a cabo en los puntos de control (Figura 1.4) y asegura la fidelidad de la replicación y segregación o separación del genoma (separación de los cromosomas simples en anafase). Algunos componentes, además de detectar fallos, pueden poner en marcha la reparación.

Cuando las células normales cesan su crecimiento, se detienen en un punto tardío de la fase G₁ (punto de control G₁, Figura 1.4), primer punto de control del ciclo celular. En algunos casos, antes de llegar al punto, las células pasan de la fase G₁ a un estado especial de reposo, llamado G₀, en el cual pueden permanecer durante días, semanas o, incluso, años según el tipo celular. Posteriormente, siguen necesariamente a través del resto de las fases del ciclo, y luego se dividen. La fase G₁ se completa rápidamente. En la fase S comienza la síntesis de ADN y de histonas. Existe otro mecanismo de control durante el proceso mismo de duplicación del material genético, en la fase S (Figura 1.4), que asegura que la duplicación se produzca sólo una vez por ciclo. Si algún factor fuera incorrecto en este proceso, la célula moriría por apoptosis (ver más adelante).⁴¹

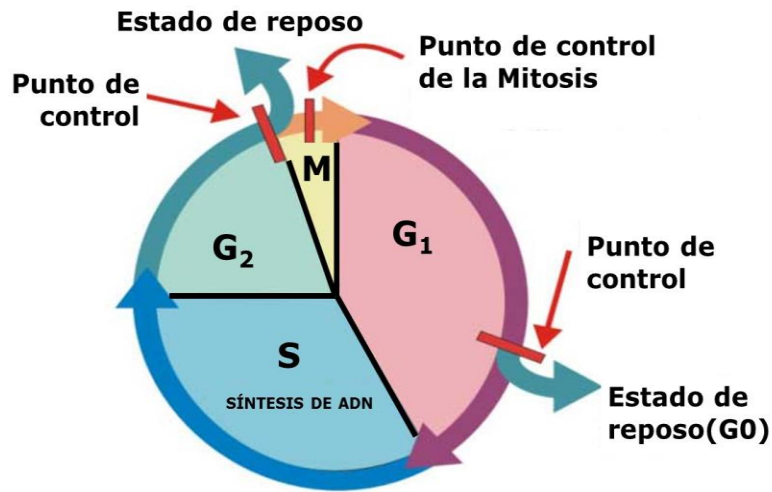


Figura 1.4. Fases del ciclo celular.

A continuación la célula entra en la fase G₂ del ciclo. En G₂, existe otro punto de control en el que se comprueba si la célula está preparada para entrar en mitosis. Por ejemplo, si existe daño en el material genético. Este control actúa como un mecanismo de seguridad que garantiza que solamente entren en mitosis aquellas células que hayan completado la duplicación de su material genético. En las células que contienen ADN con daño genético no reparado o sin replicar, el ciclo celular se detiene. Estas células no se dividirán por mitosis, sino que son inducidas a morir por apoptosis.⁴¹

El número de veces que una célula se ha dividido anteriormente también influye en la división celular. Cuanto mayor edad tiene el organismo de donde se toman las células, menor será el número de veces que las células se dividan en cultivo. A este fenómeno se le denomina envejecimiento celular.⁴³ Esta restricción en el número de divisiones se correlaciona con el acortamiento progresivo de los extremos de los cromosomas –los telómeros– a lo largo de los sucesivos ciclos celulares.⁴⁴

1.3.1.2. Ciclo celular y cáncer

El cáncer se inicia cuando una célula escapa a los controles de división y muerte celular y comienza a proliferar de forma desordenada. Todas las células de un tumor, benigno o maligno, derivan de una sola célula.⁴⁰

La carcinogénesis o aparición de un cáncer es el resultado de dos procesos sucesivos:³⁹

- Aumento descontrolado de la proliferación de un grupo de células que da lugar a un tumor o neoplasia.

- Posterior adquisición por estas células de capacidad invasiva, que les permite diseminarse desde su sitio natural en el organismo, colonizar otros tejidos u órganos y proliferar en ellos (metástasis).

1.3.2. Apoptosis

1.3.2.1. Tipos de muerte celular: necrosis y apoptosis

La necrosis puede definirse como la muerte celular patológica, reconocible por los signos morfológicos de la necrofanerosis. Estos son: en el citoplasma, hipereosinofilia y pérdida de la estructura normal; en el núcleo, picnosis, cariólisis o cariorrexis (Figura 1.5). La picnosis es la retracción del núcleo con condensación de la cromatina; la cariólisis, la disolución del núcleo; la cariorrexis, la fragmentación del núcleo en trozos con cromatina condensada. Las alteraciones del citoplasma y núcleo son coexistentes. La picnosis, cariólisis y cariorrexis no constituyen etapas de la alteración nuclear; representan, aparentemente, formas distintas de reacción. La muerte celular por necrosis es un proceso "pasivo" que no requiere de síntesis proteica, causado por la pérdida de la homeostasia. Se caracteriza por daño mitocondrial, rotura de la membrana, lisis celular y liberación de su contenido al medio extracelular.⁴⁵

Por otra parte, la apoptosis o "muerte celular programada" es una forma de suicidio celular genéticamente definida, que ocurre de manera fisiológica durante la morfogénesis, la renovación tisular y en la regulación del sistema inmunitario. Determinados hechos celulares se pueden explicar por trastornos en la regulación de los genes responsables de la apoptosis, como es el caso de la transformación y la progresión tumoral.⁴³

Los mecanismos que regulan la muerte celular son esenciales para el normal desarrollo y mantenimiento de la homeostasia. Las células crecen controladamente gracias a la expresión de genes que inducen señales de muerte en estadios definidos de diferenciación y en respuesta a estímulos fisiológicos determinados.⁴⁶ Se considera la apoptosis como un mecanismo fisiológico de muerte, que se desencadena por diversas señales, que pueden ser fisiológicas o estimulaciones exógenas. Este mecanismo de muerte celular interviene en importantes fenómenos fisiológicos como: embriogénesis, mantenimiento de la homeostasia, renovación tisular y desarrollo y funcionamiento del sistema inmunitario.⁴³

Los trastornos en la regulación de la apoptosis por diferentes vías están presentes en la etiopatogenia de diversas enfermedades autoinmunes y neurodegenerativas. Debido a que la apoptosis puede considerarse como un proceso de eliminación de células defectuosas, la desregulación de los genes que codifican las proteínas relacionadas con la apoptosis puede ser la causa del desarrollo de diversos tumores.⁴⁷

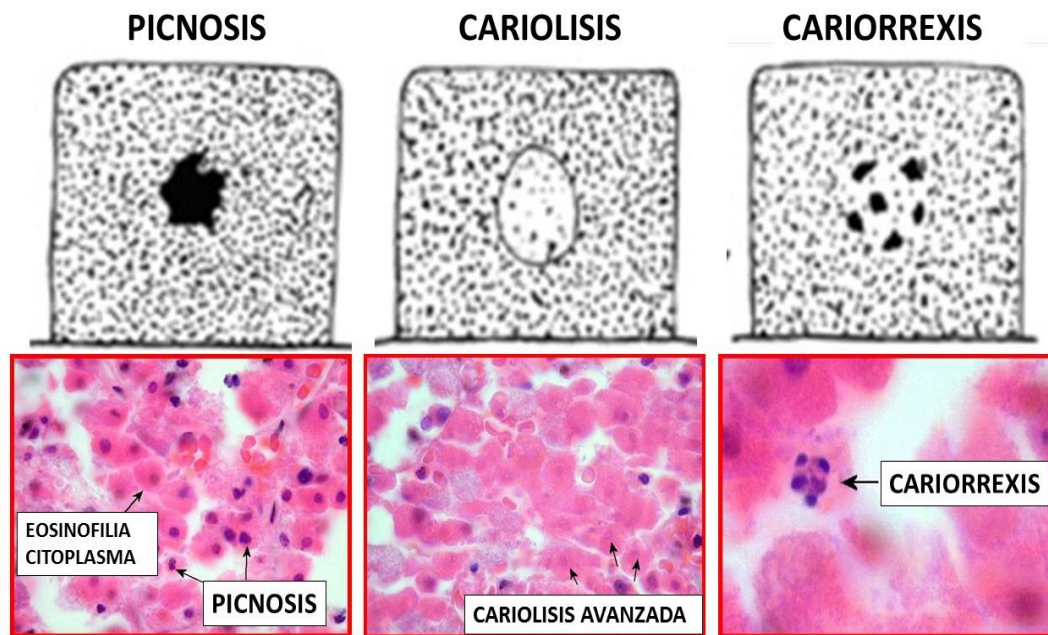


Figura 1.5. Morfología nuclear en la necrosis.

En la Tabla 1.4 se resumen las diferencias entre la apoptosis y la necrosis. Las características de la célula apoptótica difieren de las observadas en las células que sufren necrosis. En este último fenómeno el carácter patológico es la manifestación más grave de enfermedad a nivel celular. Se excluye de la necrosis toda muerte celular que no sea manifestación de enfermedad, por ejemplo, la apoptosis que ocurre en la muerte celular normal en los tejidos lábiles, en los que estos se encuentran normalmente sometidos a un recambio de células (eritrocitos, células epidérmicas, células de los epitelios respiratorio y digestivo, etc.). Se excluye también la muerte celular dentro del proceso de remodelación de órganos en desarrollo. No abarca tampoco la muerte celular que ocurre en el organismo muerto, como fenómeno cadavérico. No comprende, por último, la muerte de células separadas del organismo y producida por la acción de líquidos fijadores, pues dicha muerte no es manifestación de enfermedad.⁴⁸

Tabla 1.4. Diferencias entre necrosis y apoptosis.

	APOPTOSIS	NECROSIS
Estímulo	Fisiológico	Patológico
Presentación	Célula aislada	Grupo de células
Adhesión celular	Pérdida (precoz)	Pérdida (tardía)
Núcleo	Pérdida de límites nucleares (cariorrhexis)	Desaparición (cariolisis)
Fragmentación ADN	Entre nucleosomas	Aleatorio
ADN gel de agarosa	Presente	Ausente
Fagocitosis	Ausente	Presente
Inflamación	Ausente	Presente

1.3.2.2. Características morfológicas

La apoptosis es un proceso activo que implica síntesis proteica, en el cual la célula sufre una condensación nuclear y citoplasmática. Sus características morfológicas revelan condensación de la cromatina nuclear, desintegración nucleolar, disminución del tamaño nuclear, compactación del citoplasma y de organelos (excepto mitocondrias y ribosomas), alteraciones del citoesqueleto y aspecto de burbuja de la membrana, aunque no llegue a fragmentarse. Durante el proceso final se produce la rotura internucleosomal del ADN y se forman fragmentos nucleares recubiertos de membrana (cuerpos apoptóticos), que son fagocitados sin evidencia de reacción inflamatoria.⁴⁸

Existen diferentes genes implicados en el ciclo celular.⁴⁰ El más estudiado es el gen p53. Este gen ha sido llamado “guardián del genoma” por ser el encargado de bloquear la división celular cuando las células han sufrido daño en su material genético. Se trata de un gen supresor que se encuentra en el brazo corto del cromosoma 17, banda 13, y codifica una proteína nuclear de 53 kDa. Este bloqueo p53 lo lleva a cabo deteniendo las células en la fase G₁ del ciclo celular, con el objetivo de que se produzca la reparación del ADN antes de que se replique. Este gen mantiene la integridad del genoma ya que estimula la apoptosis en las células en las que el daño en el ADN ha sido sustancial.⁴⁹

La pérdida de la función normal del gen p53 puede conducir al desarrollo de neoplasias malignas; de hecho son muy frecuentes las alteraciones en este gen en una variedad de cánceres humanos (más del 50 % de los tumores humanos están asociados a

mutaciones en p53).⁴⁹ Se ha sugerido que la transformación maligna en ausencia de p53 reduce la reparación del ADN e incapacita la apoptosis de dicha célula.⁵⁰

Por otra parte, y regulado por p53, se encuentra el gen p21 en el cromosoma 6 (ubicación 6p21.2). Este gen codifica un inhibidor de la quinasa dependiente de ciclina, el cual inhibe la actividad de las enzimas de los complejos ciclina-Cdk2 y ciclina-Cdk4. La proteína codificada por el gen p21 se llama CdkN1A (por sus siglas en inglés *cyclin-dependent kinase inhibitor 1A*). CdkN1A regula el avance de la fase S del ciclo celular.⁵¹

1.3.3. Actividad caspasa

1.3.3.1. Caspasas

Como se ha descrito anteriormente, la apoptosis es un proceso biológico fundamental y complejo, que permite discriminar células no deseadas en el desarrollo animal, además de mantener la homeostasis del individuo.⁴⁸ Existen múltiples vías de iniciación de la apoptosis, desencadenadas a partir de la unión de determinados fármacos a receptores de superficie celular y otros eventos.⁵² No obstante, las proteínas implicadas en la activación y ejecución de la apoptosis son las denominadas caspasas (cisteínil-aspartato proteasas), grupo de cisteín-proteasas que escinden las proteínas donde existe un grupo aspartato. En humanos se han reconocido hasta el momento 14 tipos diferentes de estas proteínas. Normalmente se encuentran como procaspasas, inactivadas; la procaspasa-3 se procesa por escisión autocatalítica.⁵³ Las caspasas desempeñan un papel fundamental tanto en el desarrollo embrionario como en el posterior ciclo de vida del individuo.⁵³ En los mamíferos la activación de las caspasas (principalmente caspasa-3) produce un rápido desplegamiento de proteínas estructurales, de señalización, así como de las enzimas reparadoras y, en consecuencia, también modifica la homeostasis de todas estas macromoléculas.⁴³

Se pueden distinguir dos tipos de caspasas: las caspasas proinflamatorias y las caspasas proapoptóticas.⁵³ Las caspasas proinflamatorias regulan la maduración de las citoquinas durante la inflamación. Las caspasas proapoptóticas median la transducción de la señalización de muerte celular. Estas últimas, a su vez, se clasifican en dos subgrupos: iniciadoras y efectoras. Las caspasas iniciadoras son las primeras en activarse y contienen dominios grandes denominados "dominios efectores de muerte" (DED) a través de los cuales interaccionan con las caspasas efectoras, activándolas. Las caspasas efectoras, con dominios pequeños, ejecutan etapas de la apoptosis mediante la escisión de múltiples sustratos celulares que son procesados y activados por otras caspasas previas en la cascada. La caspasa 3 es una caspasa efectora principal que escinde la mayoría de los sustratos en las células sometidas a apoptosis.⁵⁴

1.3.3.2. Caspasas y cáncer

Nuestras células utilizan varios mecanismos sofisticados para impedir el desarrollo de cáncer. Estos mecanismos reconocen las mutaciones del ADN e inducen su reparación cuando este es defectuoso. La muerte de la célula afectada antes de que el ADN pueda convertirse en oncogénico es fundamental contra el desarrollo de la enfermedad. Las caspasas son cruciales para la apoptosis, por lo que la desregulación de estas enzimas y las vías en las que están implicadas pueden ayudar en la persistencia de las células mutadas y promover la aparición de cáncer.⁵³

Sin embargo, aunque las caspasas son actores claves en el mecanismo de muerte de células cancerosas, a diferencia de la mutación de p53, la mutación de los genes que codifican las caspasas (CASP) no es frecuente en las células tumorales humanas. Estudios genéticos han demostrado que la inactivación de caspasas individuales no suele ser suficiente para impedir la continuación de la cascada de caspasas.⁵³ Las células malignas parecen ganar más frecuentemente una ventaja de supervivencia inactivando los mediadores de señalización en las primeras etapas de la activación de la caspasas.⁵⁵ Por otra parte, se ha comprobado que la disminución de la expresión de caspasas proapoptóticas en una variedad de cánceres y mutaciones específicas de inactivación de ellas se puede vincular a diversos tipos de tumores y etapas de transformación de estos.⁵³ Además, aunque las mutaciones heredadas en los genes CASP son relativamente raras, se han asociado ciertos polimorfismos de caspasa que se cree afectan la abundancia o actividad de las caspasas con efectos variables en la tumorigénesis.^{56,57}

1.3.3.3. El gen CASP3 y Caspasa-3

Se han realizado diferentes estudios que intentan correlacionar alteraciones del gen CASP3 (que codifica la caspasa-3) y la promoción de la tumoración humana. A continuación comentamos algunos resultados que consideramos más sobresalientes.

Se ha examinado la región de codificación de caspasa-3 en 944 tumores de 14 tipos diferentes en comparación con el tejido adyacente sano. Sólo 14 de estos tumores (1,48 %) mostraron mutaciones de CASP3 en la misma posición,⁵⁸ por tanto, una mutación puntual de este gen no es la única causa de los tumores. Estudios en tumores analizaron 930 carcinomas de células escamosas de cabeza y cuello (SCCHN) y 993 controles. El genotipo TT de esa *posición (locus)* se asoció con un mayor riesgo de SCCHN en comparación con el genotipo GG.⁵⁶ Este hallazgo fue más evidente en ciertos subgrupos, concretamente en individuos menores de 56 años y en personas no fumadoras. También se manifestó de forma más clara la influencia del genotipo TT en hombres que en mujeres. Por el contrario, en un análisis de 582 pacientes de cáncer de pulmón con sus respectivos controles, se encontró al menos un alelo con un polimorfismo que tenía menor riesgo

significativo de padecer cáncer en comparación con los homocigóticos de CASP3.⁵⁶ En otro estudio de 1028 pacientes con cáncer de endometrio y 1003 controles sanos se examinaron los posibles vínculos entre los alelos CASP3, CASP7 y CASP8 y el riesgo de cáncer endometrial. En comparación con el genotipo CC, el genotipo GG de rs2705901 en CASP3 se asoció significativamente con el aumento del riesgo de cáncer.⁵⁹ Los datos que se extraen de estos trabajos sugieren que los polimorfismos en CASP3 con sus haplotipos contribuyen a definir la susceptibilidad genética de un individuo para el desarrollo del cáncer.

1.3.4. Muerte celular independiente de caspasas

Desde hace ya más de dos décadas se sabe que la mera distinción entre apoptosis y necrosis a la hora de clasificar la muerte celular es una simplificación.⁶⁰ A pesar de que las caspasas pueden ser indispensables para la apoptosis típica, este no es el único proceso determinante en la entrada de una cascada de muerte celular.⁶¹ Las distintas formas de muerte celular independiente de caspasas no son clasificables necesariamente como apoptosis o necrosis. De hecho, se han descrito tipos alternativos de muerte celular programada, que además de activarse bajo estados fisiológicos determinados, también pueden desencadenarse bajo los efectos de TNF α o fármacos quimioterápicos.⁶²

Xiang y colaboradores proporcionaron la primera evidencia de muerte celular independiente de caspasas.⁶³ Este grupo demostró que la inhibición de caspasa en la línea celular Jurkat (leucemia humana) no impide la muerte celular inducida por Bax, una de las principales proteínas reguladoras de la apoptosis, que, no obstante, participa en este mecanismo no considerado apoptótico. Además, Cauwels y Perfettini, independientemente,^{64,65} trabajando con ratas, demostraron que la inhibición de caspasas no reducía, sino por el contrario aumentaba, la expresión del factor de necrosis tumoral (TNF α). Este último dato indicaba que la muerte celular programada no se limita a modelos *in vitro*.

Uno de estos procesos de muerte celular programada no apoptótica es la autofagia (en griego "auto", uno mismo; "phagos", comer), que también se llama muerte celular tipo II, para distinguirla de la apoptosis o muerte celular tipo I.⁶⁶ Este proceso se caracteriza por la envoltura del citoplasma y de orgánulos en vesículas autofágicas con una doble membrana.⁶⁷ Estas vesículas son conducidas posteriormente hasta los lisosomas celulares para su digestión. Este proceso sirve también para eliminar proteínas u organelos sobrantes y tiene una importante función de remodelación celular. Puede desencadenarse tanto por estrés como por citoquinas. La autofagia conduce a una muerte celular de una manera no apoptótica y sin activación de caspasas.⁶⁸

La autofagia puede influir tanto en la promoción como en la inhibición del cáncer y su papel puede alterarse durante la progresión de la enfermedad.⁶⁹ La autofagia también es un proceso homeostático necesario para la célula tumoral, ya que puede regular el número celular ante un aporte limitado de nutrientes o bajo condiciones de hipoxia. De esta forma, las células tumorales se protegen también mediante este proceso.⁷⁰ Por otra parte, elementos celulares dañados por radiación se pueden eliminar también mediante este mecanismo, de forma que se incrementa la resistencia celular frente a fármacos. El proceso de la autofagia arroja hoy en día descubrimientos sobre su mecanismo y modo de acción. Es así, que en el pasado año 2016, el premio Nobel de medicina fue otorgado al biólogo japonés, especialista en autofagia, Yoshinori Ōsumi por sus hallazgos y contribución en el estudio de la autofagia.⁷¹⁻⁷⁵

Otro proceso de muerte celular es la paraptosis. La paraptosis se caracteriza por la vacuolización del citoplasma, que empieza con un progresivo incremento en el volumen mitocondrial y del retículo endoplasmático. No implica activación de caspasas, ni la formación de cuerpos apoptóticos.⁷⁶ Este tipo de muerte celular se describió por primera vez en el año 2000 por Sperandio *et al.*⁷⁷ Existen relativamente pocos estudios sobre la paraptosis.⁷⁶ La paraptosis está mediada por mitógenos activados por quinasas y se puede iniciar por receptores de la familia de TNF y por el receptor de factor I de crecimiento AIP1/Alix,⁷⁸ una proteína que interactúa con ALG-2 (reguladora de calcio), es indispensable en la paraptosis. En efecto, la inhibición de AIP1/Alix bloquea la paraptosis. Esto último no sucede en la apoptosis, lo que sugiere que se trata de dos medios de muerte celular diferentes.⁷⁶

Otra vía de muerte celular es la catástrofe mitótica. Se activa por fallo mitótico causado por los puntos de control del ciclo celular cuando existen procesos defectuosos o amenazantes, como por ejemplo el desarrollo de células aneuploides.⁷⁹ Se puede desencadenar por agentes estabilizadores o desestabilizadores de microtúbulos y daño al ADN. Esta vía hace que la célula muera cerca de la metafase de una manera no dependiente o sólo parcialmente dependiente p53.⁸⁰ Se han publicado estudios en los que se describe que la catástrofe mitótica va acompañada de una permeabilización de la membrana mitocondrial y de una activación de caspasas.⁸¹

1.3.5. Angiogénesis

1.3.5.1. Definición

El término angiogénesis fue acuñado por el cirujano escocés John Hunter en 1787.⁸² Su enorme curiosidad le llevó a coleccionar y estudiar toda clase de animales en su casa de campo. Observó el crecimiento de los cuernos de sus renos, que caen y brotan de nuevo en cada temporada y apreció el rápido desarrollo de nuevos vasos sanguíneos bajo la fina

membrana aterciopelada que cubre las cornamentas incipientes. Su observación, sin embargo, cayó en el olvido durante 180 años.⁸³

La angiogénesis se refiere al proceso que conduce a la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de la vascularización preexistente. El proceso de angiogénesis incluye pasos múltiples: la migración y proliferación de células endoteliales (ECs) y la formación y organización de grupos celulares en estructuras tubulares que eventualmente se unirán, para finalmente madurar en vasos sanguíneos estables^{84,85} (Figura 1.6).

1.3.5.2. Fisiología

La última década ha sido testigo de un flujo impresionante de investigación sobre la angiogénesis que ha generado importantes avances en el conocimiento de su papel fisiológico y de su implicación en el cáncer.⁸⁶⁻⁹⁰

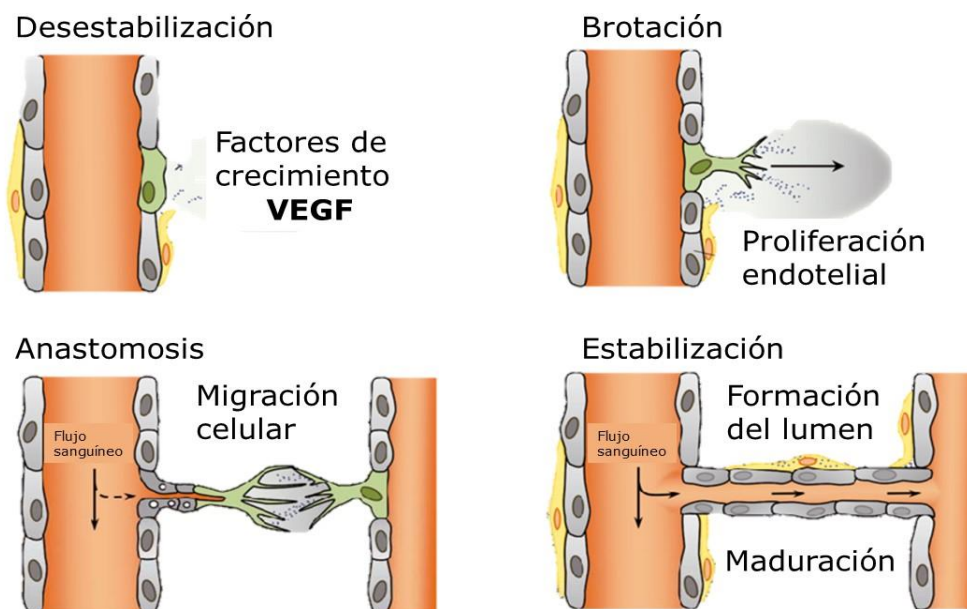


Figura 1.6. Proceso de angiogénesis. Adaptado de referencia 85.

Al igual que los tejidos normales, los tumores requieren alimento en forma de nutrientes y oxígeno, así como una capacidad de evacuación metabólica de desechos y de dióxido de carbono. La neovascularización asociada al tumor, generada por el proceso de angiogénesis, se ocupa de estas necesidades.⁹⁰

Durante la embriogénesis, el desarrollo vascular implica el nacimiento de nuevas células endoteliales y su ensamblaje en tubos (vasculogénesis), además de la germinación (angiogénesis) de nuevos vasos a partir de otros existentes. Después de esta morfogénesis, el sistema vascular normal permanece, en gran medida, en reposo.⁹¹

En el adulto, como parte de procesos fisiológicos tales como la cicatrización de heridas y el ciclo reproductivo femenino, la angiogénesis se activa, pero sólo transitoriamente. En contraste, durante la progresión tumoral, la angiogénesis está casi siempre activada, pasando de la formación de vasos quiescente a continua, y generando así nuevos vasos que ayudan a mantener la expansión del crecimiento neoplásico.⁸⁸

Muchos estudios han demostrado que el interruptor angiogénico se rige por factores compensatorios que, o bien inducen o bien, por contra, inhiben la angiogénesis.^{90,92,93} Algunos de estos reguladores angiogénicos son proteínas de señalización que se unen al receptor de la superficie celular estimulando o inhibiendo las células endoteliales vasculares. En la bibliografía se han descrito diferentes inductores o inhibidores de angiogénesis.^{87,90,94-96} Entre ellos, cabe destacar los indicados a continuación.

VEGF⁹⁷ (*Vascular Endothelial Growth Factor*) es miembro de una familia de proteínas relacionadas estructuralmente que actúan como ligandos de los receptores de VEGF (VEGFR). VEGF ejerce sus efectos sobre el desarrollo de nuevos vasos sanguíneos (angiogénesis) y la supervivencia de los vasos sanguíneos inmaduros (mantenimiento vascular) al unirse a VEGFR-1 y VEGFR-2 y activarlos. VEGFR-1 y VEGFR-2 son dos receptores de membrana tirosin-quinasa relacionados estructuralmente, expresados por las células endoteliales de la pared vascular. La unión de VEGF a estos receptores inicia una cascada de señales que finalmente estimula el crecimiento, la supervivencia y la proliferación de las células del endotelio vascular. Las células desempeñan funciones en procesos tan variados como la vasoconstricción/vasodilatación y la presentación de antígenos, y son componentes esenciales de los vasos sanguíneos, ya sean capilares, venas o arterias. Por lo tanto, al estimular las células endoteliales, VEGF desempeña un papel central en la angiogénesis.

El gen de VEGF-A,⁹⁸ el principal factor proangiogénico, codifica ligandos que están involucrados en la sincronía del nuevo crecimiento de vasos sanguíneos durante el desarrollo embrionario y postnatal, así como en la supervivencia homeostática de células endoteliales en situaciones fisiológicas y patológicas en el adulto. La señalización de VEGF a través de tres receptores con actividad tirosin-quinasa (VEGFR-1 y -3) está regulada a varios niveles, lo que refleja su complejidad. La sobreexpresión de VEGF se puede deber tanto a una sobrerregulación como a la activación de las vías de hipoxia o a la señalización oncogénica.⁹⁷

Además, los ligandos de VEGF pueden ser secuestrados en la matriz extracelular en formas latentes que están sujetas a la liberación y activación por las proteasas metálicas que degradan la matriz extracelular (MMPs, por ejemplo, MMP-9).⁹⁹ El aumento sostenido en la expresión de otras señales proangiogénicas, como pueden ser los miembros de la familia del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), se ha relacionado con el mantenimiento de la angiogénesis tumoral.¹⁰⁰ La trombospondina (TSP-1), un antagonista

clave en el cambio angiogénico, también se une a receptores transmembrana de las células endoteliales generando señales supresoras que pueden contrarrestar los estímulos proangiogénicos.¹⁰¹

1.3.5.3. Angiogénesis tumoral

Hace décadas se observó que la angiogénesis se produce alrededor de los tumores.¹⁰² Una mayor investigación sobre este fenómeno llevó a la hipótesis de que los tumores producen factores proangiogénicos para estimular la neovascularización. A principios de los 70, Folkman propuso que la inhibición de angiogénesis podría proporcionar un medio para el tratamiento del cáncer.¹⁰³ Desde entonces, la investigación en angiogénesis tumoral se ha centrado en la comprensión de los procesos por los cuales células tumorales promueven el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos.¹⁰²

La última década ha sido testigo de un flujo impresionante de investigación sobre la angiogénesis, que ha generado importantes avances en el conocimiento de su papel fisiológico y de su implicación en el cáncer.⁸⁷⁻⁹⁰ El proceso de angiogénesis tumoral se activa principalmente cuando una lesión tumoral supera el punto del tamaño máximo que le permite ser mantenida por difusión de oxígeno y nutrientes. El ambiente hipóxico hace que las células tumorales activen el interruptor angiogénico que conduce a una mayor producción de mediadores proangiogénicos como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF).⁸⁷

Los procesos que tienen lugar cuando se desata la angiogénesis son los siguientes¹⁰⁴ (Figura 1.7):

- Las proteínas proangiogénicas VEGF se desprenden en el microambiente y activan las células endoteliales en los vasos cercanos.
- Al mismo tiempo, un incremento de la actividad de diferentes enzimas proteolíticas, resultantes de la degradación de la membrana basal y del desprendimiento de los contactos célula-célula, facilita la vasodilatación y la permeabilidad de los vasos.
- La escisión de proteolítica de la matriz extracelular también permite la migración de las células endoteliales activadas hacia señales quimiotácticas que se originan en el tejido tumoral. Estas señales se detectan por las denominadas células de la punta endoteliales y causan la posterior migración y la proliferación de las células endoteliales, dando como resultado la formación de nuevos vasos.⁹⁸

Tumor localizado o “*In situ*” El tumor puede crecer y migrar

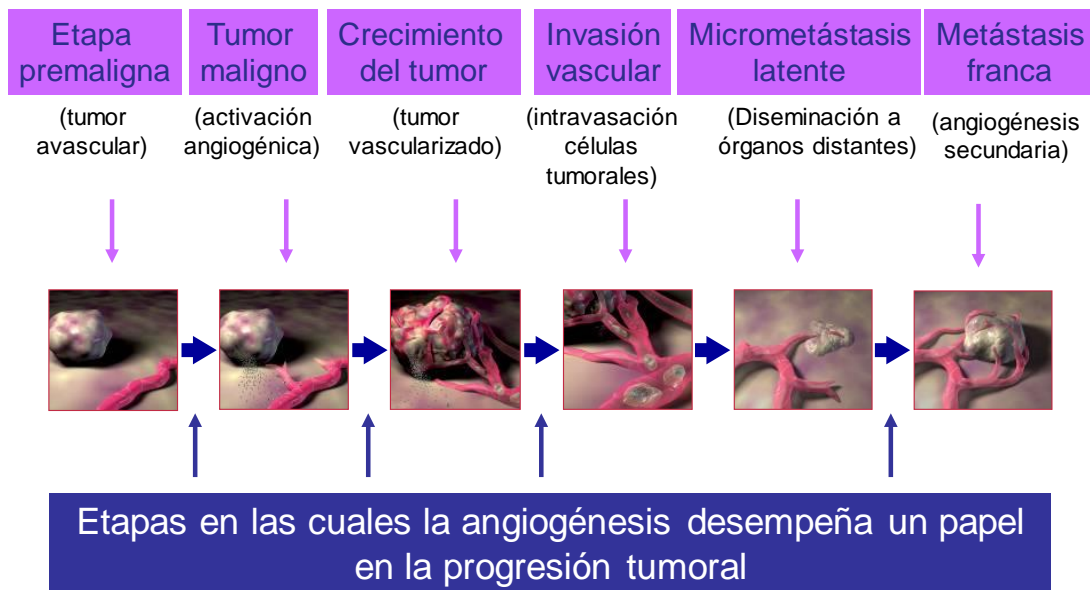


Figura 1.7. Etapas de la angiogénesis. Adaptado de referencia 104.

Los vasos prematuros recién formados son frágiles y requieren una mayor estabilización. El proceso de maduración incluye la inhibición del crecimiento de células endoteliales y, posteriormente, la formación de tubos capilares por el reclutamiento de pericitos y células del músculo liso y la deposición de una nueva matriz extracelular.⁸⁸ A pesar de su estructura desorganizada e irregular, esta red es capaz de proporcionar todos los metabolitos necesarios. Además, el lecho vascular proporciona a las células tumorales la oportunidad de entrar en la circulación y formar metástasis a distancia.¹⁰²

Los vasos sanguíneos tumorales así formados tienen crónicamente activadas las señales proangiogénicas y generan una neovascularización típicamente aberrante, marcada por una brotación precoz de la capilaridad, una excesiva ramificación, la presencia de vasos distorsionados y ampliados, un flujo de sangre errático, presencia de microhemorragias e hiperpermeabilidad y de niveles anormales de proliferación y apoptosis de las células endoteliales.⁹⁰

Inicialmente se creía que la angiogénesis sólo era relevante en procesos de crecimiento neoplásico rápido o cuando los tumores se habían hecho macroscópicos,¹⁰³ pero datos más recientes indican que la angiogénesis también contribuye a la fase premaligna y microscópica de la progresión neoplásica, lo que pone aún más de manifiesto su condición de sello integral del cáncer.⁸⁸ Los análisis histológicos de lesiones premalignas y lesiones no invasivas, incluyendo displasias y carcinomas *in situ*, han puesto de manifiesto la temprana activación del interruptor angiogénico.⁹⁰ Así, la angiogénesis comienza de forma muy temprana durante la etapa de desarrollo de neoplasias invasivas, tanto en modelos animales como en los seres humanos.¹⁰⁵

1.4. Metalofármacos

1.4.1. Química Inorgánica Médica

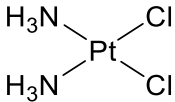
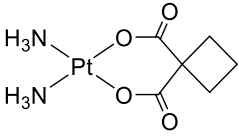
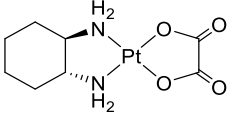
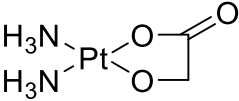
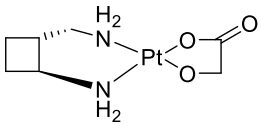
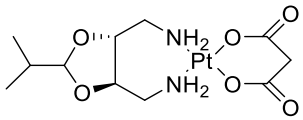
La terapia contra el cáncer es muy extensa y depende decisivamente del grado de avance de la enfermedad y de la enfermedad en sí misma. Entre los tipos de terapia existentes podemos encontrar:¹⁰⁶ la cirugía, la radioterapia, la inmunoterapia, la hipertermia, entre otras. Todas ellas quedan, lógicamente, fuera del objetivo de esta Tesis. Uno de los tratamientos más extendidos y efectivos contra el cáncer es la quimioterapia:¹⁰⁷ administración de fármacos que, por diversos mecanismos, producen la muerte de la célula cancerígena. Los metalofármacos son, dentro de la quimioterapia, uno de los fármacos más extendidos. Como es bien conocido, este tipo de tratamiento comenzó de forma casual (serendipia) por el descubrimiento de un complejo de platino(II) como inhibidor del crecimiento bacteriano. En efecto, en 1965 Rosenberg comprobó que la división celular bacteriana no se producía en presencia de un campo eléctrico en sus condiciones de trabajo.¹⁰⁸ Tras un estudio pormenorizado concluyó que el motivo de esta inhibición era la generación de *cis*-diamindicloroplatino(II) (cisplatino o CDDP, de aquí en adelante, Tabla 1.5) como consecuencia de la interacción entre el electrodo de platino que generaba el campo eléctrico y el cloruro amónico presente en el medio de cultivo. El cisplatino fue el primer metalofármaco anticancerígeno utilizado y es, aún hoy en día, uno de los principales.

La relevancia de este descubrimiento y su posterior aplicación en humanos una década después^{109,110} supuso la apertura de un vastísimo campo de investigación, denominado Química Inorgánica Médica. Esta línea se encuentra dentro de un área de conocimiento más amplia como es la Química Bioinorgánica, que trata de la interacción de iones metálicos y compuestos no derivados del carbono con los organismos vivos. La Química Bioinorgánica abarca una gran variedad de líneas de investigación, desde la estructura-función de metaloproteínas, biocatálisis, la biolixividación, ciencia de biomateriales, descontaminación, etc. No obstante, la Química Inorgánica Medicinal es, probablemente, una de las áreas más sobresalientes y fructíferas dentro de la Química Bioinorgánica. Esta rama de la ciencia estudia el diseño, la síntesis y la caracterización de nuevos agentes terapéuticos, así como la investigación de los procesos moleculares provocados por ellos.

El desarrollo de metalofármacos en las últimas décadas ha sido exponencial.¹¹¹ Su idoneidad como agentes terapéuticos se fija más en función de su alta especificidad y/o menores efectos secundarios que en su efectividad como anticancerígenos, habida cuenta de que todos lo son. En efecto, como comentaremos a continuación, el mayor inconveniente de todos los metalofármacos es la posibilidad de interaccionar no sólo con

células cancerígenas, sino también con células sanas, desarrollándose entonces en el paciente los bien conocidos e indeseables efectos secundarios.¹¹² Estos pueden derivar de la acción directa del fármaco por su interacción con componentes de la célula o bien por la generación de ROS y la alteración del estado redox celular que los metalofármacos pueden inducir. La investigación actual tiene su foco, en consecuencia, no sólo, ni siquiera principalmente en la búsqueda de más eficientes metalofármacos, sino en su mayor especificidad.¹¹³

Tabla 1.5. Compuestos de platino en uso clínico.

NOMBRE	USO	AÑO	ESTRUCTURA	INDICACIÓN
Cisplatino	Mundial	1979		Cáncer de testículo, ovario, vejiga urinaria, cabeza y cuello, NSCLC ^a , SCLC, gástrico y anal.
Carboplatino	Mundial	1989		Cáncer de ovario, NSCLC, SCLC, melanoma, cabeza y cuello, timo y mama.
Oxaliplatino	Mundial	2002		Cáncer colorectal.
Nedaplatino	Japon	1996		Cáncer de NSCLC, SCLC, esófago, cabeza y cuello, vejiga urinaria.
Lobaplatino	China	2004		Cáncer de mama, SCLC, leukemia mieloide crónica.
Heptaplatino	Korea del Sur	2005		Cáncer gástrico.

A continuación indicamos, sucintamente, el estado de la investigación respecto a metalofármacos de los iones metálicos que son objeto de la presente Tesis, así como su interacción con diferentes componentes celulares que pueden dar lugar a problemas de toxicidad.

1.4.2. Platino

Como hemos indicado, el cisplatino fue el primer metalofármaco empleado con fines terapéuticos contra el cáncer.¹¹⁰ De ahí que se denomine "quimioterapia convencional" la basada en este compuesto de platino(II) y derivados (Tabla 1.5). Los estados de oxidación más comunes del platino son +2 y +4. En su estado de oxidación +2 el platino es considerado un ácido blando, por lo que reacciona fácilmente con bases blandas, y típicamente presenta coordinación cuadrado-plana. En la célula reacciona con biomoléculas que contienen azufre. Por el contrario, el platino(IV) se trata de un ácido duro, y tiene apetencia átomos dadores duros, como el oxígeno, y da lugar a complejos octaédricos. Pasamos a describir de forma somera el estado de la cuestión de este elemento en función de su estado de oxidación.

1.4.2.1. Platino(II)

Actualmente el cisplatino se utiliza clínicamente en los pacientes afectados por cáncer testicular, de ovario, de cabeza, de cuello, colorrectal, de vejiga y de pulmón.¹¹⁴ Los efectos antineoplásicos de cisplatino se han atribuido a su capacidad de generar daños irreparables al ADN. El cisplatino interacciona principalmente con el motivo estructural -GG- del ADN^{115,116} (Figura 1.8). Esta coordinación del metal distorsiona la doble hélice, de forma que el sistema de reparación de nucleótidos es incapaz de subsanar el daño causado y se inhiben tanto la replicación como la transcripción del ADN, lo que conduce a la detención del ciclo celular. Como consecuencia, el cisplatino induce apoptosis por la ruta intrínseca mitocondrial.

El principal aspecto negativo del tratamiento de quimioterapia convencional proviene del hecho de que el Pt(II) interacciona fuertemente con átomos de azufre (metioninas y cisteínas) que existen en proteínas de forma que la gran mayoría del fármaco (> 95 %) no llega a su molécula diana (ADN).¹¹⁵ Este carácter inespecífico de los compuestos de Pt(II) conlleva, por tanto, todo tipo de reacciones que dan lugar a los efectos secundarios (vómitos, alopecia, etc.). Por este motivo, se han desarrollado nuevos fármacos de Pt(II) más específicos y selectivos, que disminuyen, parcialmente, estos efectos secundarios. En la Tabla 1.5 se muestran las estructuras de compuestos de Pt(II), que se usan en clínica.¹¹⁷⁻

120

Por otro lado, la administración de cisplatino se asocia generalmente con altas tasas de respuesta clínica positiva. En la gran mayoría de los casos, las células malignas expuestas a cisplatino activan una respuesta adaptativa multifacética que las hace menos susceptibles a los efectos antiproliferativos y citotóxicos.¹²¹ Estas células finalmente, reanudan la proliferación, es decir, generan resistencia al fármaco. En consecuencia, un

gran porcentaje de los pacientes tratados con cisplatino están destinados a experimentar un fracaso terapéutico y la recurrencia del tumor.

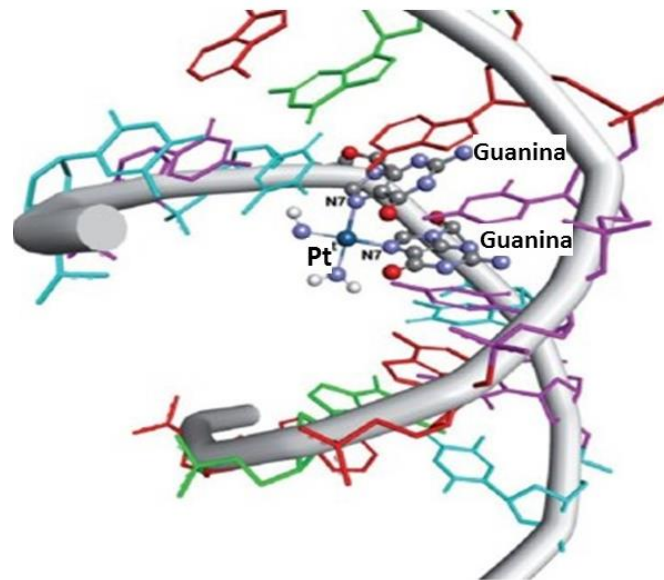


Figura 1.8. Cisplatino formando aductos con el N7 de la guanina. Adaptado de referencia 116.

El cisplatino interacciona con el glutatión (GSH) a través de su grupo tiol, formando conjugados y agotando su contenido celular. GSH es la principal molécula antioxidante de la célula y actúa como un tampón redox, reduciendo o evitando el estrés oxidativo. La desaparición de GSH como consecuencia de su interacción con platino(II) altera la homeostasis redox y los niveles ROS intracelulares. Asimismo, el estado mitocondrial alterado provoca una generación de radicales hidroxilos, debido al agotamiento del NADPH celular.¹²²

Otros estudios sugieren que un objetivo adicional del cisplatino es el retículo endoplasmático, alterando el proceso de peroxidación lipídica y dañando, a su vez, las proteínas oxidativas que contribuyen a la disrupción estructural de la membrana mitocondrial y, consecuentemente, induciendo apoptosis.¹¹⁴

Por último, cabe también mencionar que el cisplatino reacciona directamente con la tiorredoxina reductasa (TrxR), que contiene un puente disulfuro/ditiol redox en su sitio activo y un residuo de seleno-cisteína en el extremo C-terminal. El platino(II) interacciona fuertemente con el residuo de selenocisteína, uniéndose de forma irreversible e inhibiendo la actividad TrxR. Por lo tanto, se puede resumir que la homeostasis redox intracelular está severamente afectada por el cisplatino debido a la interrupción de los sistemas TrxR y GSH reductasa.¹¹⁵

1.4.2.2. Platino(IV)

La acción antitumoral de los complejos de Pt(IV) se descubrió junto a la del cisplatino en los años 60,¹⁰⁹ aunque no ha sido hasta mucho más recientemente cuando se ha comenzado a desarrollar su empleo. Los complejos de Pt(IV) presentan coordinación octaédrica (mayor número de coordinación que los de Pt(II), 6 frente a 4). La posibilidad de introducir un mayor número de ligandos que en el caso de Pt(II) le proporciona diferencias en las propiedades de lipofilidad, de estabilidad y de potencial redox. Por otra parte, los complejos de Pt(IV) son más inertes y poseen menor reactividad con biomoléculas, por lo que sus efectos secundarios son menores.¹²³ En la Figura 1.9 se muestran algunos compuestos de Pt(IV) sintetizados estudiados en fase clínica.

Los complejos de Pt(IV) están considerados como profármacos puesto que su acción se debe a que se reducen en el medio intracelular y es el complejo de Pt(II) generado el responsable de su acción antitumoral. Los dos ligandos liberados en este proceso pueden también tener actividad biológica. No obstante, aunque existe una correlación entre la actividad de los compuestos de Pt(IV) y su potencial de reducción, es difícil predecir su actividad anticancerosa *in vivo*. Una explicación de esta disparidad podría ser la reducción temprana de los complejos Pt(IV) en el torrente sanguíneo, lo que puede conducir a una menor absorción de fármacos por las células.¹¹⁴

El primero de los compuestos de Pt(IV) en ser descrito con actividad via oral fue el satraplatino¹²⁴ (Figura 1.9). Se diseñó con unas características de lipofilidad y estabilidad que le otorgaban la capacidad de ser administrable via oral. Una vez en sangre, el satraplatino se reduce en seis especies de compuestos de platino(II). Uno de ellos, el amino-ciclohexylamina-dicloroplatino(II) es el resultado de la pérdida de los dos ligandos acetato y es el que mejor capacidad anticancerígena posee.¹²⁵ Los estudios preclínicos muestran un mayor efecto del satraplatino con respecto al cisplatino, incluso en células resistentes al cisplatino.¹²⁴ El modo de acción se asemeja al cisplatino. Provoca distorsión y "cross-link" del ADN, con la consecuente inhibición de la replicación.

Otro de los primeros compuestos de platino(IV) en ser evaluado en fase clínica fue el ormaplatino, también conocido como tetraplatino (Figura 1.9). Se reduce rápidamente en medio de cultivo dando especies similares al oxaliplatino. Los estudios *in vitro* e *in vivo* muestran actividad anticancerígena frente a células cisplatino resistentes y, por este motivo, fue candidato para ensayos clínicos.¹²⁶ Los estudios no pasaron de la fase I debido a que el ormaplatino mostraba una alta neurotoxicidad debido a su rápida reducción a especies de platino(II).¹²⁷⁻¹²⁹

Otro compuesto de platino(IV), con similar estructura al ormaplatino y con el que se han realizado estudios clínicos, es el iproplatino, también conocido como CHIP o JM9 (Figura 1.9). Estudios con carbono-14 han mostrado que el mecanismo de acción del

iproplatino actúa de forma que reduce el platino(IV) a platino(II), formando enlaces covalentes con el ADN.¹³⁰ El iproplatino posee varias ventajas con respecto al ormaplatino en las que se encuentra la solubilidad en agua y no ser tan propenso a la reducción dentro del organismo. El iproplatino es uno de los compuestos de platino(IV) que más se ha estudiado y todavía no se ha comercializado. Hasta 38 estudios se han llevado a cabo con este compuesto, revelando en diversos de ellos problemas con la dosis respuesta dependiendo del tipo de cáncer.^{123,131,132} También mostró efectos secundarios como mielosupresión. Estos estudios concluyeron que el iproplatino no poseía una eficacia en general mayor que el cisplatino o el carboplatino por lo que abandonaron los ensayos.¹²³

La quimioterapia fotoactivable ofrece un control sobre la activación y acción de la droga. Esta forma de actuar frente a los tumores ha mostrado actividad frente a tipos de cáncer de piel, pulmón, cerebro y esófago.¹²³ La radiación que se hace incidir en los tumores específicamente hace que la droga realice su efecto en ese lugar solamente, siendo inocua cuando circula por otros sitios. Con esta idea se desarrollaron multitud de compuestos de platino(IV).¹³³ Hasta el momento se han sintetizado dos generaciones de compuestos de platino(IV): los de primera generación, aquellos que contienen dos ligandos iodo, y la segunda generación, que contienen dos ligandos azida (Figura 1.10).

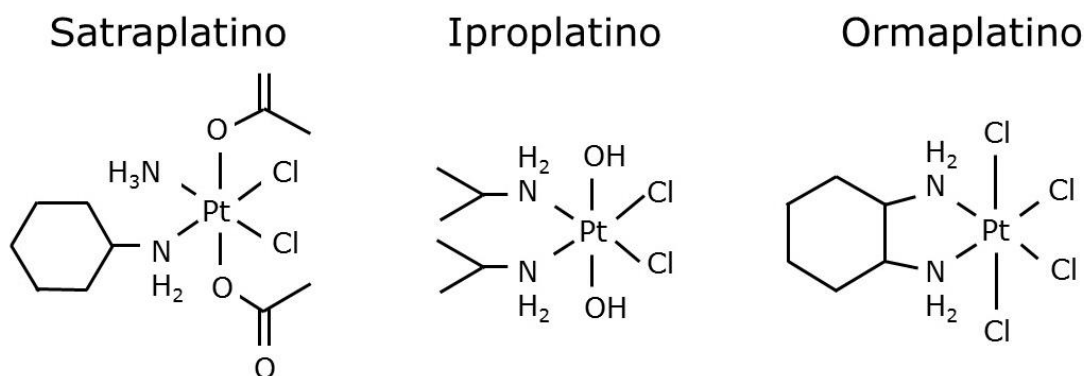


Figura 1.9. Compuestos de platino(IV) estudiados en fase clínica.

Los compuestos de primera generación o diiodo se sintetizaron en primer lugar con ligandos cloruro axiales.¹³⁴ Se observó que estos complejos se unían al ADN irreversiblemente cuando se incidía determinada longitud de onda sobre ellos, pero también lo hacían en la oscuridad, probablemente debido a su fácil reducción.¹³⁵

En la segunda generación, los ligandos cloruro fueron sustituidos por azida. Estos radicales se descomponen rápidamente en solución acuosa para dar nitrógeno (N₂) molecular. La radiación con luz UV llevaba a la formación de especies de platino(II) y

platino(IV). Los experimentos con células de vejiga urinaria 5637 y resistentes al tratamiento con cisplatino no mostraban resistencia cruzada con el cisplatino. Además, los ensayos mostraban que los complejos diazida se podían unir al ADN e inhibir la síntesis de ARN, pero la microscopía confocal no mostraba signos evidentes de apoptosis. Se concluye que los complejos diazido platino(IV) irradiados pueden inducir la muerte celular de manera diferente al cisplatino.¹²³

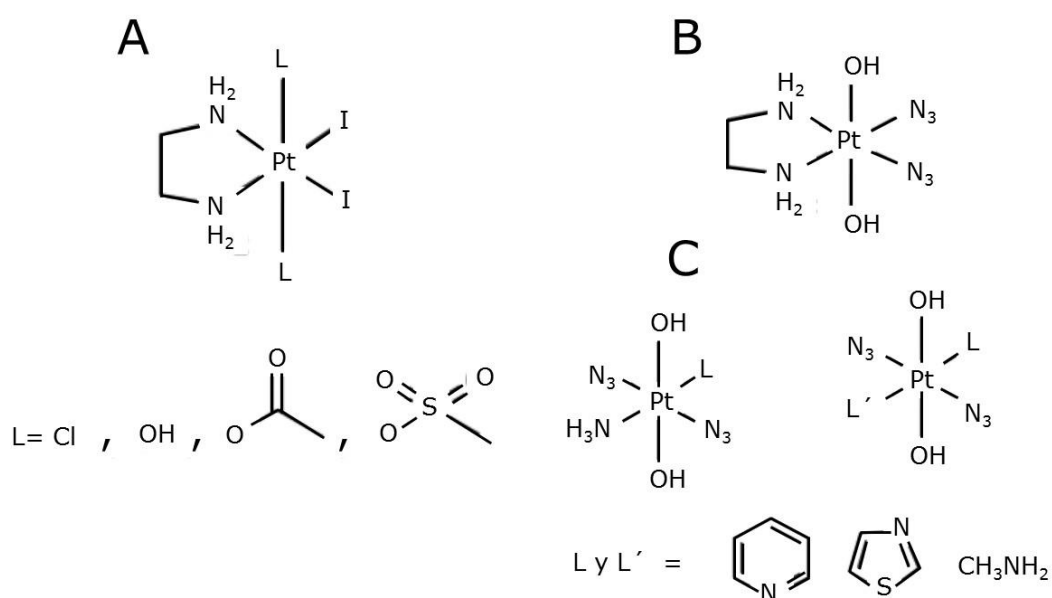


Figura 1.10. Complejos de platino(IV) fotoactivables de primera y segunda generación. A) Complejos diiodo de primera generación. B) Complejo diazida de segunda generación. C) Complejos diazida de segunda generación con ligandos de anillos aromáticos.

1.4.3. Rutenio

En los últimos lustros, el rutenio (en sus estados de oxidación más comunes, II y III) se ha mostrado como un agente anticancerígeno relevante.¹³⁶ Existen numerosos complejos de Ru(II) y Ru(III) sintetizados con alta capacidad citotóxica *in vitro*.¹³⁷ Más aún, se ha llegado a ensayos preclínicos con los compuestos NAMI-A, KP1090¹³⁸ y NKP1339¹³⁹ (Figura 1.11).

formula $[(\eta^6\text{-areno})\text{RuCl}(\text{en})]\text{PF}_6$ (en = etilendiamina) que se muestran en la Figura 1.12A que presentan citotoxicidad frente a células tumorales, incluyendo líneas resistentes al cisplatino.^{148,149} Un segundo grupo de compuestos de Ru(II) a mencionar son los complejos sintetizados por Dyson y colaboradores de la familia RAPTA (Figura 1.12B), que muestran baja toxicidad y capacidad antiangiogénica y antimetastásica *in vivo*.^{112,150,151} Estos complejos contienen un ligando areno, dos cloruros lábiles y un ligando PTA que es una fosfina muy estable, lo que les confiere unas propiedades muy favorables en tanto a solubilidad en agua como de permeabilidad en la membrana celular.¹⁵² Este ligando PTA posee, además, un valor de pK_a inferior al pH intracelular (7,0-7,2) del presentado por las células cancerígenas debido al microambiente que las rodea,^{153,154} que es diferente al de las células normales,¹⁵⁵ lo que le confiere una mayor facilidad para su captación por las primeras. Asimismo, RAPTA-C también se puede internalizar en nanopartículas, en este caso de Fe(III), para su control sobre la absorción y liberación del metalofármaco,¹⁵⁶ lo que hace de este compuesto un candidato idóneo para su estudio en nanomedicina. A simple vista, por la similitud estructural se podría pensar que les conferiría a estos dos tipos de compuestos tipo "taburete de piano" un mecanismo análogo de acción citotóxica. Sin embargo, los mecanismos parecen ser muy diferentes.^{148,150,157}

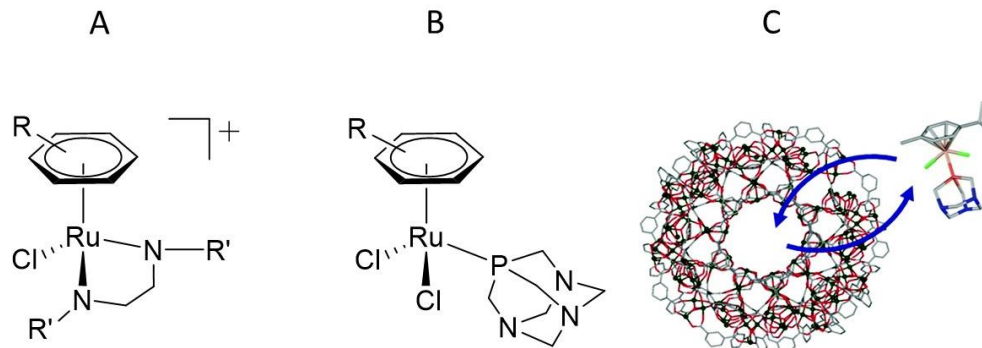


Figura 1.12. (A) Derivados del compuesto de Ru(II) etilendiamina. RAPTA-C. (B) Derivados del compuesto de Ru(II) RAPTA. (C) Compuesto RAPTA-C en nanopartículas de óxido de hierro(III), adaptado de referencia 150.

Aunque los modos de acción precisos de los compuestos de rutenio todavía no se entienden completamente, hay amplia evidencia de que las reacciones y balance celular redox desempeñan un importante papel regulador en la actividad anticancerígena de muchos compuestos de rutenio.¹⁴³ La capacidad de los sistemas redox celulares para reducir/oxidar el complejo de rutenio depende drásticamente de la esfera de coordinación del complejo. Debido a la fuerte unión de los complejos de rutenio a las proteínas séricas,¹³⁶ la reducción extracelular del complejo de rutenio parece improbable. En consecuencia, se

supone que la reducción de compuestos de rutenio tiene lugar dentro de la célula después de la liberación del compuesto de rutenio de su soporte biológico.¹⁴⁴

1.4.4. Iridio

El iridio es un metal de transición, del grupo del platino, que se sitúa en el grupo 9 de la Tabla Periódica.¹⁵⁸ Aunque a veces se supone que son químicamente inertes, la reactividad de los centros $5d^6$ Ir(III) de bajo spin depende en gran medida del conjunto de ligandos. Las aplicaciones como agente farmacológico de los metalofármacos de este elemento se basaron, inicialmente, en la similitud estructural y electrónica que poseían los complejos de Ir(I) con los complejos de platino, tal como el cisplatino.¹⁵⁹ Con el avance en el estudio de estos complejos, se han investigado también otros complejos de iridio en estado de oxidación III como anticancerígenos.^{158,160-162} Estos últimos poseen un potencial antineoplásico mayor que el cisplatino frente a diversos tipos de cáncer, a saber, leucemia, cáncer de colon, cáncer de mama, cáncer de próstata y melanoma.¹⁶³⁻¹⁶⁵ En la Figura 1.13 se muestran diferentes complejos de Ir actualmente estudiados.

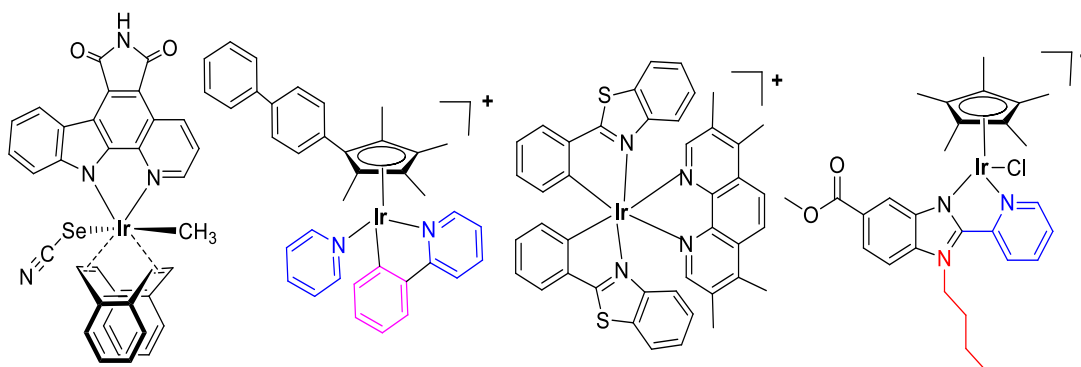


Figura 1.13. Algunos complejos de iridio con actividad biológica.

Se han identificado dos modos de acción anticancerígenos preferentes de los complejos de Ir(III): bien dañando el ADN, o bien alterando el estado redox de las células tumorales (o una combinación de ambos efectos).¹⁶¹ Los complejos de Ir(III) ciclometalados octaédricos se pueden fotoactivar, y en este estado exhiben buena actividad anticancerígena.¹⁶⁶ Así, pueden inhibir el TNF- α ,¹⁶⁷ promover la oxidación del ADN y generar oxígeno singlete.¹⁶³ Este modo de acción sería preferente sobre las células cancerígenas frente a las sanas. En efecto, mientras las células sanas mantienen niveles de ROS en equilibrio (generación y eliminación de las especies reactivas), las células cancerosas muestran, debido a su alto metabolismo, también altas concentraciones de especies ROS.¹⁶⁸

El efecto de los complejos de Ir(III) puede estar combinado con el de sus ligandos. Por ejemplo, algunos compuestos "semi-sándwich" de iridio(III) con el ligando benzimidazol, cuyos derivados orgánicos se han utilizado ampliamente como fármacos,¹⁶⁹ presentan capacidad inhibitoria de la agregación del péptido A β -amiloide, responsable de la generación de la enfermedad de Alzheimer.¹⁷⁰

Una característica interesante de muchos compuestos de Ir(III) son sus propiedades luminiscentes, lo que les hace idóneos para ser utilizados como agentes de diagnóstico de imágenes celulares.^{164,166,171} Nos encontramos, pues, ante un campo en pleno desarrollo para la generación de nuevos potenciales fármacos antitumorales con desconocidos mecanismos de acción que, además, pudieran ser también utilizados como agentes de diagnóstico. La combinación de ambas características se denomina teragnosis.

1.4.5. Oro

El empleo medicinal de las sales de oro figuraba en el papiro de Ebers y en los escritos de Hipócrates, pero su uso comenzó a extenderse durante el siglo XIV,¹⁷² manteniéndose con altibajos hasta bien entrado el siglo XX. En un comienzo se recomendaba para la artritis reumatoide¹⁷³ aunque fue extendiéndose a patologías tan diversas como la epilepsia, la esterilidad y los desordenes uterinos.¹⁷⁴

La crisoterapia, tratamiento de enfermedades por el oro, se utilizaba desde tiempos muy pretéritos, obviamente sin fundamento científico, más bien relacionado con el denominado "elixir de la vida" que buscaban los alquimistas.¹⁷⁵ No obstante, desde 1920 se utiliza la crisoterapia por sus efectos inmunomoduladores en el tratamiento de la artritis reumatoide¹⁷³ y en la artritis psoriásica.¹⁷⁶ Dentro de este marco, en los últimos años, en varios estudios se ha descrito la actividad contra el cáncer de complejos de oro *in vitro*^{177,178} y, en menor medida, *in vivo*.¹⁷⁹

Tras el uso clínico de cisplatino, uno de los primeros metales cuyos complejos se han utilizado ampliamente en el tratamiento del cáncer ha sido el oro. Se han producido varios intentos para preparar y evaluar nuevos compuestos, ya sean de Au(III), los más utilizados, o de Au(I) como agentes antitumorales experimentales con especial atención a los complejos fosfina-oro.¹⁸⁰ Aunque algunos de estos compuestos mostraron una acción antitumoral *in vitro* muy pronunciada y se llegó a pensar que podrían ser buenos candidatos como antitumorales, pronto se abandonó su estudio por la alta citotoxicidad y la menor eficacia que presentaban en estudios *in vivo* comparados con los *in vitro*.¹⁸¹ Aun así, hoy en día se siguen desarrollando compuestos similares buscando mejorar su eficacia.^{177,182}

En efecto, las sales de oro tienen con frecuencia efectos secundarios menores, como dermatitis, estomatitis y una discreta proteinuria. La toxicidad pulmonar por sales de oro es poco frecuente y referida habitualmente al tratamiento de la artritis reumatoide. Más

infrecuente todavía es la aparición de este efecto tóxico en la artritis psoriásica, aunque se han descrito algunos casos.¹⁸³

Se han ensayado *in vitro* distintos compuestos de Au(I)^{177,182} y Au(III)^{178,184} (Figura 1.14) frente a diferentes líneas de células cancerosas humanas de ovario, pulmón, mama, colon o melanoma (es decir, líneas celulares A2780, A2780cis, SKOV3, A549, MCF-7, HT-29, B16F10, CT26WT) y frente a células no cancerosas de riñón (células BHK-21), mostrando buenos resultados. Esto lleva a pensar que los complejos de Au(I) y Au(III) pueden llegar a ser buenos candidatos como antitumorales frente a distintos tipos de cánceres.

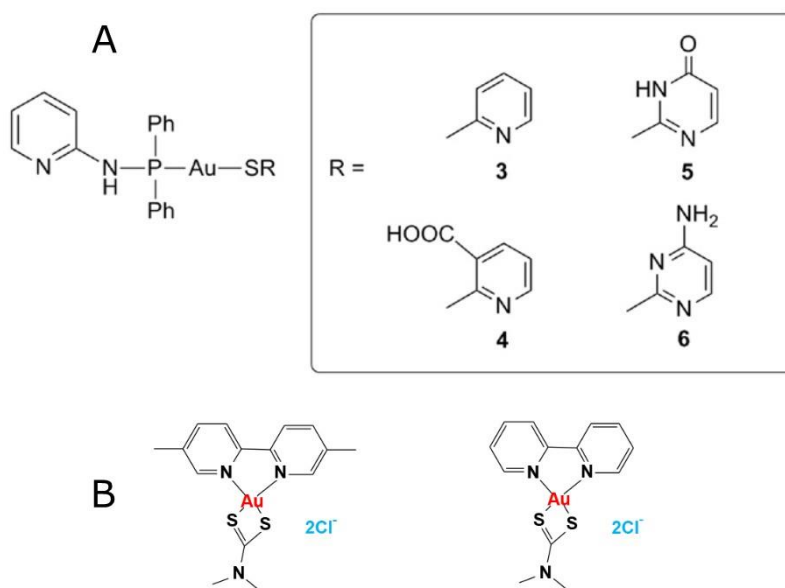


Figura 1.14. Complejos de oro(I) y oro(III) ensayados *in vitro*. Adaptado de referencias 173 (A) y 166 (B)

Respecto a los posibles mecanismos de acción, los compuestos de oro presentan fuertes efectos antimitocondriales a través de la inhibición de las seleno-enzimas, como la tiorredoxina reductasa (TrxR), que participa en el mantenimiento del homeostasis celular.^{185,186} Los compuestos de Au(I) más relevantes con fines medicinales son aquellos formados con ligandos tiolato y fosfina, como la auranofina, la miocrisina y el solganol¹⁸⁷ (Figura 1.15).

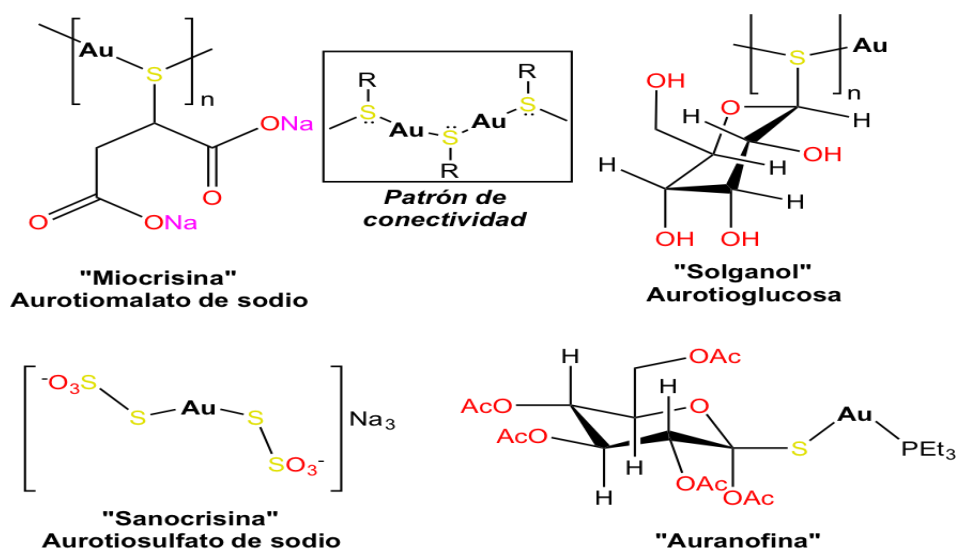


Figura 1.15. Compuestos de oro en uso clínico.

Los complejos de Au(I) intercambian rápidamente sus ligandos con otros otros metabolitos, por ello están considerados como profármacos. Por ejemplo, el oro(I) tiene mucha afinidad de anclaje por la albúmina sérica del suero sanguíneo a través de su cisteína-34. En el caso de la auranofina, la unión conduce a la liberación del ligando trietilfosfina y la oxidación a Au(III).¹⁸⁸ Por otra parte, el principal efecto de los complejos de Au(I) en la homeostasis redox es la inhibición de los sistemas de tiorredoxina citosólica y mitocondrial. La combinación de la inhibición de TrxR y la perturbación de la respiración mitocondrial conducen a un aumento de ROS, hinchazón mitocondrial, una disminución del potencial de membrana mitocondrial y, posteriormente, a apoptosis.¹⁸⁰

1.4.6. Otros iones metálicos

1.4.6.1. Complejos de Ti(IV)

En los trabajos pioneros de Köpf y Köpf-Maier del año 1979¹⁸⁹ se descubrieron las posibilidades como agentes antitumorales de compuestos organometálicos de Ti(IV) entre ellos los complejos metalloceno dicloruro (Figura 1.16). La bioquímica de los complejos titanoceno, caracterizados inicialmente por Green en 1972,¹⁹⁰ ha sido también explorada muy extensamente. De hecho, ya existe un compuesto, el Cp_2TiCl_2 ($Cp = \eta^5-C_5H_5$),¹⁹¹ con el que se han realizado ensayos clínicos de fase I. Estudios realizados con este compuesto demostraron que el titanio se acumula en el ADN de las células tumorales e inhibe la réplica del mismo.¹⁹²

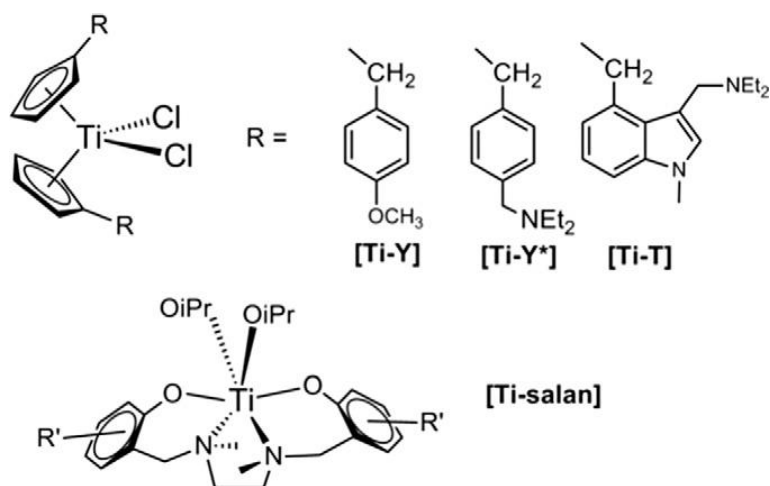


Figura 1.16. Compuestos de titanio(IV) en estudio.

Cuando se usan derivados titanoceno en tratamientos quimioterapéuticos siempre se encuentra la limitación en su alta neurotoxicidad. Inicialmente los compuestos de Ti(IV) presentaban un aspecto muy positivo: no producían efectos negativos sobre la médula ósea. Uno de los peores efectos secundarios del uso de agentes orgánicos como anticancerígenos es el producido sobre la médula ósea. Este hecho fue un resultado muy prometedor que llevó a pensar en la posibilidad de utilizar los compuestos derivados del titanoceno en terapias combinadas. Por otra parte, ensayos clínicos sobre pacientes de mama no condujeron a los resultados deseados.¹⁹³ No obstante, sí que se observó una alta actividad de los mismos frente a otros tumores sólidos, por ello hoy en día se sigue investigando *in vitro* con derivados de titanoceno para el cáncer de próstata¹⁹⁴ o para el cáncer de colon y de ovario, tanto *in vitro* como *in vivo*.¹⁹⁵

1.4.6.2. Complejos de Sn(IV)

Las potenciales propiedades terapéuticas de los complejos de estaño se establecieron ya en 1929,¹⁹⁶ si bien no fue hasta la década de los 80 del siglo pasado cuando se empezaron a estudiar en detalle las propiedades antiproliferativas de estos compuestos.¹⁹⁷ Dentro de los complejos estudiados siempre han destacado los derivados di- y triorganoestaño(IV), como el mostrados en la Figura 1.17 aunque únicamente se encuentran en investigaciones preclínicas debido a la toxicidad intrínseca que presenta el ion Sn(IV).¹⁹⁸

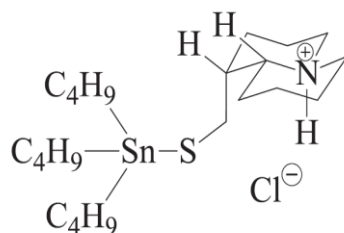


Figura 1.17. Compuesto IST-FS 35 de Sn(IV) usado como antitumoral en estudios preclínicos.

La actividad que presentan los compuestos de estaño(IV) en los tratamientos contra el cáncer es debida, principalmente, a su capacidad para inducir apoptosis en las células cancerosas. Es el caso específico del fragmento de organoestaño(IV) que se enlaza a los grupos fosfatos del ADN,¹⁹⁹ al contrario de los complejos de platino(II) que se unen al nitrógeno N7 de las guaninas. Hoy en día los resultados de los nuevos estudios con fármacos metálicos de organoestaño revelan unos resultados esperanzadores con células cancerosas resistentes a la terapia con cisplatino, como son las de pulmón (A549cis), las de mama (MCF-7cis) o las de cérvico-uterino (HeLacis) y una baja hepatotoxicidad evaluada en líneas celulares no tumorales de rata (BRL), lo que los hace buenos candidatos para estudios *in vivo*.¹⁹⁸

1.4.6.3. Complejos de Ga(III)

El Ga(III) también se ha utilizado como agente anticancerígeno. En la Figura 1.18 se muestran dos compuestos cuyos ensayos se encuentran en fase clínica I. Los complejos de Ga(III) son unos candidatos muy prometedores para terapias contra el cáncer debido a la analogía que presenta el ion Ga(III) con el ion Fe(III), tanto en electronegatividad, afinidad electrónica, radio iónico, geometría de coordinación²⁰⁰ y afinidad por distintas bases de Lewis. Todo ello sugiere que el ion Ga(III) sigue los mismos pasos bioquímicos que los propuestos para el metabolismo del hierro dentro del organismo. Todas estas características hacen que complejos de Ga(III) se puedan utilizar como posibles agentes terapéuticos antineoplásicos. Esta actividad terapéutica de los complejos de Ga(III) se confirma por el hecho de que simples sales como nitrato de galio(III) presentan propiedades antitumorales e interfieren con el metabolismo celular del ion Fe(III).²⁰¹ Estudios recientes revelan la acción antitumoral de nuevos compuestos de galio por apoptosis independiente de caspasas y el bloqueo de la división celular después de la primera división post tratamiento.²⁰²

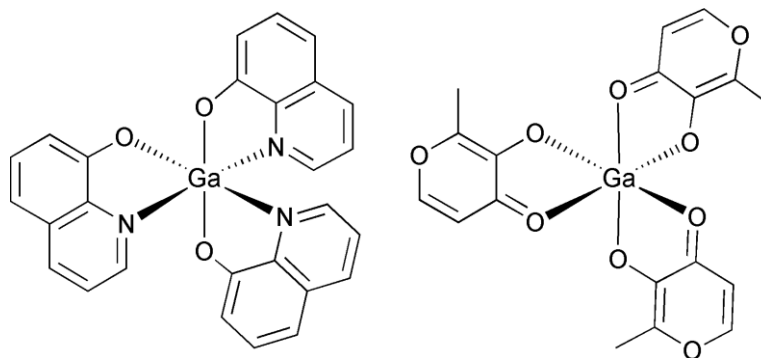


Figura 1.18. Complejos de galio en ensayos *in vitro*. KP46 (izda.) y maloato (dcha.) de galio(III)

1.4.7. Nanopartículas de seda

La nanomedicina es una rama de la nanotecnología que se perfila como una de mayor proyección en un futuro próximo debido a sus importantes aplicaciones, especialmente diagnósticas y terapéuticas. El término engloba un mundo científico interdisciplinar que implica a físicos, químicos, biólogos, ingenieros y médicos.²⁰³ Una definición formal de nanomedicina fue la que formuló la Fundación Europea de la Ciencia en 2004:²⁰⁴ “Es la ciencia y la tecnología de diagnosticar, tratar y prevenir las enfermedades y lesiones traumáticas, aliviar el dolor y preservar y mejorar la salud humana, utilizando herramientas moleculares y el conocimiento molecular de los seres humanos”.

La nanomedicina se ha propuesto como una posible solución para el desarrollo de nuevos sistemas de reparto y liberación de fármacos basados en nanomateriales, como, entre otros, nanotubos de carbono,²⁰⁵ nanopartículas de oro,²⁰⁶ nanopartículas magnéticas²⁰⁷ o liposomas.²⁰⁸ Todos estos sistemas tienen la ventaja de aumentar la selectividad del profármaco hacia el tejido diana, reducir la acumulación inespecífica y la toxicidad, mientras que mejoran la farmacocinética y biodisponibilidad del fármaco.²⁰⁹

En esta Tesis (Capítulo 7) hemos trabajado con nanopartículas de fibroína de seda (NFS). Estas proceden de la seda del gusano *Bombix mori*, compuesta por dos proteínas. Una de ellas es la fibroína (Figura 1.19), una proteína polimérica y lineal que alterna dos dominios amorfos y láminas- β . La otra proteína es la sericina, hidrosoluble y de estructura globular que mantiene unida a la fibroína.

La sericina tiene aplicaciones cosméticas, aunque no es utilizada para la medicina debido al rechazo que provoca en algunas ocasiones.²¹⁰ Por el contrario, la fibroína es altamente biocompatible, biodegradable, tiene alta capacidad de penetración celular y posee una alta superficie reactiva que la permite unirse de forma covalente a hormonas, péptidos, etc.²¹¹

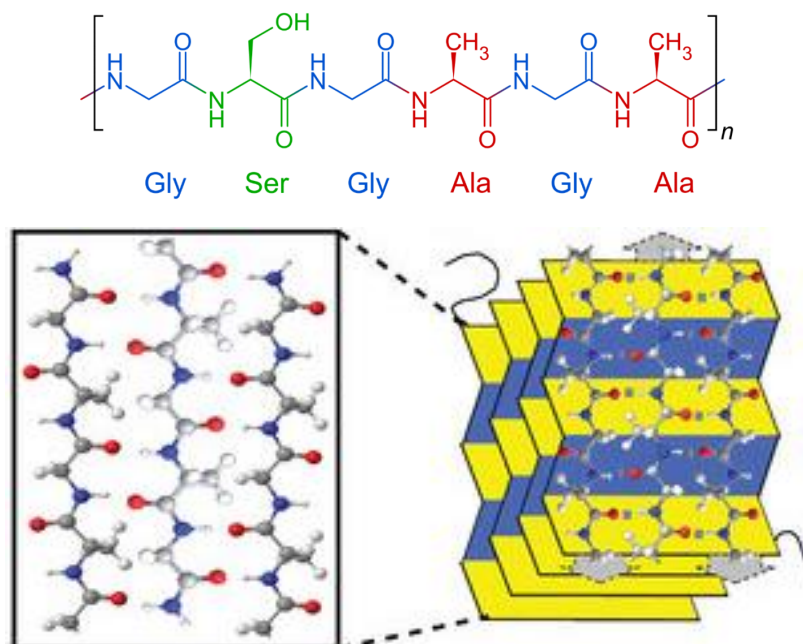


Figura 1.19. Estructura de la fibroína de seda. Arriba, estructura primaria. Abajo, dispersión de las cadenas β diferenciando en primer lugar una estructura laminar (izquierda). Estas laminas se apilan posteriormente para dar una estructura cuaternaria tridimensional (derecha).

El estudio del control de la liberación de las nanopartículas (NPs) es un paso importante para conseguir el éxito de esta estrategia antitumoral y evitar los efectos adversos de la quimioterapia. Conocer la interacción de las NPs con la célula permite mejorar la síntesis y potenciar las propiedades del biomaterial para una liberación óptima del fármaco *in vivo*. Se ha demostrado que la localización celular de las NPs y el potencial tóxico del fármaco depende de la vía de entrada.²¹² La cinética de la unión celular e internalización se ve afectada por las características físico-químicas del sistema NP-fármaco, entre las que se incluyen el tamaño, la forma y la carga, además de la superficie bioactiva.²¹³ De esta manera se ha demostrado que las partículas de tamaño de 200 nm son más eficientes en su internalización que aquellas de 10 μm .²¹⁴ Otro factor a tener en cuenta es la carga de la nanopartícula: aquellas que poseen valores negativos favorecen la unión de la NP con la célula, produciendo un incremento de la tasa de internalización y de liberación del fármaco.²¹⁵

1.5. Bibliografía

1. NIH, "*Comprehensive Cancer Information. What is cancer?* ", **2016**, Dec 21, 2016, <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>
2. Jackson, H. W.; Defamie, V.; Waterhouse, P.; Khokha, R. "*TIMPs: versatile extracellular regulators in cancer*", **2016**, *Nat Rev Cancer*, 17 (1), 38-53.
3. Harrap, K. R. "*Preclinical studies identifying carboplatin as a viable cisplatin alternative*", **1985**, *Cancer Treat Rev*, (12 Suppl A), 21-33.
4. Hanahan, D.; Weinberg, R. A. "*The hallmarks of cancer*", **2000**, *Cell*, (100), 57-70.
5. Kroemer, G.; Pouyssegur, J. "*Tumor cell metabolism: cancer's Achilles' heel*", **2008**, *Cancer Cell*, (13), 472-482.
6. Luo, J.; Solimini, N. L.; Elledge, S. J. "*Principles of cancer therapy: oncogene and non-oncogene addiction*", **2009**, *Cell*, (136), 823-837.
7. Hanahan, D.; Weinberg, R. A. "*Hallmarks of cancer: the next generation*", **2011**, *Cell*, (144), 646-674.
8. Beloribi-Djefafia, S.; Vasseur, S.; Guillaumond, F. "*Lipid metabolic reprogramming in cancer cells*", **2016**, *Oncogenesis*, (5), e189.
9. Kar, S. "*Unraveling Cell-Cycle Dynamics in Cancer*", **2016**, *Cell Systems*, (2), 8-10.
10. OMS, "*Nota descriptiva N°297*", **2015**, Dec 22, 2016, <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>
11. Wikidoks, "*Las estadísticas del cáncer*", **2016**, 1 Dec, 2016, <https://dokituz.com/wikidoks/prevencion/estadisticas-del-cancer.html>
12. Ioan FA, G. H. "*Cancer Causes and Risk Factors and the Elements of Cancer Control*", **2007**, National Academies Press (US),
13. INE, "*Defunciones según la causa de muerte.*", **2015**, 28 Dec, 2016, <http://www.ine.es/prensa/np896.pdf>
14. SEOM, "*Las cifras del cáncer en España 2016*", **2016**, 28 Dec, 2016, http://www.seom.org/seomcms/images/stories/recursos/LAS_CIFRAS_DEL_CANCER_EN_ESP_2016.pdf
15. Giordano, S. B.; Gradishar, W. "*Breast cancer: updates and advances in 2016*", **2017**, *Curr Opin Obstet Gynecol*, 29 (1), 12-17.
16. SEOM, "*Cáncer de mama*", **2015**, 23 Dec, 2016, <http://www.seom.org/es/informacion-sobre-el-cancer/info-tipos-cancer/cancer-de-mama-raiz/cancer-de-mama?start=2#content>
17. TicoVision, "*CCSS estandarizará el tratamiento del cáncer de mama*", **2012**, Dec 1, 2016, <http://www.ticovision.com/cgi-bin/index.cgi?action=viewnews&id=11142>
18. Perou, C. M. et al. "*Molecular portraits of human breast tumours*", **2000**, *Nature*, (406), 747-752.
19. Hadi, N. I.; Jamal, Q. "*OMIC tumor markers for breast cancer: A review*", **2015**, *Pak J Med Sci*, (31), 1256-1262.
20. Ellis, R. E.; Yuan, J.; Horvitz, H. R. "*Mechanisms and Functions of Cell Death*", **1991**, *Annual Rev Cell Biol*, (7), 663-698.

21. Tang, P.; Tse, G. M. "Immunohistochemical Surrogates for Molecular Classification of Breast Carcinoma: A 2015 Update", **2016**, Arch Pathol Lab Med, (140), 806-814.
22. Parker, J. S. et al. "Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes", **2009**, J Clin Oncol, (27), 1160-1167.
23. Langdon, S. P.; Gourley, C.; Gabra, H.; Stanley, B. "Endocrine therapy in epithelial ovarian cancer", **2016**, Expert Rev Anticancer Ther, 17 (2), 109-117.
24. Ferlay J, S. I., Ervik M, et al. "Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 ", **2013**, International Agency for Research on Cancer.
25. Hollis, R. L.; Gourley, C. "Genetic and molecular changes in ovarian cancer", **2016**, Cancer Biol Med, (13), 236-247.
26. Bookman, M. A. "Optimal primary therapy of ovarian cancer", **2016**, Ann Oncol, (27 Suppl 1), i58-i62.
27. Prat, J. "New insights into ovarian cancer pathology", **2012**, Ann Oncol, (23 Suppl 10), x111-117.
28. Roelofsens, T.; van Kempen, L. C.; van der Laak, J. A.; van Ham, M. A.; Bulten, J.; Massuger, L. F. "Concurrent endometrial intraepithelial carcinoma (EIC) and serous ovarian cancer: can EIC be seen as the precursor lesion?", **2012**, Int J Gynecol Cancer, (22), 457-464.
29. Leen, S. L.; Singh, N. "Pathology of primary and metastatic mucinous ovarian neoplasms", **2012**, J Clin Pathol, (65), 591-595.
30. Fitzmaurice, C. et al. "Global, Regional, and National Cancer Incidence, Mortality, Years of Life Lost, Years Lived With Disability, and Disability-Adjusted Life-years for 32 Cancer Groups, 1990 to 2015: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study", **2016**, JAMA Oncol, 3 (4), 524-548.
31. Enomoto, Y.; Inui, N.; Yoshimura, K.; Nishimoto, K.; Mori, K.; Kono, M.; Fujisawa, T.; Enomoto, N.; Nakamura, Y.; Iwashita, T.; Suda, T. "Lung cancer development in patients with connective tissue disease-related interstitial lung disease: A retrospective observational study", **2016**, Medicine, (95), e5716.
32. Goldstraw, P. "New TNM classification: achievements and hurdles", **2013**, Transl Lung Cancer Res, (2), 264-272.
33. Mason, J. B.; Tang, S. Y. "Folate status and colorectal cancer risk: A 2016 update", **2016**, Mol Aspects Med, (53), 73-79
34. Castells, A. "Hereditary forms of colorectal cancer", **2016**, Gastroenterol Hepatol, (39 Suppl 1), 62-67.
35. Jasperson, K. W.; Tuohy, T. M.; Neklason, D. W.; Burt, R. W. "Hereditary and Familial Colon Cancer", **2010**, Gastroenterology, (138), 2044-2058.
36. Dukes. "The classification of cancer of the rectum", **1932**, J Pathol Bacteriol, (35), 323-332.
37. Zhang, M. R.; Xie, T. H.; Chi, J. L.; Li, Y.; Yang, L.; Yu, Y. Y.; Sun, X. F.; Zhou, Z. G. "Prognostic role of the lymph node ratio in node positive colorectal cancer: a meta-analysis", **2016**, Oncotarget, (45):72898-72907.
38. AJCC, "Cancer Staging Posters", **2009**, Dec 15, 2016, <https://cancerstaging.org/references-tools/quickreferences/pages/default.aspx>
39. Xu, W.; McArthur, G. "Cell Cycle Regulation and Melanoma", **2016**, Curr Oncol Rep, (18), 34.

40. Williams, G. H.; Stoeber, K. "The cell cycle and cancer", **2012**, J Pathol, (226), 352-364.
41. Velez, A. M. A.; Howard, M. S. "Tumor-suppressor Genes, Cell Cycle Regulatory Checkpoints, and the Skin", **2015**, North Am J Med Sci, (7), 176-188.
42. Strzyz, P. "Cell signalling: Signalling to cell cycle arrest", **2016**, Nat Rev Mol Cell Biol, (17), 536-536.
43. Lorda-Diez, C. I.; Garcia-Riart, B.; Montero, J. A.; Rodriguez-León, J.; Garcia-Porrero, J. A.; Hurle, J. M. "Apoptosis during embryonic tissue remodeling is accompanied by cell senescence", **2015**, Aging (Albany NY), (7), 974-985.
44. Jafri, M. A.; Ansari, S. A.; Alqahtani, M. H.; Shay, J. W. "Roles of telomeres and telomerase in cancer, and advances in telomerase-targeted therapies", **2016**, Genome Medicine, (8), 69.
45. Conrad, M.; Angeli, J. P. F.; Vandenabeele, P.; Stockwell, B. R. "Regulated necrosis: disease relevance and therapeutic opportunities", **2016**, Nat Rev Drug Discov, (15), 348-366.
46. Galluzzi, L. et al. "Essential versus accessory aspects of cell death: recommendations of the NCCD 2015", **2015**, Cell Death Differ, (22), 58-73.
47. Mohammad, R. M. et al. "Broad targeting of resistance to apoptosis in cancer", **2015**, Semi Cancer Biol, (35), S78-S103.
48. Onal M, O. G., Onal O. "Review of Apoptosis", **2016**, MOJ Immunol, (3),
49. Joerger, A. C.; Fersht, A. R. "The p53 Pathway: Origins, Inactivation in Cancer, and Emerging Therapeutic Approaches", **2016**, An Rev of Biochem, (85), 375-404.
50. Oren, M.; Tal, P.; Rotter, V. "Targeting mutant p53 for cancer therapy", **2016**, Aging (Albany NY), (8), 1159-1160.
51. Dutto, I.; Sukhanova, M.; Tillhon, M.; Cazzalini, O.; Stivala, L. A.; Scovassi, A. I.; Lavrik, O.; Prospero, E. "p21(CDKN1A) Regulates the Binding of Poly(ADP-Ribose) Polymerase-1 to DNA Repair Intermediates", **2016**, PLoS ONE, (11), e0146031.
52. Zeng, W.; Wang, X.; Xu, P.; Liu, G.; Eden, H. S.; Chen, X. "Molecular Imaging of Apoptosis: From Micro to Macro", **2015**, Theranostics, (5), 559-582.
53. McIlwain, D. R.; Berger, T.; Mak, T. W. "Caspase functions in cell death and disease", **2013**, Cold Spring Harb Perspect Biol, (5), a008656.
54. Kavanagh, E.; Rodhe, J.; Burguillos, M. A.; Venero, J. L.; Joseph, B. "Regulation of caspase-3 processing by cIAP2 controls the switch between pro-inflammatory activation and cell death in microglia", **2014**, Cell Death Dis, (5), e1565.
55. Olsson, M.; Zhivotovsky, B. "Caspases and cancer", **2011**, Cell Death Differ, (18), 1441-1449.
56. Lin, J.; Zhang, Y.; Wang, H.; Chang, J.; Wei, L.; Cao, L.; Zhang, Z.; Zhang, X. "Genetic Polymorphisms in the Apoptosis-Associated Gene CASP3 and the Risk of Lung Cancer in Chinese Population", **2016**, PLoS ONE, (11), e0164358.
57. Deng, B.; Liu, F.; Luo, L.; Wei, Y.; Li, B.; Yang, H. "CASP 3 genetic polymorphisms and risk of Hepatocellular carcinoma: a case-control study in a Chinese population", **2016**, Tumor Biol, (37), 8985-8991.
58. Soung, Y. H.; Lee, J. W.; Kim, S. Y.; Park, W. S.; Nam, S. W.; Lee, J. Y.; Yoo, N. J.; Lee, S. H. "Somatic mutations of CASP3 gene in human cancers", **2004**, Hum Genet, (115), 112-115.
59. Xu, H.-I.; Xu, W.-H.; Cai, Q.; Feng, M.; Long, J.; Zheng, W.; Xiang, Y.-B.; Shu, X.-o. "Polymorphisms and haplotypes in the Caspase 3, 7, and 8 genes and risk of endometrial cancer: a

population-based, case-control study in a Chinese population", **2009**, *Cancer epidemiol*, (18), 2114-2122.

60. Bonfoco, E.; Krainc, D.; Ankarcrona, M.; Nicotera, P.; Lipton, S. A. "Apoptosis and necrosis: two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures", **1995**, *Proc Natl Acad Sci U S A*, (92), 7162-7166.

61. Sun, H.; Yang, S.; Li, J.; Zhang, Y.; Gao, D.; Zhao, S. "Caspase-independent cell death mediated by apoptosis-inducing factor (AIF) nuclear translocation is involved in ionizing radiation induced HepG2 cell death", **2016**, *Biochem Biophys Res Commun*, (472), 137-143.

62. Yuan, J.; Kroemer, G. "Alternative cell death mechanisms in development and beyond", **2010**, *Genes & Development*, (24), 2592-2602.

63. Xiang, J.; Chao, D. T.; Korsmeyer, S. J. "BAX-induced cell death may not require interleukin 1 beta-converting enzyme-like proteases", **1996**, *Proc Natl Acad Sci U S A*, (93), 14559-14563.

64. Cauwels, A.; Janssen, B.; Waeytens, A.; Cuvelier, C.; Brouckaert, P. "Caspase inhibition causes hyperacute tumor necrosis factor-induced shock via oxidative stress and phospholipase A2", **2003**, *Nat Immunol*, (4), 387-393.

65. Perfettini, J. L.; Kroemer, G. "Caspase activation is not death", **2003**, *Nat Immunol*, (4), 308-310.

66. Clarke, P. G. "Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms", **1990**, *Anat Embryol (Berl)*, (181), 195-213.

67. Yamasaki, A.; Watanabe, Y.; Adachi, W.; Suzuki, K.; Matoba, K.; Kirisako, H.; Kumeta, H.; Nakatogawa, H.; Ohsumi, Y.; Inagaki, F.; Noda, N. N. "Structural Basis for Receptor-Mediated Selective Autophagy of Aminopeptidase I Aggregates", **2016**, *Cell Rep*, (16), 19-27.

68. Delou, J. M.; Biasoli, D.; Borges, H. L. "The Complex Link between Apoptosis and Autophagy: a Promising New Role for RB", **2016**, *An Acad Bras Cienc*, (88), 2257-2275.

69. Wang, P.; Zhu, L.; Sun, D.; Gan, F.; Gao, S.; Yin, Y.; Chen, L. "Natural products as modulator of autophagy with potential clinical prospects", **2016**, *Apoptosis*, 1-32.

70. White, E. "The role for autophagy in cancer", **2015**, *J Clin Inves*, (125), 42-46.

71. Tsukada, M.; Ohsumi, Y. "Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*", **1993**, *FEBS Lett*, (333), 169-174.

72. Matsuura, A.; Tsukada, M.; Wada, Y.; Ohsumi, Y. "Apg1p, a novel protein kinase required for the autophagic process in *Saccharomyces cerevisiae*", **1997**, *Gene*, (192), 245-250.

73. Suzuki, K.; Ohsumi, Y. "Molecular machinery of autophagosome formation in yeast, *Saccharomyces cerevisiae*", **2007**, *FEBS Lett*, (581), 2156-2161.

74. Suzuki, K.; Ohsumi, Y. "Current knowledge of the pre-autophagosomal structure (PAS)", **2010**, *FEBS Lett*, (584), 1280-1286.

75. Mochida, K.; Ohsumi, Y.; Nakatogawa, H. "Hrr25 phosphorylates the autophagic receptor Atg34 to promote vacuolar transport of alpha-mannosidase under nitrogen starvation conditions", **2014**, *FEBS Lett*, (588), 3862-3869.

76. Lee, D.; Kim, I. Y.; Saha, S.; Choi, K. S. "Paraptosis in the anti-cancer arsenal of natural products", **2016**, *Pharmacol Ther*, (162), 120-133.

77. Sperandio, S.; de Belle, I.; Bredesen, D. E. "An alternative, nonapoptotic form of programmed cell death", **2000**, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, (97), 14376-14381.

78. Sperandio, S.; Poksay, K.; de Belle, I.; Lafuente, M. J.; Liu, B.; Nasir, J.; Bredesen, D. E. "Paraptosis: mediation by MAP kinases and inhibition by AIP-1/Alix", **2004**, Cell Death Differ, (11), 1066-1075.
79. Castedo, M.; Perfettini, J. L.; Roumier, T.; Valent, A.; Raslova, H.; Yakushijin, K.; Horne, D.; Feunteun, J.; Lenoir, G.; Medema, R.; Vainchenker, W.; Kroemer, G. "Mitotic catastrophe constitutes a special case of apoptosis whose suppression entails aneuploidy", **2004**, Oncogene, (23), 4362-4370.
80. Denisenko, T. V.; Sorokina, I. V.; Gogvadze, V.; Zhivotovsky, B. "Mitotic catastrophe and cancer drug resistance: A link that must to be broken", **2016**, Drug Resist Updat, (24), 1-12.
81. Vitale, I.; Galluzzi, L.; Castedo, M.; Kroemer, G. "Mitotic catastrophe: a mechanism for avoiding genomic instability", **2011**, Nat Rev Mol Cell Biol, (12), 385-392.
82. Hunter, J. "The works of John Hunter, F.R.S. with notes", **1835**, Palmer JF (Ed). London.
83. Turk, J. L. "Inflammation: John Hunter's "A treatise on the blood, inflammation and gun-shot wounds"", **1994**, Int J Exp Pathol, (75), 385-395.
84. Bagley, R. G. "Commentary on Folkman: "Tumor Angiogenesis Factor"", **2016**, Cancer Research, (76), 1673-1674.
85. Treps, L.; Gavard, J. "Tumor angiogenesis: when the Tree of Life turns bad", **2015**, Med Sci (Paris), (31), 989-995.
86. Hanahan, D.; Weinberg, R. A. "Retrospective: Judah Folkman (1933-2008)", **2008**, Science, (319), 1055.
87. Ribatti, D. "The Discovery of Tumor Angiogenesis Factors: A Historical Overview", **2016**, Methods Mol Biol, (1464), 1-12.
88. Hida, K.; Maishi, N.; Torii, C.; Hida, Y. "Tumor angiogenesis--characteristics of tumor endothelial cells", **2016**, Int J Clin Oncol, (21), 206-212.
89. Qian, C. N.; Tan, M. H.; Yang, J. P.; Cao, Y. "Revisiting tumor angiogenesis: vessel co-option, vessel remodeling, and cancer cell-derived vasculature formation", **2016**, Chin J Cancer, (35), 10.
90. Yadav, L.; Puri, N.; Rastogi, V.; Satpute, P.; Sharma, V. "Tumour Angiogenesis and Angiogenic Inhibitors: A Review", **2015**, J Clinic Diag Res : JCDR, (9), XE01-XE05.
91. Ribatti, D.; Nico, B.; Crivellato, E. "The development of the vascular system: a historical overview", **2015**, Methods Mol Biol, (1214), 1-14.
92. Baeriswyl, V.; Christofori, G. "The angiogenic switch in carcinogenesis", **2009**, Semin Cancer Biol, (19), 329-337.
93. Bickel, S. T.; Juliano, J. D.; Nagy, J. D. "Evolution of proliferation and the angiogenic switch in tumors with high clonal diversity", **2014**, PLoS ONE, (9), e91992.
94. Folkman, J.; Klagsbrun, M. "Angiogenic factors", **1987**, Science, (235), 442-447.
95. Gyenge, M.; Amagase, K.; Kunimi, S.; Matsuoka, R.; Takeuchi, K. "Roles of pro-angiogenic and anti-angiogenic factors as well as matrix metalloproteinases in healing of NSAID-induced small intestinal ulcers in rats", **2013**, Life Sciences, (93), 441-447.
96. Bouis, D.; Kusumanto, Y.; Meijer, C.; Mulder, N. H.; Hospers, G. A. P. "A review on pro- and anti-angiogenic factors as targets of clinical intervention", **2006**, Pharmacol Res, (53), 89-103.
97. Simons, M.; Gordon, E.; Claesson-Welsh, L. "Mechanisms and regulation of endothelial VEGF receptor signalling", **2016**, Nat Rev Mol Cell Biol, (17), 611-625.

98. Welts, J.; Loges, S.; Dimmeler, S.; Carmeliet, P. "Recent molecular discoveries in angiogenesis and antiangiogenic therapies in cancer", **2013**, J Clin Invest, (123), 3190-3200.
99. Khalid, A. "Matrix Metalloproteinases: New Targets in Cancer Therapy", **2016**, J Cancer Sci Therap, (8),
100. Van Hove, A. H.; Benoit, D. S. W. "Depot-Based Delivery Systems for Pro-Angiogenic Peptides: A Review", **2015**, Front Bioeng Biotechnol, (3), 102.
101. Gao, Q.; Chen, K.; Gao, L.; Zheng, Y.; Yang, Y.-G. "Thrombospondin-1 signaling through CD47 inhibits cell cycle progression and induces senescence in endothelial cells", **2016**, Cell Death Dis, (7), e2368.
102. Folkman, J. "Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis", **2002**, Semin Oncol, (29), 15-18.
103. Folkman, J. "Tumor angiogenesis: therapeutic implications", **1971**, N Engl J Med, (285), 1182-1186.
104. Poon, R. T.; Fan, S. T.; Wong, J. "Clinical implications of circulating angiogenic factors in cancer patients", **2001**, J Clin Oncol, (19), 1207-1225.
105. Cao, Y. "Future options of anti-angiogenic cancer therapy", **2016**, Chinese Journal of Cancer, (35), 21.
106. CancerResearch, **2016**, 23 Dec, 2016, <http://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/cancers-in-general/treatment/>
107. Ding, C.; Tong, L.; Feng, J.; Fu, J. "Recent Advances in Stimuli-Responsive Release Function Drug Delivery Systems for Tumor Treatment", **2016**, Molecules, (21), 1715.
108. Rosenberg, B.; Vancamp, L.; Krigas, T. "Inhibition of cell division in escherichia coli by electrolysis products from a platinum electrode", **1965**, Nature, (205), 698-699.
109. Rosenberg, B.; VanCamp, L.; Trosko, J. E.; Mansour, V. H. "Platinum compounds: a new class of potent antitumour agents", **1969**, Nature, (222), 385-386.
110. Hill, J. M.; Loeb, E.; MacLellan, A.; Hill, N. O.; Khan, A.; King, J. J. "Clinical studies of Platinum Coordination compounds in the treatment of various malignant diseases", **1975**, Cancer Chemother Rep, (59), 647-659.
111. Terenzi, A.; Pirker, C.; Keppler, B. K.; Berger, W. "Anticancer metal drugs and immunogenic cell death", **2016**, J Inorg Biochem, (165), 71-79.
112. Allardyce, C. S.; Dyson, P. J. "Metal-based drugs that break the rules", **2016**, Dalton Trans, (45), 3201-3209.
113. Hang, Z.; Cooper, M. A.; Ziora, Z. M. "Platinum-based anticancer drugs encapsulated liposome and polymeric micelle formulation in clinical trials", **2016**, Biochem Comp, (4), 1.
114. Dilruba, S.; Kalayda, G. V. "Platinum-based drugs: past, present and future", **2016**, Cancer Chem Pharmacol, (77), 1103-1124.
115. Dasari, S.; Tchounwou, P. B. "Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action", **2014**, Eur J Pharmacol, (0), 364-378.
116. Todd, R. C.; Lippard, S. J. "Structure of duplex DNA containing the cisplatin 1,2- $\{Pt(NH_3)_2\}_2$ -d(GpG) cross-link at 1.77 Å resolution", **2010**, Journal of Inorganic Biochemistry, (104), 902-908.

117. Rothenberg, M. L.; Oza, A. M.; Bigelow, R. H.; Berlin, J. D.; Marshall, J. L.; Ramanathan, R. K.; Hart, L. L.; Gupta, S.; Garay, C. A.; Burger, B. G.; Le Bail, N.; Haller, D. G. "Superiority of oxaliplatin and fluorouracil-leucovorin compared with either therapy alone in patients with progressive colorectal cancer after irinotecan and fluorouracil-leucovorin: interim results of a phase III trial", **2003**, J Clin Oncol, (21), 2059-2069.
118. Alberto, M. E.; Lucas, M. F.; Pavelka, M.; Russo, N. "The second-generation anticancer drug Nedaplatin: a theoretical investigation on the hydrolysis mechanism", **2009**, J Phys Chem B, (113), 14473-14479.
119. "Lobaplatin: D 19466", **2003**, Drugs R D, (4), 369-372.
120. Lee, K. H. et al. "Randomized, multicenter, phase III trial of heptaplatin 1-hour infusion and 5-fluorouracil combination chemotherapy comparing with cisplatin and 5-fluorouracil combination chemotherapy in patients with advanced gastric cancer", **2009**, Cancer Res Treat, (41), 12-18.
121. Zhu, H.; Luo, H.; Zhang, W.; Shen, Z.; Hu, X.; Zhu, X. "Molecular mechanisms of cisplatin resistance in cervical cancer", **2016**, Drug Design, Development and Therapy, (10), 1885-1895.
122. Aoyama, K.; Nakaki, T. "Glutathione in Cellular Redox Homeostasis: Association with the Excitatory Amino Acid Carrier 1 (EAAC1)", **2015**, Molecules, (20), 8742.
123. Johnstone, T. C.; Suntharalingam, K.; Lippard, S. J. "The Next Generation of Platinum Drugs: Targeted Pt(II) Agents, Nanoparticle Delivery, and Pt(IV) Prodrugs", **2016**, Chemical reviews, (116), 3436-3486.
124. Kelland, L. R.; Abel, G.; McKeage, M. J.; Jones, M.; Goddard, P. M.; Valenti, M.; Murrer, B. A.; Harrap, K. R. "Preclinical antitumor evaluation of bis-acetato-ammine-dichloro-cyclohexylamine platinum(IV): an orally active platinum drug", **1993**, Cancer Res, (53), 2581-2586.
125. Raynaud, F. I.; Mistry, P.; Donaghue, A.; Poon, G. K.; Kelland, L. R.; Barnard, C. F.; Murrer, B. A.; Harrap, K. R. "Biotransformation of the platinum drug JM216 following oral administration to cancer patients", **1996**, Cancer Chemother Pharmacol, (38), 155-162.
126. Rose, W. C.; Schurig, J. E.; Huftalen, J. B.; Bradner, W. T. "Antitumor activity and toxicity of cisplatin analogs", **1982**, Cancer Treat Rep, (66), 135-146.
127. Schilder, R. J.; LaCreta, F. P.; Perez, R. P.; Johnson, S. W.; Brennan, J. M.; Rogatko, A.; Nash, S.; McAleer, C.; Hamilton, T. C.; Roby, D.; et al. "Phase I and pharmacokinetic study of ormaplatin (tetraplatin, NSC 363812) administered on a day 1 and day 8 schedule", **1994**, Cancer Res, (54), 709-717.
128. O'Rourke, T. J.; Weiss, G. R.; New, P.; Burris, H. A., 3rd; Rodriguez, G.; Eckhardt, J.; Hardy, J.; Kuhn, J. G.; Fields, S.; Clark, G. M.; et al. "Phase I clinical trial of ormaplatin (tetraplatin, NSC 363812)", **1994**, Anticancer Drugs, (5), 520-526.
129. Tutsch, K. D.; Arzoomanian, R. Z.; Alberti, D.; Tombes, M. B.; Feierabend, C.; Robins, H. I.; Spriggs, D. R.; Wilding, G. "Phase I clinical and pharmacokinetic study of an one-hour infusion of ormaplatin (NSC 363812)", **1999**, Invest New Drugs, (17), 63-72.
130. Pendyala, L.; Arakali, A. V.; Sansone, P.; Cowens, J. W.; Creaven, P. J. "DNA binding of iproplatin and its divalent metabolite cis-dichloro-bis-isopropylamine platinum (II)", **1990**, Cancer Chemother Pharmacol, (27), 248-250.
131. Volckova, E.; Weaver, E.; Bose, R. N. "Insight into the reactive form of the anticancer agent iproplatin", **2008**, Eur J Med Chem, (43), 1081-1084.
132. Shaili, E. "Platinum anticancer drugs and photochemotherapeutic agents: recent advances and future developments", **2014**, Sci Prog, (97), 20-40.

133. Bednarski, P. J.; Mackay, F. S.; Sadler, P. J. "Photoactivatable platinum complexes", **2007**, *Anticancer Agents Med Chem*, (7), 75-93.
134. Kratochwil, N. A.; Bednarski, P. J.; Mrozek, H.; Vogler, A.; Nagle, J. K. "Photolysis of an iodoplatinum(IV) diamine complex to cytotoxic species by visible light", **1996**, *Anticancer Drug Des*, (11), 155-171.
135. Kratochwil, N. A.; Zabel, M.; Range, K. J.; Bednarski, P. J. "Synthesis and X-ray crystal structure of *trans,cis*-[Pt(OAc)₂I₂(en)]: a novel type of cisplatin analog that can be photolyzed by visible light to DNA-binding and cytotoxic species in vitro", **1996**, *J Med Chem*, (39), 2499-2507.
136. Motswainyana, W. M.; Ajibade, P. A. "Anticancer Activities of Mononuclear Ruthenium(II) Coordination Complexes", **2015**, *Advan Chem*, (2015), 21.
137. Mohammad, A.; Farheen, S.; Amir, A. "Ruthenium Complexes: An Emerging Ground to the Development of Metallopharmaceuticals for Cancer Therapy", **2016**, *Mini-Rev Med Chem*, (16), 772-786.
138. Gransbury, G. K.; Kappen, P.; Glover, C. J.; Hughes, J. N.; Levina, A.; Lay, P. A.; Musgrave, I. F.; Harris, H. H. "Comparison of KP1019 and NAMI-A in tumour-mimetic environments", **2016**, *Metallomics*, (8), 762-773.
139. Trondl, R.; Heffeter, P.; Kowol, C. R.; Jakupec, M. A.; Berger, W.; Keppler, B. K. "NKP-1339, the first ruthenium-based anticancer drug on the edge to clinical application", **2014**, *Chem Sci*, (5), 2925-2932.
140. Jovanovic, K. K.; Gligorijevic, N.; Gaur, R.; Mishra, L.; Radulovic, S. "Anticancer activity of two ruthenium(II)-DMSO-chalcone complexes: Comparison of cytotoxic, pro-apoptotic and antimetastatic potential", **2016**, *J buon*, (21), 482-490.
141. Liu, P.; Jia, J.; Zhao, Y.; Wang, K. Z. "Recent Advances on Dark and Light-Activated Cytotoxicity of Imidazole-Containing Ruthenium Complexes", **2016**, *Mini Rev Med Chem*, (16), 272-289.
142. Spreckelmeyer, S.; Orvig, C.; Casini, A. "Cellular transport mechanisms of cytotoxic metalldrugs: an overview beyond cisplatin", **2014**, *Molecules*, (19), 15584-15610.
143. Biersack, B. "Anticancer Activity and Modes of Action of (arene) ruthenium(II) Complexes Coordinated to C-, N-, and O-ligands", **2016**, *Mini Rev Med Chem*, (16), 804-814.
144. Timerbaev, A. R. "Role of metallomic strategies in developing ruthenium anticancer drugs", **2016**, *TrAC Trends in Anal Chem*, (80), 547-554.
145. O'Riley, H. A.; Levina, A.; Aitken, J. B.; Lay, P. A. "Synthesis, reactivities and anti-cancer properties of ruthenium(II) complexes with a thiaether macrocyclic ligand", **2017**, *Acta Inorg Chem*, (454), 128-138.
146. Ang, W. H.; Dyson, P. J. "Classical and Non-Classical Ruthenium-Based Anticancer Drugs: Towards Targeted Chemotherapy (*Eur. J. Inorg. Chem.* 20/2006)", **2006**, *Eur J Inorg Chem*, (2006), 3993-3993.
147. Jakupec, M. A.; Galanski, M.; Arion, V. B.; Hartinger, C. G.; Keppler, B. K. "Antitumour metal compounds: more than theme and variations", **2008**, *Dalton Trans*, 183-194.
148. Noffke, A. L.; Habtemariam, A.; Pizarro, A. M.; Sadler, P. J. "Designing organometallic compounds for catalysis and therapy", **2012**, *Chem Commun*, (48), 5219-5246.
149. Aird, R. E.; Cummings, J.; Ritchie, A. A.; Muir, M.; Morris, R. E.; Chen, H.; Sadler, P. J.; Jodrell, D. I. "In vitro and in vivo activity and cross resistance profiles of novel ruthenium (II) organometallic arene complexes in human ovarian cancer", **2002**, *Br J Cancer*, (86), 1652-1657.

150. Hartinger, C. G.; Metzler-Nolte, N.; Dyson, P. J. "Challenges and Opportunities in the Development of Organometallic Anticancer Drugs", **2012**, *Organometallics*, (31), 5677-5685.
151. Nowak-Sliwinska, P.; van Beijnum, J. R.; Casini, A.; Nazarov, A. A.; Wagnieres, G.; van den Bergh, H.; Dyson, P. J.; Griffioen, A. W. "Organometallic ruthenium(II) arene compounds with antiangiogenic activity", **2011**, *J Med Chem*, (54), 3895-3902.
152. Dyson, P.; Google Patents: 2002.
153. Damaghi, M.; Wojtkowiak, J. W.; Gillies, R. J. "pH sensing and regulation in cancer", **2013**, *Front Physiol*, (4), 370.
154. Swietach, P.; Vaughan-Jones, R. D.; Harris, A. L.; Hulikova, A. "The chemistry, physiology and pathology of pH in cancer", **2014**, *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biol Sci*, (369), 1638.
155. Scolaro, C.; Bergamo, A.; Brescacin, L.; Delfino, R.; Cocchietto, M.; Laurenczy, G.; Geldbach, T. J.; Sava, G.; Dyson, P. J. "In vitro and in vivo evaluation of ruthenium(II)-arene PTA complexes", **2005**, *J Med Chem*, (48), 4161-4171.
156. Rojas, S.; Carmona, F. J.; Maldonado, C. R.; Barea, E.; Navarro, J. A. R. "RAPTA-C incorporation and controlled delivery from MIL-100(Fe) nanoparticles", **2016**, *New J Chem*, (40), 5690-5694.
157. Ang, W. H.; Casini, A.; Sava, G.; Dyson, P. J. "Organometallic ruthenium-based antitumor compounds with novel modes of action", **2011**, *J Organomet Chem*, (696), 989-998.
158. Lu, L.; Liu, L.-J.; Chao, W.-c.; Zhong, H.-J.; Wang, M.; Chen, X.-P.; Lu, J.-J.; Li, R.-n.; Ma, D.-L.; Leung, C.-H. "Identification of an iridium(III) complex with anti-bacterial and anti-cancer activity", **2015**, *Sci Rep*, (5), 14544.
159. Liu, Z.; Sadler, P. J. "Organoiridium complexes: anticancer agents and catalysts", **2014**, *Acc Chem Res*, (47), 1174-1185.
160. Yellol, J.; Perez, S. A.; Buceta, A.; Yellol, G.; Donaire, A.; Szumlas, P.; Bednarski, P. J.; Makhloufi, G.; Janiak, C.; Espinosa, A.; Ruiz, J. "Novel C,N-Cyclometalated Benzimidazole Ruthenium(II) and Iridium(III) Complexes as Antitumor and Antiangiogenic Agents: A Structure-Activity Relationship Study", **2015**, *J Med Chem*, (58), 7310-7327.
161. Ritacco, I.; Russo, N.; Sicilia, E. "DFT Investigation of the Mechanism of Action of Organoiridium(III) Complexes As Anticancer Agents", **2015**, *Inorg Chem*, (54), 10801-10810.
162. Liu, Z.; Romero-Canelon, I.; Habtemariam, A.; Clarkson, G. J.; Sadler, P. J. "Potent Half-Sandwich Iridium(III) Anticancer Complexes Containing CwedgeN-Chelated and Pyridine Ligands", **2014**, *Organometallics*, (33), 5324-5333.
163. Liu, Z.; Romero-Canelon, I.; Qamar, B.; Hearn, J. M.; Habtemariam, A.; Barry, N. P.; Pizarro, A. M.; Clarkson, G. J.; Sadler, P. J. "The potent oxidant anticancer activity of organoiridium catalysts", **2014**, *Angew Chem Int Ed Engl*, (53), 3941-3946.
164. Yellol, J.; Perez, S. A.; Yellol, G.; Zajac, J.; Donaire, A.; Viguera, G.; Novohradsky, V.; Janiak, C. "Highly potent extranuclear-targeted luminescent iridium(III) antitumor agents containing benzimidazole-based ligands with a handle for functionalization", **2016**, *Chem Commun*, (52), 14165-14168.
165. Cutillas, N.; Yellol, G. S.; de Haro, C.; Vicente, C.; Rodríguez, V.; Ruiz, J. "Anticancer cyclometalated complexes of platinum group metals and gold", **2013**, *Coord Chem Rev*, (257), 2784-2797.
166. Li, Y.; Tan, C. P.; Zhang, W.; He, L.; Ji, L. N.; Mao, Z. W. "Phosphorescent iridium(III)-bis-N-heterocyclic carbene complexes as mitochondria-targeted theranostic and photodynamic anticancer agents", **2015**, *Biomaterials*, (39), 95-104.

167. Kang, T. S.; Mao, Z.; Ng, C. T.; Wang, M.; Wang, W.; Wang, C.; Lee, S. M.; Wang, Y.; Leung, C. H.; Ma, D. L. "Identification of an Iridium(III)-Based Inhibitor of Tumor Necrosis Factor- α ", **2016**, *J Med Chem*, (59), 4026-4031.
168. Zhang, C.; Lai, S. H.; Zeng, C. C.; Tang, B.; Wan, D.; Xing, D. G.; Liu, Y. J. "The induction of apoptosis in SGC-7901 cells through the ROS-mediated mitochondrial dysfunction pathway by a Ir(III) complex", **2016**, *J Biol Inorg Chem*, (21), 1047-1060.
169. Vitaku, E.; Smith, D. T.; Njardarson, J. T. "Analysis of the structural diversity, substitution patterns, and frequency of nitrogen heterocycles among U.S. FDA approved pharmaceuticals", **2014**, *J Med Chem*, (57), 10257-10274.
170. Yellol, G. S.; Yellol, J. G.; Kenche, V. B.; Liu, X. M.; Barnham, K. J.; Donaire, A.; Janiak, C.; Ruiz, J. "Synthesis of 2-pyridyl-benzimidazole iridium(III), ruthenium(II), and platinum(II) complexes. study of the activity as inhibitors of amyloid-beta aggregation and neurotoxicity evaluation", **2015**, *Inorg Chem*, (54), 470-475.
171. Hisamatsu, Y.; Shibuya, A.; Suzuki, N.; Suzuki, T.; Abe, R.; Aoki, S. "Design and Synthesis of Amphiphilic and Luminescent Tris-Cyclometalated Iridium(III) Complexes Containing Cationic Peptides as Inducers and Detectors of Cell Death via a Calcium-Dependent Pathway", **2015**, *Bioconjug Chem*, (26), 857-879.
172. Kean, W. F.; Forestier, F.; Kassam, Y.; Buchanan, W. W.; Rooney, P. J. "The history of gold therapy in rheumatoid disease", **1985**, *Semin Arthritis Rheum*, (14), 180-186.
173. Forestier, J. "Rheumatoid arthritis and its treatment by gold salts", **1934**, *The Lancet*, (224), 646-648.
174. Higby, G. J. "Gold in medicine: a review of its use in the West before 1900", **1982**, *Gold Bull*, (15), 130-140.
175. Fricker, S. P. 2009. Medicinal Chemistry of Gold Compounds. Patai's Chemistry of Functional Groups.
176. Richter, M. B.; Kinsella, P.; Corbett, M. "Gold in psoriatic arthropathy", **1980**, *Ann Rheum Dis*, (39), 279-280.
177. Chaves, J. D.; Tunes, L. G.; de, J. F. C. H.; Francisco, T. M.; Correa, C. C.; Murta, S. M.; Monte-Neto, R. L.; Silva, H.; Fontes, A. P.; de Almeida, M. V. "Novel gold(I) complexes with 5-phenyl-1,3,4-oxadiazole-2-thione and phosphine as potential anticancer and antileishmanial agents", **2016**, *Eur J Med Chem*,
178. Altaf, M.; Monim-UI-Mehboob, M.; Kawde, A. N.; Corona, G.; Larcher, R.; Ogasawara, M.; Casagrande, N.; Celegato, M.; Borghese, C.; Siddik, Z. H.; Aldinucci, D.; Isab, A. A. "New bipyridine gold(III) dithiocarbamate-containing complexes exerted a potent anticancer activity against cisplatin-resistant cancer cells independent of p53 status", **2016**, *Oncotarget*, 490-505.
179. Garcia-Moreno, E.; Gascon, S.; Garcia de Jalon, J. A.; Romanos, E.; Rodriguez-Yoldi, M. J.; Cerrada, E.; Laguna, M. "In Vivo Anticancer Activity, Toxicology and Histopathological Studies of the Thiolate Gold(I) Complex [Au(Spyrimidine)(PTA-CH₂Ph)]Br", **2015**, *Anticancer Agents Med Chem*, (15), 773-782.
180. Zou, T.; Lum, C. T.; Lok, C. N.; Zhang, J. J.; Che, C. M. "Chemical biology of anticancer gold(III) and gold(I) complexes", **2015**, *Chem Soc Rev*, (44), 8786-8801.
181. Rackham, O.; Nichols, S. J.; Leedman, P. J.; Berners-Price, S. J.; Filipovska, A. "A gold(I) phosphine complex selectively induces apoptosis in breast cancer cells: Implications for anticancer therapeutics targeted to mitochondria", **2007**, *Biochem Pharmacol*, (74), 992-1002.
182. Chaves, J. D. S.; Neumann, F.; Francisco, T. M.; Corrêa, C. C.; Lopes, M. T. P.; Silva, H.; Fontes, A. P. S.; de Almeida, M. V. "Synthesis and cytotoxic activity of gold(I) complexes containing

phosphines and 3-benzyl-1,3-thiazolidine-2-thione or 5-phenyl-1,3,4-oxadiazole-2-thione as ligands", **2014**, Acta Inorg Chem, (414), 85-90.

183. Ott, I. "On the medicinal chemistry of gold complexes as anticancer drugs", **2009**, Coor Chem Rev, (253), 1670-1681.

184. Bostancioglu, R. B.; Kaya, M.; Koparal, A. T.; Benkli, K. "Gold(III) compounds-mediated inhibition of lung cancer cell proliferation", **2016**, Anticancer Drugs, (27), 225-234.

185. Ortego, L.; Cardoso, F.; Martins, S.; Fillat, M. F.; Laguna, A.; Meireles, M.; Villacampa, M. D.; Gimeno, M. C. "Strong inhibition of thioredoxin reductase by highly cytotoxic gold(I) complexes. DNA binding studies", **2014**, J Inorg Biochem, (130), 32-37.

186. Bindoli, A.; Rigobello, M. P.; Scutari, G.; Gabbiani, C.; Casini, A.; Messori, L. "Thioredoxin reductase: A target for gold compounds acting as potential anticancer drugs", **2009**, Coor Chem Rev, (253), 1692-1707.

187. Nobili, S.; Mini, E.; Landini, I.; Gabbiani, C.; Casini, A.; Messori, L. "Gold compounds as anticancer agents: chemistry, cellular pharmacology, and preclinical studies", **2010**, Med Res Rev, (30), 550-580.

188. Li, H. et al. "Auranofin-mediated inhibition of PI3K/AKT/mTOR axis and anticancer activity in non-small cell lung cancer cells", **2016**, Oncotarget, (7), 3548-3558.

189. Kopf, H.; Kopf-Maier, P. "Titanocene dichloride--the first metallocene with cancerostatic activity", **1979**, Angew Chem Int Ed Engl, (18), 477-478.

190. Green, M. L. H.; Lucas, C. R. "Some *d* bis-*n*-cyclopentadienyl titanium complexes with nitrogen or phosphorus ligands", **1972**, Dalton Trans, 1000-1003.

191. Mross, K.; Robben-Bathe, P.; Edler, L.; Baumgart, J.; Berdel, W. E.; Fiebig, H.; Unger, C. "Phase I Clinical Trial of a Day-1, -3, -5 Every 3 Weeks Phase I Clinical Trial of Day-1, -3, -5 Every 3 Weeks Schedule with Titanocene Dichloride (MKT 5) in Patients with Advanced Cancer. (Phase I Study Group of the AIO of the German Cancer Society)", **2000**, Onkologie, (23), 576-579.

192. Kopf-Maier, P. "Complexes of metals other than platinum as antitumour agents", **1994**, Eur J Clin Pharmacol, (47), 1-16.

193. Kröger, N. K., U.R.; Mross, K.; Edler, L.; Hossfeld, D.K. "Phase II Clinical Trial of Titanocene Dichloride in Patients with Metastatic Breast Cancer", **2000**, Onkologie, (23), 60-62.

194. de la Cueva-Alique, I.; Muñoz-Moreno, L.; Benabdelouahab, Y.; Elie, B. T.; El Amrani, M. A.; Mosquera, M. E. G.; Contel, M.; Bajo, A. M.; Cuenca, T.; Royo, E. "Novel enantiopure cyclopentadienyl Ti(IV) oximate compounds as potential anticancer agents", **2016**, J Inor Biochem, (156), 22-34.

195. Miller, M.; Braitbard, O.; Hochman, J.; Tshuva, E. Y. "Insights into molecular mechanism of action of salan titanium(IV) complex with *in vitro* and *in vivo* anticancer activity", **2016**, J Inorg Biochem, (163), 250-257.

196. Collier, W. A. **1929**, Z Hygiene Infektioner, (110), 169-174.

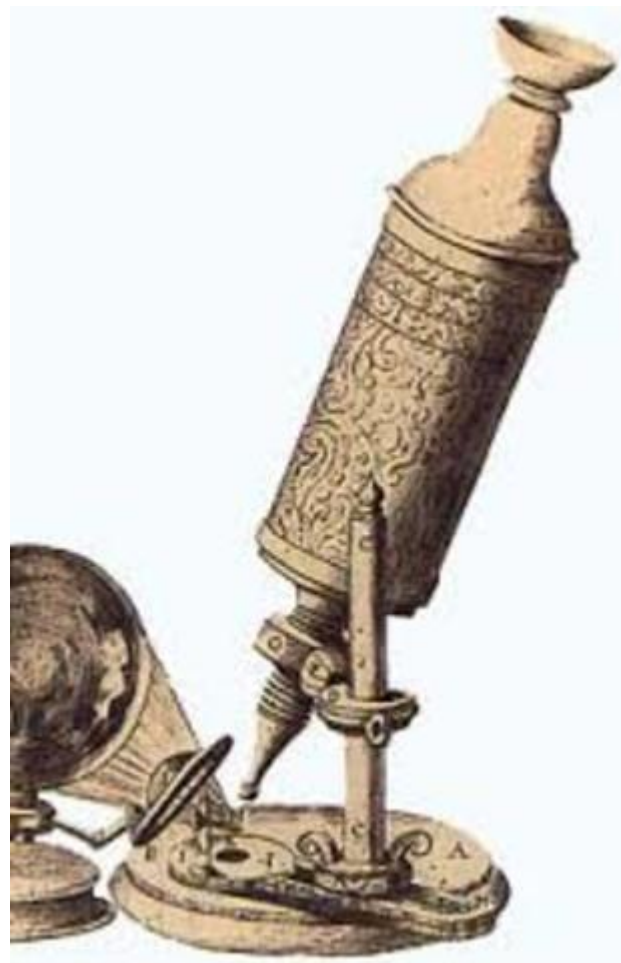
197. Crowe, A. J.; Smith, P. J.; Atassi, G. "Investigations into the antitumour activity of organotin compounds. I. Diorganotin dihalide and di-pseudohalide complexes", **1980**, Chem Biol Interact, (32), 171-178.

198. Hong, M.; Chang, G.; Li, R.; Niu, M. "Anti-proliferative activity and DNA/BSA interactions of five mono- or di-organotin(IV) compounds derived from 2-hydroxy-N[prime or minute]-[(2-hydroxy-3-methoxyphenyl)methylidene]-benzohydrazone", **2016**, New J Chem, (40), 7889-7900.

199. Li, Q.; Yang, P.; Wang, H.; Guo, M. "Diorganotin(IV) antitumor agent. (C₂H₅)₂SnCl₂ (phen)/nucleotides aqueous and solid-state coordination chemistry and its DNA binding studies", **1996**, J Inorg Biochem, (64), 181-195.
200. Bernstein, L. R. "Mechanisms of therapeutic activity for gallium", **1998**, Pharmacol Rev, (50), 665-682.
201. Cao, S.; Chen, X.; Chen, L.; Chen, J. "Alpha(N)-Heterocyclic Thiosemicarbazones: Iron Chelators That Are Promising for Revival of Gallium in Cancer Chemotherapy", **2016**, Anticancer Agents Med Chem, 973-991.
202. Kaluderovic, M. R.; Mojic, M.; Gomez-Ruiz, S.; Mijatovic, S.; Maksimovic-Ivanic, D. "Anticancer Activity of Organogallium(III) Complexes in Colon Cancer Cells", **2016**, Anticancer Agents Med Chem, (16), 359-364.
203. Min, Y.; Caster, J. M.; Eblan, M. J.; Wang, A. Z. "Clinical Translation of Nanomedicine", **2015**, Chem Rev, (115), 11147-11190. Int. J. Nanomedicine, (1), 115-116.
205. Hong, G.; Diao, S.; Antaris, A. L.; Dai, H. "Carbon Nanomaterials for Biological Imaging and Nanomedicinal Therapy", **2015**, Chem Rev, (115), 10816-10906.
206. Haume, K.; Rosa, S.; Grellet, S.; Śmiałek, M. A.; Butterworth, K. T.; Solov'yov, A. V.; Prise, K. M.; Golding, J.; Mason, N. J. "Gold nanoparticles for cancer radiotherapy: a review", **2016**, Cancer Nanotechnol, (7), 8.
207. Fathi Karkan, S.; Mohammadhosseini, M.; Panahi, Y.; Milani, M.; Zarghami, N.; Akbarzadeh, A.; Abasi, E.; Hosseini, A.; Davaran, S. "Magnetic nanoparticles in cancer diagnosis and treatment: a review", **2017**, Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology, (45), 1-5.
208. Sercombe, L.; Veerati, T.; Moheimani, F.; Wu, S. Y.; Sood, A. K.; Hua, S. "Advances and Challenges of Liposome Assisted Drug Delivery", **2015**, Front Pharmacol, (6), 286.
209. Lin, W. "Introduction: Nanoparticles in Medicine", **2015**, Chem Rev, (115), 10407-10409.
210. Wang, Y.; Kim, H. J.; Vunjak-Novakovic, G.; Kaplan, D. L. "Stem cell-based tissue engineering with silk biomaterials", **2006**, Biomaterials, (27), 6064-6082.
211. Mottaghitalab, F.; Farokhi, M.; Shokrgozar, M. A.; Atyabi, F.; Hosseinkhani, H. "Silk fibroin nanoparticle as a novel drug delivery system", **2015**, J Control Release, (206), 161-176.
212. Sun, T.; Zhang, Y. S.; Pang, B.; Hyun, D. C.; Yang, M.; Xia, Y. "Engineered nanoparticles for drug delivery in cancer therapy", **2014**, Angew Chem Int Ed (53), 12320-12364
213. Bannunah, A. M.; Villasaliu, D.; Lord, J.; Stolnik, S. "Mechanisms of Nanoparticle Internalization and Transport Across an Intestinal Epithelial Cell Model: Effect of Size and Surface Charge", **2014**, Mol Phar, (11), 4363-4373.
214. Desai, M. P.; Labhasetwar, V.; Amidon, G. L.; Levy, R. J. "Gastrointestinal uptake of biodegradable microparticles: effect of particle size", **1996**, Pharm Res, (13), 1838-1845.
215. Lozano-Pérez, A. A.; Montalbán, M. G.; Aznar-Cervantes, S. D.; Cragolini, F.; Cenis, J. L.; Villora, G. "Production of silk fibroin nanoparticles using ionic liquids and high-power ultrasounds", **2015**, J Appli Pol Sci, (132), 1-8.

Capítulo 2

Materiales y Métodos



2.1. Compuestos

Los compuestos estudiados en la presente Tesis han sido sintetizados por el Grupo de Metalofármacos del Departamento de Química Inorgánica de la Universidad de Murcia. En cada uno de los Capítulos de Resultados se citan los miembros específicos de dicho Grupo que han participado en la síntesis y caracterización química de cada uno de los compuestos.

Estos complejos son metalofármacos anticancerígenos no convencionales de metales de la segunda y tercera serie de transición. Más concretamente, de platino(II), platino(IV), rutenio(II), iridio(III) y oro(I). Al principio de cada uno de los Capítulos se etiquetan todos los compuestos analizados en ellos.

2.2. Líneas celulares

Las líneas celulares con las que se ha realizado el presente estudio se obtuvieron de la *American Type Tissue Culture Collection* (ATCC) salvo en los casos específicos indicados.

Todos los experimentos se realizaron en cabinas de seguridad de nivel II en las instalaciones del Servicio de Apoyo a la Investigación (SAI), Sección Cultivo de Tejidos de la Universidad de Murcia. Todos los materiales y reactivos utilizados eran previamente esterilizados.

En los siguientes subapartados se indican el origen y características de las líneas celulares empleadas la siguiente Tesis. En la Tabla 2.1 se resumen estos datos.

Tabla 2.1. Resumen de las líneas tumorales empleadas en esta Tesis.

Tipo de línea	Origen	Nombre	Capítulo Tesis
No neoplásica	Riñón de cerdo	LLC-PK1	4 y 7
No neoplásica	Riñón de mono	BGM	5C, 6A,6B y 6C
No neoplásica	Endotelial humana	EA.hy926	4, 5B, 6A, 6B
Tumoral	Mama humana	MDA-MB-231	4, 5C, 6B y 7
Tumoral	Mama humana	SK-BR-3	4 y 7
Tumoral	Mama humana	MCF-7	4, 5C, 6B, 6C y 7
Tumoral	Mama, rata	ELA	5
Tumoral	Ovario humana	A2780	4, 5A, 5B, 5C, 6A, 6B, 6C y 7
Tumoral	Ovario humana	A2780cis	5A, 5B, 5C, 6A, 6B, 6C y 7
Tumoral	Vejiga humana	5637	5B
Tumoral	Pulmón humano	A427	5B
Tumoral	Pulmón humano	LCLC-103H	5B
Tumoral	Cérvix humano	SISO	5B
Tumoral	Colon humano	HT-29	5B

Las células se mantenían en los medios de cultivo indicados en cada apartado posterior. A todos ellos se les suplementaba, excepto que se indique explícitamente lo contrario, 10 % de Suero Bovino Fetal inactivado (SBF), glutamina (Gln) 2 mM y antibióticos penicilina/estreptomicina (P/S) al 1 %.

En todos los cultivos la temperatura de incubación era de 37 °C en una atmósfera húmeda. El porcentaje de CO₂ variaba en función de la línea celular, tal y como se indica en cada caso. Los medios de cultivo de todas las líneas celulares se cambiaban 2 veces por semana. En todos los estudios realizados con líneas celulares, estas se encontraban libres de micoplasma, según se determinó el método de tinción con el ADN de Hoechst.¹

2.2.1. Líneas celulares no neoplásicas

2.2.1.1. De riñón de cerdo, LLC-PK1

Para los ensayos de nefrotoxicidad se utilizó la línea celular LLC-PK1, derivada de riñón de cerdo (Figura 2.1).

Esta línea se mantenía en medio M199 suplementado con Suero Bovino Fetal (SBF) en este caso al 3 %, en un incubador de atmósfera húmeda controlada con 5 % de CO₂.

2.2.1.2. De riñón de mono, BGM

Línea celular derivada de riñón de mono verde africano. También usada para los ensayos de nefrotoxicidad (Figura 2.1). Esta línea se mantenía en cultivo con Medio Mínimo Esencial modificado de Dulbecco (DMEM), con 1 g/L glucosa, sin rojo fenol, con los suplementos antes mencionados más 2 mM de piruvato sódico y en atmósfera húmeda controlada con un 7,5-10 % de CO₂.

2.2.1.3. Endoteliales humanas, EA.hy926.

Se utilizaron células endoteliales inmortalizadas EA.hy926 (Figura 2.1), provenientes de un hibridoma entre células endoteliales de vena de cordón umbilical (HUVECs) con células de carcinoma de pulmón A549.

Estas células se mantuvieron con DMEM 1g/L de glucosa en las condiciones anteriormente descritas, 7,5-10 % de CO₂.

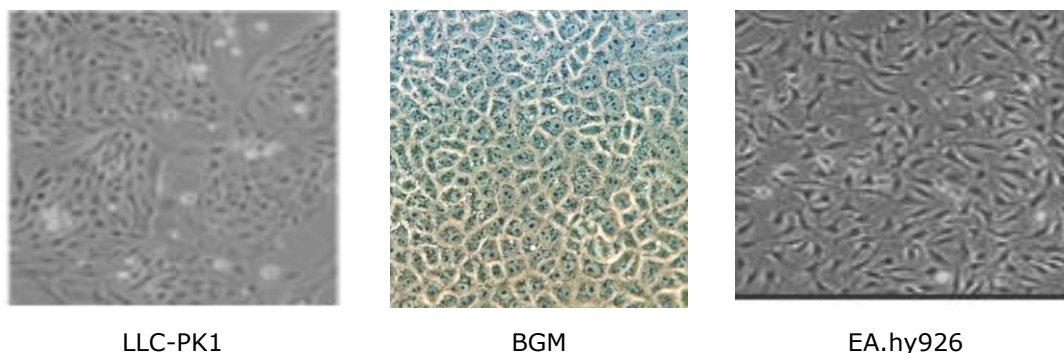


Figura 2.1. Líneas celulares no neoplásicas.

2.2.2. Líneas celulares tumorales

2.2.2.1. Tumor de mama

Se utilizaron tres líneas celulares tumorales de mama con diferentes fenotipos.

Todas ellas se mantenían en DMEM 1 g/L glucosa suplementado como se indica en el apartado anterior (7,5-10 %).

a) MDA-MB-231

Línea celular tumoral de mama triple negativo (Figura 2.2), según la clasificación indicada previamente (ver 2.1. de Introducción). Esta línea no expresa los receptores de estrógeno y progesterona, ni sobreexpresión de HER2. Se obtiene de adenocarcinoma metastásico con morfología epitelial.

b) SK-BR-3

Línea celular tumoral de mama con sobreexpresión del gen HER2 (Figura 2.2). No posee receptores hormonales. Se obtiene de adenocarcinoma metastásico con morfología epitelial.

c) MCF-7

Línea celular tumoral de mama hormonosensible (Figura 2.2), con expresión de receptores de estrógenos y progesterona, sin expresión de HER2. Se obtiene de adenocarcinoma metastásico con morfología epitelial.

d) Ehrlich-Lette ascitos (ELA)

Línea celular derivada de una neoplasia maligna de glándula mamaria de ratón (Figura 2.2). Estas células se mantenían y cultivaron en medio RPMI-1640 suplementado (5 % de CO₂).

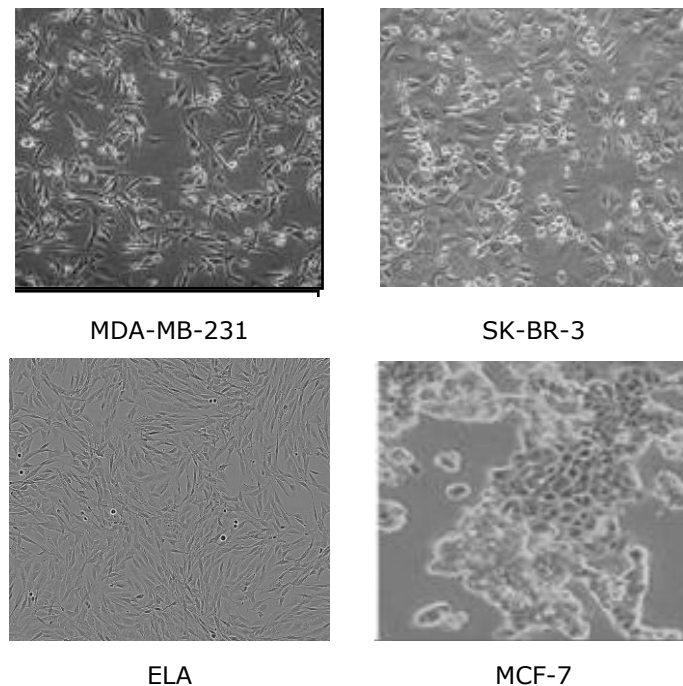


Figura 2.2. Células tumorales de mama.

2.2.2.2. Tumor de ovario

Las líneas celulares de carcinoma ovárico se obtenían de la *European Collection of Animal Cell Culture* (ECACC, Salisbury, U.K.).

a) A2780

Línea celular derivada del tejido de un carcinoma ovárico de un paciente humano no tratado (Figura 2.3). Estas células se mantuvieron y cultivaron en RPMI-1640 suplementado en un incubador de atmósfera húmeda controlada 5 % de CO₂.

b) A2780cis

Esta línea celular resistente al cisplatino se desarrolló mediante la exposición crónica de la línea celular madre A2780 sensible al cisplatino a concentraciones crecientes de cisplatino (Figura 2.3). A2780cis también es resistente al melfalán, adriamicina y a la irradiación. Se ha observado una mayor capacidad para reparar daño al ADN, así como anomalías citogenéticas. Con el fin de mantener la resistencia a cisplatino, se añadía al medio de cultivo 1 μ M de cisplatino durante 24h cada 2-3 pases.

Se mantenía y cultivaba en RPMI-1640 suplementado (5 % de CO₂).

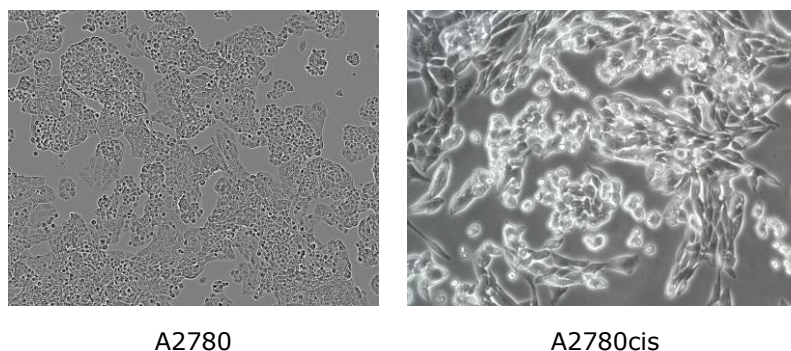
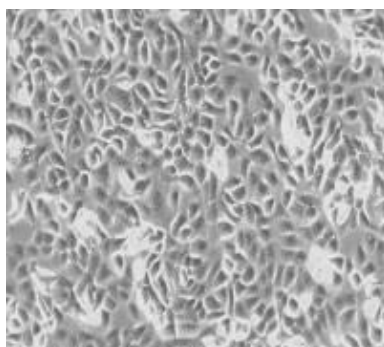


Figura 2.3. Células tumorales de ovario.

2.2.2.3. Tumor de vejiga urinaria, 5637

Línea celular derivada de un carcinoma grado II de vejiga urinaria de un paciente humano (Figura 2.4). Estas células se mantenían y cultivaban en RPMI-1640 suplementado (atmósfera húmeda controlada del 5 % del CO₂).



5637

Figura 2.4. Células tumorales de vejiga urinaria.

2.2.2.4. Tumor de pulmón

a) A427

Línea celular derivada de adenocarcinoma de pulmón humano (Figura 2.5). Estas células se mantenían y cultivaban en RPMI-1640 suplementado (5 % de CO₂).

b) LCLC-103H

Línea celular derivada de carcinoma de pulmón humano de células no pequeñas, derivadas de zona metastásica (pleura) (Figura 2.5). Estas células se mantenían y cultivaban en RPMI-1640 suplementado (atmósfera húmeda controlada 5 % de CO₂).

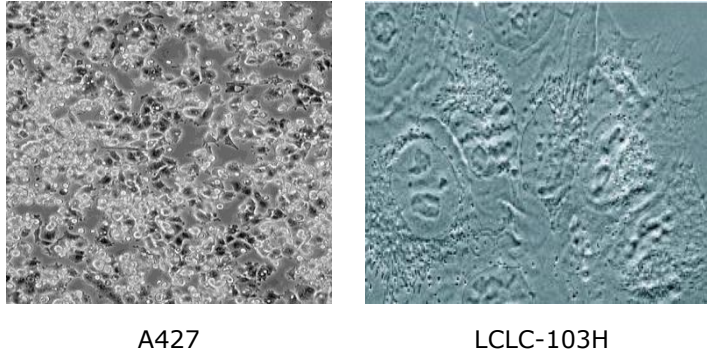
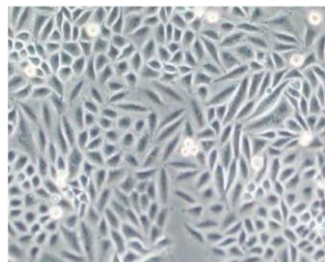


Figura 2.5. Células tumorales de pulmón

2.2.2.5. Tumor de cérvix, SISO

Línea celular derivada de un adenocarcinoma de cérvix humano resistente a la quimioterapia por medio de cirugía (Figura 2.6). Estas células se mantenían y cultivaban en RPMI-1640 suplementado (5 % de CO₂).

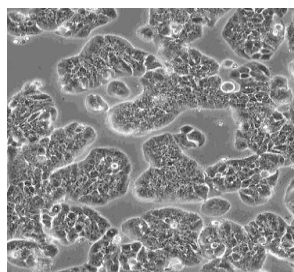


SISO

Figura 2.6. Células tumorales de cérvix.

2.2.2.6. Tumor de colon, HT-29

Línea celular derivada de un adenocarcinoma de colon humano grado II moderadamente diferenciado (Figura 2.7). Estas células se mantenían y cultivaban en DMEM 4.5 g/L glucosa suplementado (7,5 %-10 % de CO₂).



HT-29

Figura 2.7. Células tumorales de colon.

2.3. Subcultivos

Las líneas celulares se encontraban en diferentes incubadores según el porcentaje de CO₂ que requerían, en frascos de cultivo de plástico de 75 cm² de superficie con tapón ventilado para permitir el intercambio de gases. Las células se encontraban adheridas en monocapa a la parte inferior del frasco y el sobrenadante se correspondía con 10 ml de medio de cultivo. Este volumen de medio era óptimo para el intercambio de gases.

Para comenzar a trabajar se retiraba el medio de cultivo y, a continuación, se adicionaban 5 ml de tripsina (0,12 %), en presencia de ácido etilendiamintetraacético (EDTA) al 0,05 %, durante 5 minutos para despegar las células de la superficie del frasco. La tripsina es una enzima proteolítica que digiere las proteínas que median la adhesión celular a la superficie de cultivo. Una vez que las células se encuentran en suspensión con la tripsina se adicionaban 5 ml de medio de cultivo suplementado siempre con SBF, para detener la acción de la tripsina. El medio con las células en suspensión del frasco se pasaba a un tubo falcon de 50 ml y se centrifugaba a 200 *g* durante 5 minutos, permitiendo sedimentar las células y formar un pellet en el fondo del mismo. Se retiraba el sobrenadante, se añadían 5 ml de medio y se resuspendían las células del pellet manualmente. A continuación, se pasaba a ver la viabilidad y la concentración de las células. Para ello se tomaban 50 µl de la suspensión de células y se añadían a un eppendorf junto a 50 µl de azul tripán. El azul tripán es un colorante vital que permite diferenciar células vivas de muertas. En células vivas, con la membrana celular intacta, el azul tripán no puede incorporarse a la misma, ya que la membrana es selectiva respecto a los compuestos que pueden atravesarla. Por el contrario, en células muertas el azul tripán pasa a través de la membrana celular, permitiendo ver estas células con un distinguido color azul bajo el microscopio. Se tomaba entonces una pequeña alícuota de 10 µl del eppendorf y se colocaba sobre una cámara de conteo celular, la cual se introducía, posteriormente, en un contador celular automático (TC10 Automated Cell Counter) que detectaba el azul tripán y mostraba la viabilidad o número de células vivas en tanto por ciento, y la concentración, celular en células / ml. El conteo celular se hacía por duplicado, tomando la media de ambas medidas como valores definitivos de viabilidad y concentración.

El siguiente paso consistía en calcular el volumen de la suspensión celular de concentración conocida que debíamos añadir a 10 ml de medio de cultivo en un nuevo frasco de cultivo de 75 cm² para obtener un número determinado de células inicialmente en el subcultivo. El número de células dependía de cada línea celular (Tabla 2.2) en función de su tasa de duplicación. Este procedimiento era el mismo para hallar, también, las células que necesitábamos para realizar los ensayos de citotoxicidad y el procedimiento de muerte

celular, detención del ciclo celular, microscopía confocal de fluorescencia y microscopía electrónica de transmisión.

Tabla 2.2. Concentración inicial de células en la siembra.

Línea celular	LLC-PK1	BGM	EA.hy926	MDA-MB-231	SK-BR-3	MCF-7
Células(x10 ⁶)	0,3	0,5	0,5	0,5	1,0	0,7
Línea celular	ELA	A2780	A2780cis	5637	A427	LCLC-103H
Células(x10 ⁶)	0,5	0,5	0,7	0,5	0,5	0,5
Línea celular	SISO	HT-29				
Células(x10 ⁶)	0,5	0,5				

2.4. Ensayo de citotoxicidad

2.4.1. Procedimiento

El parámetro IC₅₀ (concentración inhibitoria del 50 %) es la concentración de un determinado fármaco que se necesita para inhibir el 50 % un proceso biológico o bioquímico.

Para determinar el valor de inhibición IC₅₀ de cada una de las drogas se procedía de la siguiente manera. Las líneas celulares se cultivaban en placas de 96 pocillos a una concentración de 5000 células por pocillo con 200 µl de medio y se incubaban durante 24 horas a 37 °C en atmósfera húmeda controlada para dejar que se adhirieran al fondo del pocillo.

Paralelamente, los complejos sólidos se disolvían en dimetilsulfóxido (DMSO) hasta alcanzar una concentración de 12,5 mM (disolución 1). Se tomaban 50 µl de esta disolución y se mezclaban con 50 µl de DMSO. De esta forma obteníamos una disolución de 100 µl y de dilución 1:2 respecto a la primera (6,25 mM, disolución 2). Repetíamos el proceso de dilución 6 veces más, obteniendo diluciones 1:2 en cada paso (disoluciones 3-8, Figura 2.8). En consecuencia, obteníamos un total de 8 disoluciones, cada una de ellas diluida a la mitad respecto de la anterior.

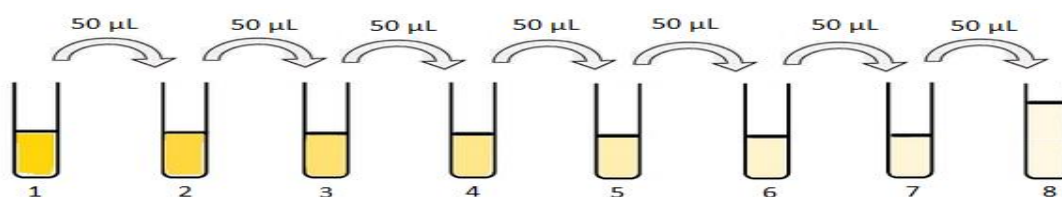


Figura 2.8. Diluciones seriadas

A partir de cada una de las 8 disoluciones en DMSO preparadas, se obtenían 8 disoluciones en medio de cultivo, 50 veces más diluidas. Para ello se añadían 2450 μl de medio de cultivo en un canal de un recipiente contenedor de 8 calles. En cada uno de estos canales se añadían sucesivamente 50 μl de las disoluciones 1-8 anteriores, de forma que las disoluciones resultantes tenían concentraciones de 50 veces más diluidas, como se indica en la Tabla 2.3.

Tabla 2.3. Diluciones realizadas de los complejos y DMSO en medio de cultivo y en los pocillos de las placas de 96. La concentración final de los pocillos era una dilución 1:250 con respecto a las iniciales en DMSO

	Número de pocillo							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Dilución	1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128
Concentración stock (mM) compuesto	12,5	6,25	3,13	1,56	0,78	0,39	0,20	0,10
Concentración compuesto (μM) en medio de cultivo	>250	125	62,5	31,3	15,6	7,81	3,91	1,95
Concentración compuesto (μM) en pocillo	50	25	12,5	6,25	3,13	1,56	0,78	0,39

Finalmente, 50 μl de estas disoluciones (denominadas 1'-8', respectivamente) se adicionaban a los correspondientes pocillos, que contenían 200 μl de medio con células. De esta forma las concentraciones finales de ambos compuestos en los pocillos con células eran una dilución 1/250 respecto a las originales preparadas en DMSO (Tabla 2.3).

Las columnas 1 y 12 se rellenaban con agua estéril para contrarrestar la evaporación que sufre la placa en el incubador. Las columnas 2 y 11 contenían 200 μl de medio con el mismo número de células sin tratar. El resto de las columnas de la 3 a la 10 se dividían en 2, de tal forma que teníamos 8 (semicolumnas) por 4 (filas) pocillos superiores y otros tantos inferiores.

A cada cuatro pocillos (mitad de una columna de una placa) se añadían 50 μl a una concentración determinada. De esta forma el efecto de cada una de las concentraciones se obtenía por cuadruplicado. Las concentraciones finales de ambos compuestos en cada semicolumna (cuatro pocillos) eran las indicadas en la Tabla 2.3. Como quiera que las disoluciones iniciales se preparaban en DMSO, la concentración final de este disolvente en

los pocillos era, por tanto, 0,4 % (1/250). DMSO es letal para las células por encima de una concentración del 2 %, mientras que es inocuo para concentraciones inferiores al 1 %.

El mismo proceso se realizaba con CDDP como control, aunque en este caso se disolvía en agua pura estéril. Los cuatro pocillos superiores de cada columna en una placa se reservaban para un compuesto, mientras que los cuatro pocillos inferiores se reservaban para las disoluciones de CDDP.

La proliferación celular se evaluó mediante el ensayo colorimétrico denominado MTT, (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il))-2,5-difeniltetrazolio, que a continuación describimos.

Se sembraban en placas de 96 pocillos estériles a una densidad de 5×10^3 células/pocillo con 200 μ l de medio y luego se incubaban durante 24 h a 37 °C en atmósfera húmeda controlada. Después de la adhesión a la superficie de cultivo las células se incubaban con varias concentraciones de los compuestos ensayados recién disueltos en DMSO y se diluían en el medio de cultivo mediante la adición de 50 μ l (concentración final de DMSO 0,4 %) durante 48 horas a 37 °C. Posteriormente, se retiraba el medio por pipeteo y a continuación, 200 μ l de medio DMEM sin suplementar y se suministraban 50 μ l de una disolución de MTT 5 mg/ml y se dejaban incubando en las mismas condiciones anteriormente descritas, en oscuridad durante 4 horas. Por último, el medio con la disolución de MTT se retiró de cada uno de los pocillos de las placas, y se añadía 100 μ l de DMSO y se dejó 10 minutos en agitación a 120 rpm (siempre en oscuridad) antes de la lectura. Se medía la absorbancia a 560 nm en un espectrofotómetro FLUOstar Omega.

2.4.2. Tratamiento de datos

Los efectos de los complejos se expresaban como valores de porcentaje de inhibición corregida de acuerdo con la siguiente ecuación,

$$\% \text{ inhibition} = \left[1 - \left(\frac{T}{A} \right) \right] \times 100 \quad \text{Ec. [1]}$$

donde T es la media de la absorbancia de las células tratadas y A la absorbancia media en los controles.

El potencial inhibidor de los compuestos se midió mediante el cálculo de las curvas de inhibición de concentración - porcentuales, estas curvas se ajustaron a la siguiente ecuación:

$$E = \frac{E_{max}}{1 + \left(\frac{IC_{50}}{C} \right)^n} \quad \text{Ec. [2]}$$

donde E es el porcentaje de inhibición observado, E_{max} es el efecto máximo, IC_{50} es la concentración que inhibe el 50 % de crecimiento máximo, C es la concentración de los compuestos ensayados y n es la pendiente de las curvas sigmoideas de dosis-respuesta

semilogarítmica. Este ajuste no lineal se realizó utilizando el programa estadístico SigmaPlot v.11.0

Para propósitos de comparación, la citotoxicidad del cisplatino se evaluaba en las mismas condiciones experimentales.

Todos los estudios se realizaron con máxima concentración de DMSO de 0,4 % (excepto para cisplatino que se disolvía en agua, ver Tabla 2.3) y en todas las mediciones de los experimentos se corrigen con un control de agua.

2.4.3. Factores de resistencia y de selectividad

Se define el Factor de Resistencia (RF) como:

$$RF = \frac{IC_{50} A2780cis}{IC_{50} A2780} \quad \text{Ec. [3]}$$

donde $(IC_{50})_{A2780cis}$ e $(IC_{50})_{A2780}$ son los valores de IC_{50} para las dos líneas indicadas. Cuanto mayor es el valor de RF, tanto menor es el efecto del compuesto en la línea A2780cis respecto de la A2780. Para CDDP, RF tiene valores superiores a 10. Un valor de RF para un determinado fármaco inferior a 2 se considera que no genera resistencia cruzada.

Se define el Factor de Selectividad (SF) como:

$$SF = \frac{IC_{50} \text{ célula sana}}{IC_{50} \text{ célula tumoral}} \quad \text{Ec. [4]}$$

donde $(IC_{50})_{\text{célula sana}}$ e $(IC_{50})_{\text{célula tumoral}}$ son los valores de IC_{50} para las dos líneas indicadas. Cuanto mayor es el valor de SF, tanto mayor es la selectividad del compuesto hacia la línea tumoral.

2.5. Detención del ciclo celular

En la Introducción (apdo. 3.1) se han descrito las diferentes fases por las que atraviesa una célula hasta que se produce su división. Los compuestos citotóxicos pueden alterar la duración de cada una de esas fases del ciclo celular dependiendo de su forma de acción. Por tanto, el conocimiento de en qué punto un determinado compuesto detiene el ciclo celular puede proporcionar información sustancial sobre, por ejemplo, el tipo de proteínas y/o genes sobre los que actúa.

En un ensayo de detención de ciclo celular se determina, mediante citometría de flujo, el número de células que se encuentran en un momento dado en cada una de las fases específicas del ciclo. Comparando el resultado obtenido de nuestra muestra de células tratadas con un compuesto frente a una muestra control (sin tratar con el compuesto) se

puede determinar en qué momento del ciclo celular nuestro compuesto estudiado está actuando preferentemente.

La citometría de flujo es una herramienta de análisis que permite discriminar células y otras partículas en suspensión de diferente tamaño y espectro de fluorescencia. Esta técnica de análisis es utilizada de forma rutinaria para medir y cuantificar propiedades fenotípicas, bioquímicas y/o moleculares de células individualizadas mediante la utilización de sondas fluorescentes específicas de uno o varios parámetros celulares. La principal característica de la citometría es que puede ofrecer de forma muy rápida información simultánea de varios parámetros de cada una de las células/partículas analizadas, así como la relación entre dichos parámetros. Los parámetros analizables por citometría de flujo son los relacionados con las características físicas de la célula/partícula como el tamaño y la complejidad, así como las distintas fluorescencias asociadas a la misma.

Las células se inyectan a presión en el citómetro y durante el trayecto se consigue que pasen por el detector de una en una. Interaccionan entonces con un haz de luz que, al incidir sobre ellas, se dispersa. Esta dispersión es recogida por unos detectores tras ser conducida a través de espejos dicróicos y lentes colectoras a modo de filtro, proporcionando información relativa sobre el parámetro a estudiar. Además, la luz incidente puede, según la longitud de onda de la misma, excitar una serie de fluorocromos presentes en las células, los cuales proporcionarían información adicional sobre las células.

La preparación de las células para su análisis mediante citometría de flujo se realizaba como describimos a continuación. 1×10^5 células se sembraban en una placa de 6 pocillos con su correspondiente medio suplementado completamente (2 ml/placa). Las células se dejaban adherir a la superficie de la placa por incubación durante 24 horas a 37 °C (5 % o 7,5-10 % de CO₂). Posteriormente, se añadían los compuestos de estudio a unas concentraciones finales a sus respectivos valores de IC₅₀ en los diferentes pocillos. Un pozo de cada línea celular se dejaba sin tratar, para ser utilizado como control. Los cultivos se incubaban durante otras 24 h adicionales en las mismas condiciones que las descritas anteriormente. En este punto, se retiraba el medio y se almacenaba en falcon de 15 ml. De inmediato, las células adheridas se trataban con 1 ml de tripsina durante 5 minutos a 37 °C y luego se añadía 1 ml de medio correspondiente, que contenía SBF para detener la acción enzimática. Los 2 ml resultantes se agregaban al falcon de 15 ml. A continuación, las células se centrifugaban (200 g, 5 minutos) y los precipitados (células) se lavaban con 2 ml de PBS. Después de otra centrifugación (mismas condiciones) y eliminar el sobrenadante, las células se resuspendían en 200 µl de PBS. Después, se añadía 1 ml de una solución mezcla de PBS/etanol (30 % / 70 %) a las células. La solución se mantuvo a 4 °C durante 45 minutos. El sobrenadante se eliminaba por centrifugación previa (mismas condiciones) para separar las células que quedarían como un pellet en el fondo. Las células

se resuspendían de nuevo con 800 μ l de PBS. Finalmente, se añadían 100 μ l de una solución de RNasa (1 mg/ml) y 100 μ l de una solución de yoduro de propidio (400 mg/ml).

El yoduro de propidio (IP) se intercala cuantitativamente entre las bases de los ácidos nucleicos. Habiéndose eliminado el ARN mediante la acción de la RNasa, la fluorescencia del yoduro de propidio es directamente proporcional a la cantidad de ADN presente en la suspensión celular.

Después de agitar la suspensión resultante se incubaba a 37 °C durante 45 minutos en la oscuridad. Las células marcadas se analizaban a continuación, en un citómetro de flujo Becton-Dickinson FACScalibur.

2.6. Evaluación del efecto apoptótico

Para los ensayos de determinación de apoptosis, 1×10^5 células se sembraban en una placa de 6 pocillos. Las diferentes líneas tumorales control y con compuestos se incubaban, se recogían y se lavaban una vez con PBS como se describió anteriormente (sin mezcla de PBS/etanol en este caso). Después de retirar el PBS, se añadían 40 μ l de una solución que contenía anexina V (Anexina-V-Fluos de Roche) e IP al sedimento celular que contenía 160 μ l de tampón de incubación (ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperzinaetanosulfónico –HEPES– 10 mM, NaCl 140 mM, CaCl₂ 5,0 mM, pH 7,4).

El IP emite a una longitud de onda (620 nm) mayor que la anexina (525 nm) al unirse a su diana. La anexina V se une a la fosfatidilserina, un componente de los fosfolípidos que usualmente se mantiene en la monocapa lipídica interior, en el lado citosólico. Cuando una célula sufre apoptosis, la fosfatidilserina ya no se limita a la parte citosólica de la membrana, sino también queda expuesta a la superficie de la célula (Figura 2.9). Las células apoptóticas tardías empiezan a perder la selectividad de la membrana plasmática y pueden unir también yoduro de propidio al ADN. Por consiguiente, al pasar las células por el citómetro de flujo, de acuerdo con su fluorescencia se pueden clasificar en cuatro cuadrantes típicos: células marcadas solamente con IP o células necróticas (cuadrante superior izquierdo, D1), células marcadas con ambos agentes fluorescentes o células apoptóticas tardías (cuadrante superior derecho, D2), células no marcadas o células vivas (cuadrante inferior izquierdo, D3), y, por último, células marcadas significativamente con Anexina V, pero sin fluorescencia de IP (cuadrante inferior derecho, D4).

Las células se resuspendían en esta solución y se dejaban a temperatura ambiente y en oscuridad durante 15 minutos. Se añadían inmediatamente 200 μ l de PBS anteriormente a las mediciones. Las medidas se llevaban a cabo en citómetros de flujo Beckman Coulter Epics XL o Becton-Dickinson FACScalibur, midiendo las emisiones de longitudes de onda de 620 y 525 nm para IP y la anexina V, respectivamente. En este caso, se solían adquirir 10.000 eventos.

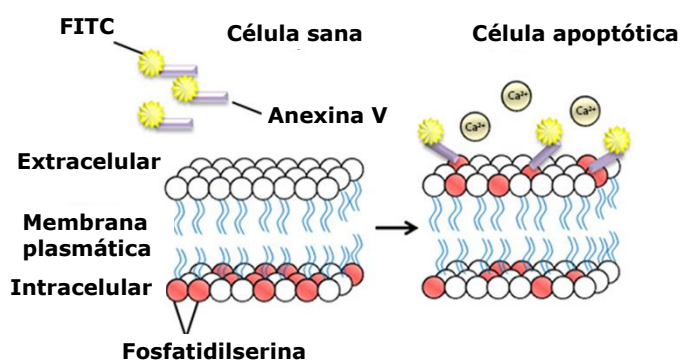


Figura 2.9. Esquema de la translocación de la fosfatidilserina en la apoptosis.

2.7. Localización celular

2.7.1. Microscopía confocal de fluorescencia

La microscopía confocal es una herramienta que permite observaciones a una resolución mayor que la que se puede lograr con la microscopía óptica convencional. Emplea un sistema láser que aplica el haz de luz en forma de barrido en la muestra a estudiar. El láser aplicado a una longitud de onda determinada en la muestra hace que moléculas excitadas de la misma emitan fluorescencia a una longitud de onda mayor a la aplicada. La fluorescencia en una muestra se puede deber a moléculas que se encuentran de forma natural o se puede provocar por moléculas aplicadas artificialmente a la muestra, llamadas fluorocromos. Hay una gran cantidad de fluorocromos específicos en el mercado usados para diferentes estructuras celulares y para diferente emisión de fluorescencia. El uso de varias combinaciones de láseres capaces de detectar y producir fluorescencia a diferentes longitudes de onda permite un escaneo de la muestra en un amplio rango del espectro de luz, permitiendo la observación de estructuras teñidas con un detalle que no se puede lograr con técnicas convencionales. Debido a que el haz de luz láser penetra fácilmente la muestra, el microscopio confocal logra imágenes en diferentes planos focales que, ligados a un programa de cómputo, puede reproducir una imagen tridimensional del material observado.

Para los ensayos de microscopía confocal, se sembraban las células en placas Petri apropiadas para este tipo de microscopía, a una densidad entre 20.000-40.000 en 2 ml de medio de cultivo suplementado completamente sin rojo fenol. Se dejaba que las células se adhirieran al plástico en un incubador de atmosfera húmeda controlada a 37 °C y presencia de CO₂ correspondiente al medio de cultivo. Una vez adheridas las células, se exponían a los complejos a estudiar durante un intervalo de tiempo de 2-3 horas. Pasado ese tiempo las células se lavaban con PBS varias veces y se le añadía los fluorocromos correspondientes a unas concentraciones entre 100 y 500 nM. A cada placa se adicionaba

1 ml de estos fluorocromos y se dejaban éstas en el incubador durante 30 minutos. Posteriormente, se retiraba el sobrenadante y se lavaba cada placa con 1 ml de PBS. En este punto la muestra estaba lista para ser llevada al microscopio confocal Espectral Leica TCS SP2.

2.7.2. Microscopía electrónica de transmisión

El microscopio electrónico de transmisión (TEM) es un instrumento se basa en la colisión de un haz de electrones suficientemente acelerados con una muestra ultrafina convenientemente preparada. Al chocar con la muestra, en función de su grosor y del tipo de átomos que la forman, parte de los electrones son dispersados selectivamente. Estos electrones salientes son modulados por unas lentes para formar una imagen final sobre una pantalla. La resolución que se puede alcanzar es de miles de aumentos, inalcanzable mediante cualquier otro tipo de instrumento. La información que se obtiene es una imagen con distintas intensidades de gris que se corresponden al grado de dispersión de los electrones incidentes.

Las muestras biológicas (compuestas casi en su totalidad por C, H, O, N, S y P) se caracterizan por poseer una distribución de densidad electrónica bastante homogénea. Como la magnitud del cambio de la trayectoria y pérdida de energía de los electrones para estos elementos ligeros es muy similar, las imágenes de estas muestras son, por lo general, poco informativas. La solución técnica consiste en aplicar un agente de contraste, constituido por átomos pesados como uranio, plomo, osmio o wolframio, entre otros, que, de manera selectiva, se fija sobre ciertas partes de la muestra reflejando las diferencias composicionales o estructurales presentes.

Muestras delgadas y adecuadamente contrastadas resultan ser imprescindibles para la obtención de buenas imágenes. A medida que aumenta el espesor de la muestra la imagen resultante es más confusa y menos luminosa, debido a la pérdida de electrones que llegan a formarla. Por este motivo, para conocer la ultraestructura de tejidos, estos deben ser procesados a fin de obtener secciones ultrafinas (en torno a 70 nm) que se puedan visualizar en el TEM.

Las regiones de la muestra donde la dispersión de electrones es intensa aparecerán oscuras en la imagen y aquellas regiones donde la dispersión es débil aparecerán claras. Las regiones de la muestra que son más gruesas o que tienen mayor número atómico dispersarán a los electrones más fuertemente y se verán más oscuras en la imagen.

A continuación, se describe el método de preparación de muestras para TEM. Se cultivaban un millón de células en una placa de 6 pocillos durante 24 horas a 37 °C. Transcurrido ese tiempo, se añadía una concentración determinada del complejo de estudio a cada pocillo y se dejaba 24 horas a la misma temperatura. Después, se añadía el medio

a un tubo falcon. Posteriormente se despegaban las células de los pozos con tripsina y la suspensión resultante se juntaba en el tubo Falcón® con el medio. Seguidamente, el tubo se centrifugaba (200 g, 5 minutos), desechando el sobrenadante. Las células se fijaban con glutaraldehído (2,50 %) durante hora y media y, después, se lavaban con tampón cacodilato de sodio (0,1 M, pH 7,4) por medio de centrifugación (mismas condiciones). Llegados a este punto se realizaba un tratamiento de deshidratación para quitar el agua del interior celular y preservar las células en su estado original tanto como fuera posible. Se adicionaba etanol a las células a concentraciones sucesivamente crecientes (30 %, 50 %, 70 %, 90 %) durante 10 minutos. Posteriormente, se añadía etanol absoluto y, al mismo tiempo, sulfato de cobre(II) como agente antibacteriano durante 10 minutos. La deshidratación completa de la muestra se lograba mediante adiciones posteriores de óxido de propileno en resinas epoxi a concentraciones cada vez más altas. Finalmente, las cápsulas obtenidas se dejaban en resina epoxi una noche completa para que se endurecieran y, entonces, se cortaban con un ultramicrotomo equipado con una cuchilla de diamante en secciones de un espesor promedio de 0,07 µm. En ningún caso se añadía tetróxido de osmio o acetato de uranilo durante este proceso para garantizar que las imágenes de contraste fueran debidas sólo al fármaco metálico añadido. Las secciones así obtenidas se colocaban sobre una rejilla de cobre y se llevaban al microscopio electrónico de transmisión ZEISS EM 10.

2.8. Angiogénesis

2.8.1. Ensayo angiogénico *in vitro*

El interés en la angiogénesis como mecanismo biológico básico y como posible diana terapéutica ha motivado el desarrollo de múltiples métodos de su evaluación *in vitro*. Estos métodos fueron inicialmente en su mayoría descriptivos, es decir, basados en la presencia o ausencia de la formación de tubos.² Sin embargo, posteriormente se han usado diferentes técnicas para cuantificar el potencial angiogénico mediante el análisis de la longitud del tubo, el número de tubos o el área ocupada por las redes, que son las variables más usadas.

El método que hemos utilizado en la presente Tesis para determinar la capacidad antiangiogénica de un compuesto se basa en su acción sobre células endoteliales sembradas en Matrigel. Matrigel es un extracto soluble y estéril de la matriz extracelular secretado por el sarcoma murino EHS (Engelbreth-Holm-Swarm),³ rico en proteínas y factores de crecimiento. Este extracto forma un gel tridimensional a 37 °C y es compatible con la morfogénesis y la diferenciación celular, reproduciendo las condiciones del microambiente tumoral. La necesidad de una matriz extracelular para la diferenciación celular justifica el uso de Matrigel para reproducir las condiciones tumorales, promoviendo

la diferenciación de diversos tipos de células, entre ellas las endoteliales. Estas células endoteliales son capaces de formar pseudovasos en Matrigel. A este ensayo se le denomina EFTA (*endothelial formation of tubules assay*).

El Matrigel se almacena como una solución congelada. Se descongela a 4 °C y gelidifica a 20-37 °C en 30 min. El gel no se vuelve a disolver con un enfriamiento. La respuesta de diferenciación en Matrigel depende del tipo de célula. Así, las células endoteliales se colocan y alinean en 1-2 horas y forman estructuras similares a capilares con lumen al cabo de 18-24 h. El ensayo de EFTA en Matrigel se ha convertido, por tanto, en un ensayo *in vitro* útil para observar dos pasos clave en la vía angiogénica: la invasión y la diferenciación de las células endoteliales.

La mayor parte de la bibliografía para ensayos de EFTA utiliza células HUVEC para la evaluación de angiogénesis en Matrigel. Sin embargo, esta línea celular presenta un coste elevado y limitaciones a nivel biológico, como su escasa viabilidad, lo que ha motivado la búsqueda de nuevos protocolos para los ensayos. El Matrigel es otro componente que eleva el coste de los ensayos, por lo que la cantidad utilizada debe ser la mínima que permita la diferenciación y evaluación de angiogénesis de la línea celular problema. Aunque menos utilizada, la línea celular EA.hy926 inmortalizada se presenta como una alternativa a la línea de células HUVEC^{2,4-6} formando ambas idénticas estructuras en un sustrato con Matrigel.³

Por estos motivos, en la presente Tesis se utilizaba la línea celular EA.hy926, un híbrido de la línea celular HUVEC con la línea celular de carcinoma de pulmón A549. Esta línea presenta ventajas con respecto a las HUVEC, entre ellas que conservan todas las propiedades endoteliales que tienen las HUVEC, además de su mayor número de duplicaciones celulares (PDLs o *population doublings*), llegando hasta las 100 PDLs frente 5-10 PDLs de HUVEC.

Para realizar el ensayo, una vez descongelado el Matrigel, se extendían 9 µl por la superficie de un pocillo de una placa de 96 pocillos y se dejaba solidificar durante 1 hora a 37 °C. Seguidamente, se sembraban las células endoteliales EA.hy926 a una densidad de 15.000 cel/pocillo en 200 µl de medio. Una vez sembradas, se añadía el compuesto a estudio a una concentración por debajo del IC₅₀ que presentaba para esa línea celular. Después de 14-16 horas se fotografiaban los pocillos.

Cada tratamiento se llevó a cabo por cuadruplicado y los experimentos para cada compuesto a estudio se repitieron tres veces de forma independiente.

Las imágenes de contraste de fase de células EA.hy926 para Matrigel se capturaban con un microscopio óptico invertido contraste de fases (NIKON mod. Eclipse TE 2000U) a 5 aumentos, y guardados como archivos de formato tiff. El software de adquisición usado fue NIKON DS-5M.

Para los estudios de formación de estructuras tubulares por las células endoteliales, las imágenes fueron procesadas usando el software libre ImageJ⁷ con el kit de herramientas de procesamiento de angiogénesis *Angiogenesis Analyzer for ImageJ*.⁸ En la Figura 2.10 se muestra una fotografía típica con las redes determinadas por este programa.

La cuantificación consiste en evaluar el número de vasos que son capaces de formar las células endoteliales. Además, también se cuantifican la longitud total (μm) que tienen todos los vasos interconectados entre sí y la superficie que engloba el vaso (μm^2).

El análisis estadístico se realizó con el programa estadístico SigmaPlot v.11. Para la cuantificación del análisis de imagen, se tomó como representante de cada muestra el valor promedio de cuatro imágenes tomadas por tratamiento y por condición. Para la comparación de los tratamientos se utilizó el test ANOVA para 1 parámetro cuantitativo. Las muestras fueron analizadas en cada uno de los casos, considerando la desviación estándar y un intervalo de confianza del 95 % ($p < 0,05$).

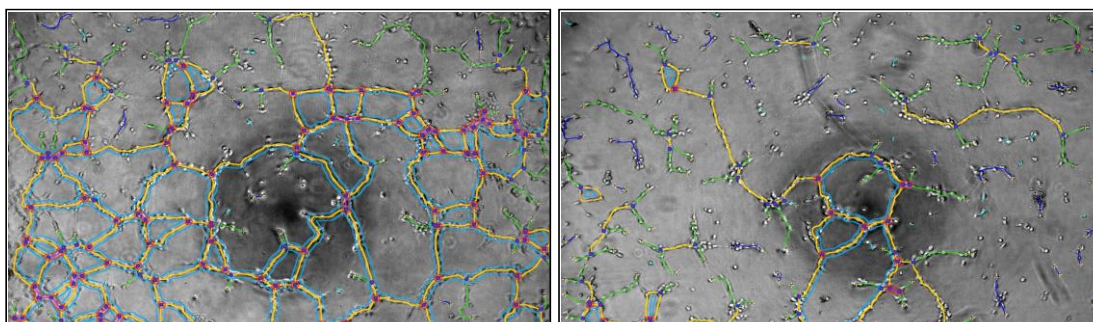


Figura 2.10. Fotografías obtenidas de un cultivo de EA.hy926 en matrigel (ver texto) en ausencia (izquierda) y presencia (derecha) de un compuesto antiangiogénico. En la imagen de la izquierda, analizada con el programa ImageJ se observan un conjunto de redes, ausentes en la imagen de la derecha.

2.8.2. Ensayo de migración: *Wound healing assay*

El ensayo de cierre de herida o *wound healing assay* tiene como finalidad el estudio de la migración celular. Este ensayo es fácil de realizar y económico y, en consecuencia, ampliamente utilizado.

Está basado en el comportamiento de las células en una monocapa confluyente a la que previamente se le ha realizado un *scratch* o herida. Las células del borde herido se moverán hacia el otro borde hasta intentar contactar con las otras células, cerrando la herida.

La captura de las imágenes en los tiempos marcados en el protocolo de estudio permite comparar la velocidad de migración de las células.

Para la realización de este ensayo, las células EA.hy926 se cultivaban como monocapas confluentes en placas de 96 pocillos. Se sincronizaban en SBF al 1 % durante 24 h y se les hacía una brecha (*scratch*) eliminando la tira de células a través del pocillo con una punta

estándar de pipeta de 200 µl. Los pocillos se lavaban dos veces con PBS para eliminar las células no adherentes y después se trataban con los compuestos a estudio durante 8 h. La migración de células EA.hy926 se registró bajo microscopio invertido (Nikon mod. Eclipse TE-2000-U).

El cálculo para cuantificar la migración celular se realizaba mediante la siguiente ecuación:

$$A_o = \frac{A_{10} - A_{18}}{A_{10}} \times 100 \quad \text{Ec. 5}$$

donde A_o es el área de ocupación de las células (en porcentaje), A_{10} es el área libre que dejan las células a 0 h y A_{18} es el área libre dejada por las mismas células 8 horas después de realizar la brecha.

Para la determinación cuantitativa de estas áreas se utilizó ImageJ Software (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

2.9. Estudios de acumulación celular

La medición de la cantidad acumulada por un fármaco después de ser suministrado es un dato muy relevante a la hora de determinar su mecanismo de acción. Un fármaco puede ser extremadamente citotóxico en el interior celular, pero ser poco permeable y, en consecuencia, su efecto en la citotoxicidad observada sería muy inferior. A la inversa, un fármaco relativamente poco citotóxico podría ser más efectivo si traspasa la membrana lipídica fácilmente y, en consecuencia, se acumula rápidamente.

Para los estudios de acumulación celular se seguía el proceso que se detalla en los siguientes párrafos. Las células tumorales se sembraban en placas de cultivo de 6 pocillos a una densidad de 10^6 células/pocillo y se mantenían a 37 °C en una atmósfera de humedad controlada de CO₂ dependiente del medio de cultivo. Los compuestos a estudio se añadían a las células y se incubaban durante 24 h a una concentración cercana al IC₅₀. Después de este tiempo las células se recogían de la placa usando tripsina y EDTA. La suspensión de células de cada pocillo se transfería a tubos falcon de 50 ml y, a continuación, se centrifugaba a 250 g durante 5 min a temperatura ambiente. El sobrenadante se descartaba y las muestras se resuspendían con 200 µl de HNO₃ ultrapuro al 65 %. Para la determinación de la concentración del metal se utilizaba un espectrómetro de masa de plasma acoplado inductivamente Agilent 7700x. Las muestras se introducían a través de un nebulizador de vidrio concéntrico con una velocidad de aspiración libre de 0,3 rps (cuentas por segundo), una cámara de pulverización de vidrio de doble paso enfriada con Peltier y una antorcha de cuarzo. Una bomba peristáltica transportó muestras del inyector automático integrado I-AS (Agilent) al nebulizador. Las rectas de calibrado para conocer la concentración de metal se prepararon por dilución en serie de una solución

que contenía 1000 mg/L de metal en HCl al 5 % (Panreac). Se realizaba una curva de calibración de nueve puntos en un intervalo de concentración de 2-100 µg/L de metal.

Para la determinación de la cantidad de metal se utilizó Espectroscopía de Masas con Plasma Acoplado Inductivamente (ICP-MS). Para los análisis se usaban como patrón estándar interno ^{194}Pt , ^{195}Pt e ^{197}Ir . La adquisición de datos se realizó usando saltos de pico con un tiempo de integración de 0,7 s por masa, un tiempo de adquisición total de 10,47 s y tres repeticiones por muestra de dos experimentos independientes.

2.10. Caspasa-3

Como hemos indicado en la Introducción (apdo. 3.3.1) caspasa-3 es una enzima desencadenante de la apoptosis. La determinación de cómo un fármaco altera su actividad es un indicativo, junto con otros estudios adicionales, del modo de acción del mismo, y más concretamente, de si el fármaco provoca apoptosis celular.

Dos métodos se suelen utilizar para la determinación de la actividad caspasa-3: absorbancia y fluorescencia:

- Absorbancia: El ensayo colorimétrico de caspasa 3 se basa en la hidrólisis del sustrato, el péptido acetil-Asp-Glu-Val-Asp-P-nitroanilida (DEVD-pNA), por la caspasa 3, dando como resultado la liberación de la p-nitroanilina (pNA). Este compuesto absorbe a 405 nm. A partir de esta absorbancia se determina la actividad caspasa-3.

- Fluorescencia: En este caso, se utilizaba la misma secuencia de aminoácidos anterior a la que se le unía, por un extremo, el grupo fluorometilcetona (FMK), que la convierte en inhibidor de esta enzima, y, en el otro, isotiocianato de fluoresceína (FITC) para la detección de la actividad caspasa-3, mediante fluorescencia, dando el compuesto FITC-DEVD-FMK. Al unirse este último a caspasa-3 se libera FITC, que se excita a $\lambda_{\text{exc}}=485$ nm y emite a $\lambda_{\text{emi}}=530$ nm.

A continuación definimos el protocolo de acción. Las células problema se depositaban en placas estériles de seis pocillos a una densidad de 1×10^5 células/pocillo con 2 ml de medio completo. Después de la unión a la superficie del cultivo se incubaban con una concentración similar al IC_{50} de los compuestos a estudiar durante 24 h. Para el ensayo de caspasa-3, se recogía el medio de cultivo en un tubo falcon de 15 ml. A continuación, se añadía 1 ml de disolución de tripsina a los pocillos (0,12 % tripsina, 0,05 mM EDTA) para recoger las células pegadas y se traspasaba al mismo tubo falcon. Los tubos se centrifugaban a 200 g a 4 °C, descartando posteriormente el sobrenadante, y se recogían las células del fondo del tubo. En este punto, se procedía de forma diversa en función del método de detección de actividad caspasa-3 utilizado.

- Absorbancia: Desde el paso anterior en el que las células se encuentran lavadas y recogidas, se continuaba lavando con 1 ml de PBS y se transfería la suspensión resultante

a un tubo Eppendorf. Seguidamente por centrifugación (10000 *g*, 1 min), se descartaba el sobrenadante. A continuación, se añadía un tampón de lisis celular al eppendorf y las células se dejaban durante 10 min en hielo. Posteriormente, las células lisadas se centrifugaban a 10000 *g* durante 1 min y se alicuotaba el sobrenadante en volúmenes de 50 μ l en una placa de 96 pocillos. A cada pocillo se añadía, también, 50 μ l de tampón de reacción y ditiotreitól (DTT). Finalmente, se añadían 5 μ L de DEVD-Na 200 μ M y se incubaba la placa durante 1 h a 37°C en oscuridad. Finalmente se medía la absorbancia a 405 nm en un espectrofotómetro Fluorstar Omega.

- Fluorescencia: 1 μ l de FITC-DEVD-FMK se añadía a cada tubo problema y se dejaba incubar de 30-45 minutos en oscuridad en atmósfera controlada de CO₂ a 37 °C. Pasado este tiempo se centrifugaba (200 *g*, 5 min) y las células se lavaban con PBS. La suspensión celular obtenida se analizaba por dos métodos alternativos. El primero de ellos mediante un lector de placas. Se sembraban 2 x 10⁴ células/pocillo en 200 μ l de medio de cada tubo problema por cuadruplicado en una placa de 96 pocillos y a continuación se determinaba la fluorescencia en un espectrofotómetro FLUOstar Galaxy Omega (λ_{exc} = 485 nm y λ_{emi} = 530 nm). Los experimentos se repetían por triplicado. El segundo método consistía en medir la fluorescencia por citometría de flujo. De esta manera se determinaba semicuantitativamente la fluorescencia emitida por las células, resultado de la presencia de caspasa-3. En este caso se midió la fluorescencia que emitían las células a la longitud de onda de 530nm (FL-1) y se comparaban las suspensiones celulares tratadas con nuestros complejos con una muestra control. En todos los casos se analizaban 10.000 células (eventos).

2.11. Determinación de especies reactivas de oxígeno

La determinación de especies reactivas de oxígeno (ROS) que cada fármaco producía en el interior celular se realizó mediante métodos de fluorescencia. La generación ROS intracelular se investigaba mediante la hidrólisis del compuesto no fluorescente diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (DCFH-DA) en el compuesto altamente fluorescente 2',7'-diclorofluoresceína (DCF). Este proceso ocurre en varios pasos. Primero, DCFH-DA se transporta a través de la membrana celular y se desacetila por la acción de esterasas para formar el compuesto no fluorescente 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (DCFH). Este compuesto queda atrapado dentro de las células. Seguidamente, DCFH se convierte en DCF a través de la acción de peroxidasas en presencia de ROS.

El protocolo era el siguiente. En placas estériles de seis pocillos a una densidad de 1x10⁵ células/pocillo con 2 ml de medio completo y después de la unión a la superficie del cultivo se incubaban las células con los compuestos (concentración IC₅₀) durante 24 h. Seguidamente, las células se tripsinizaban, recogían, centrifugaban y lavaban con PBS. En

este momento, las células se incubaban con DCFH-DA a una concentración 25 μM durante 45 min a 37 $^{\circ}\text{C}$ en oscuridad y en atmósfera controlada de CO_2 . La fluorescencia emitida por la fluoresceína cuando reacciona con ROS se medía en espectrofotómetro FLUOstar Galaxy Omega ($\lambda_{\text{exc}}=485$ nm y $\lambda_{\text{emi}}=530$ nm). Los experimentos se repetían por triplicado.

Adicionalmente se realizaba la lectura de la fluorescencia emitida por citometría de flujo. En este caso se determinaba de manera semicuantitativa la fluorescencia emitida por la fluoresceína en el interior celular, resultado de la reacción con las especies reactivas de oxígeno. Se medía la fluorescencia que emitían las células a la longitud de onda de 530 nm (FL-1) y se comparaban estos resultados con una muestra control (sin tratar con ningún metalofármaco). Se analizaban un total de 10.000 células para cada muestra.

2.12. Fraccionamiento subcelular

A continuación, describimos el procedimiento para la determinación de metalofármacos en distintos compartimentos celulares tales como núcleo, citoplasma y mitocondria mediante fraccionamiento subcelular. Las células se dejaban crecer hasta un 80–90 % de confluencia en frascos de cultivo de 175 cm^2 en un incubador de atmósfera húmeda controlada y CO_2 . Posteriormente, se incubaban con el compuesto (concentración 10 μM) durante 18 h. Pasado este tiempo se recogía una alícuota de 50 μl del medio para determinar la concentración del compuesto en el medio.

El proceso de fraccionamiento celular se muestra en la Figura 2.11. Todo este proceso se llevó a cabo a temperatura ambiente, si bien las muestras se mantuvieron en hielo con el fin de minimizar la degradación de las mismas. Inicialmente, se eliminaba el medio de los frascos de cultivo y se lavaban las células con 5 ml de PBS. A continuación, se eliminaba el PBS y se añadían 5 ml de tripsina 0,5 % en PBS. Las células se mantenían a 37 $^{\circ}\text{C}$ hasta que se despegaban de la superficie del frasco. Para detener el efecto de la tripsina, se añadían 10 ml de medio RPMI-1640 suplementado y la suspensión se pasaba a tubos falcon de 50 ml. Seguidamente, se centrifugaba a 500 g durante 4 min (paso 1, Figura 2.11). Se descartaba el sobrenadante y se adicionaba PBS con el fin de lavar las células. Este proceso se repetía dos veces. Una vez descartado el PBS, se añadía 1 ml de tampón Tris-KCl (KCl 100 mM, Tris-HCl 50 mM, MgCl_2 5 mM, Na_2EDTA 1 mM, pH 7,4) a los tubos. Las células se resuspendían y se pasaban a tubos eppendorf. Una vez en los eppendorf, el paso siguiente consistía en la centrifugación durante 1 min a 1.200 g y en frío (4 $^{\circ}\text{C}$) para eliminar el sobrenadante (paso 2). El pellet celular obtenido se resuspendía en 100 μl de tampón Tris-KCl. Las células se lisaban de forma manual y mecánica con los homogeneizadores de polipropileno y, seguidamente, se añadían a los eppendorf 700 μl de tampón Tris-KCl. La homogeneización resultante se centrifugó durante 1 min a 1200 g a 4 $^{\circ}\text{C}$ (paso 3) y se recogía el sobrenadante que contenía la fracción mitocondrial y citosólica. El pellet

resultante con los núcleos sin lavar (conteniendo aún membranas celulares y otros orgánulos), se guardaba en hielo para su posterior extracción pura (ver más adelante).

Se volvía a centrifugar el sobrenadante durante 5 min a 1500 *g* (paso 4, Figura 2.11), recogiendo de nuevo la fracción soluble (fracción mitocondrial y citosólica) y desechando el sedimento. El sobrenadante se centrifugaba durante 10 min a 9000 *g* (paso 5). El precipitado contenía la fracción mitocondrial, mientras que en el sobrenadante se encontraba la fracción citosólica. El precipitado se resuspendía en 500 μ l de tampón Tris-KCl y se volvía a centrifugar en las mismas condiciones (9000 *g*, 10 min, paso 6). Se desechaba el sobrenadante y, obteníamos de esta forma, una fracción mitocondrial (precipitado) en alto grado de pureza.

El precipitado obtenido del paso 3 (ver Figura 2.11) y que contenía la fracción nuclear se resuspendía en 600 μ l de una solución al 24 % de Percoll. La suspensión resultante se añadía cuidadosamente a otro tubo eppendorf que contenía 1 ml de Percoll al 40 %. A continuación, se centrifugaba a 15.000 *g* durante 10 min (paso 7), generándose tres capas de diferente densidad. La capa menos densa constaba de las membranas celulares; la capa intermedia constaba también de impurezas (orgánulos y otros restos celulares); mientras que la capa más densa contenía los núcleos celulares. A continuación, eliminábamos la capa más superficial por pipeteo. Posteriormente, introducíamos una punta de micropipeta en el fondo del tubo eppendorf y recogíamos aproximadamente 300 μ l de la fracción más profunda (núcleos) y se pasaban a un nuevo tubo eppendorf. A esta fracción se añadía 1 ml de tampón Tris-KCl, se resuspendían los núcleos y se centrifugaba en las mismas condiciones antes mencionadas (15.000 *g* durante 10 min, paso 8). Se despreciaba el sobrenadante, mientras que el pellet obtenido se lavaba con 500 μ l de tampón Tris-KCl dos veces mediante centrifugación (15.000 *g* durante 10 min).

Llegado a este punto hemos obtenido de forma pura las fracciones citosólicas (sobrenadante del paso 5, Figura 2.11), mitocondriales (precipitado del paso 6) y nucleares (precipitado del paso 8).

El proceso siguiente era la cuantificación de proteína en cada una de las fracciones. A una muestra de 93 μ l de la fracción citosólica se adicionaban 5 μ l de SDS al 10 %, 1 μ l de NaVO₃ y 1 μ l de inhibidor de proteasas. De esta forma obteníamos una muestra que nos servía tanto para la determinación de proteínas (ensayo Bio-Rad DC, ver apdo. 14.2) como para la técnica de western blot, y para cuantificar el contenido en metal por ICP-MS. Paralelamente, a la fracción mitocondrial se añadían 70 μ l de tampón de lisis y se homogeneizaba con la pipeta, obteniéndose así las muestras para su determinación cuantitativa tanto de proteína como de metal. Por último, al precipitado nuclear se añadían 150 μ l de tampón de lisis y se procedía a la rotura de las membranas nucleares mediante ultrasonidos a media potencia durante 10 s. De esta obteníamos la muestra de núcleos para determinar su contenido en proteína y en metal.

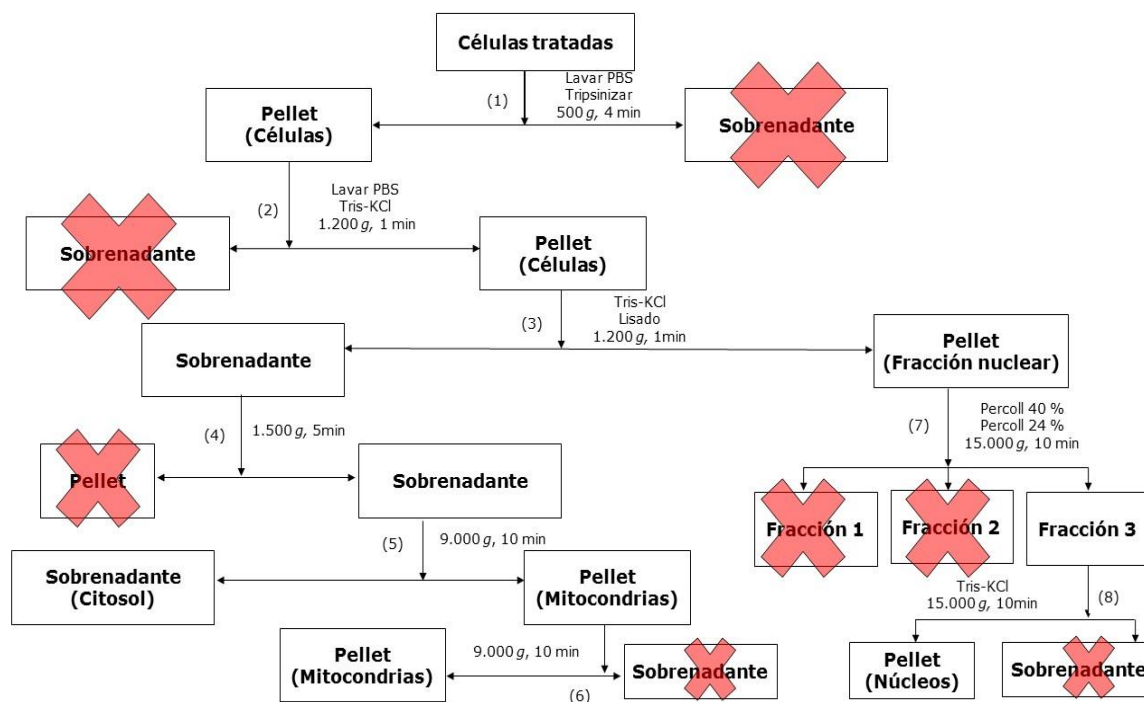


Figura 2.11. Esquema del fraccionamiento subcelular

2.13. Western blot

El Western blot (WB) es una técnica introducida por Towbin et al. en 1979.⁹ También conocido como *protein blotting* o *immunoblotting*, es utilizado para la inmunodetección y cuantificación de proteínas específicas en muestras celulares complejas. En las últimas décadas, la sensibilidad y fiabilidad del procedimiento han ido mejorando, siendo hoy en día una técnica de uso común.¹⁰ Consiste en transferir las proteínas de un gel de poliacrilamida a una membrana adsorbente. Esta membrana es incubada con dos anticuerpos; el anticuerpo primario se une a las proteínas de la membrana, mientras que el secundario se une al primario. En nuestro caso, el anticuerpo secundario iba ligado a fosfatasa alcalina para su posterior revelado.

A continuación, describimos el protocolo seguido para la realización de la técnica Western blot. Las muestras de los lisados se pusieron en un gel NuPAGE Bis-TRIS al 10 %. El gel se colocó en una cámara de electroforesis que contenía 630 ml de tampón de migración (30 ml NuPAGE MOPS SDS 20x tampón de migración + 600 ml de agua bidestilada, ddH₂O). Las concentraciones de proteína se estimaron con el ensayo de proteína Bio-Rad DC y se cargaron 18 µg de proteína diluida en 22,5 µl de tampón de lisis a cada pocillo junto con 7,5 µl de tampón de carga (tampón para muestra LDS NuPAGE, NOVEX) y 0,75 µl de DTT. DTT es un agente reductor, rompe enlaces como los puentes disulfuro. SDS desnaturaliza proteínas nativas y proporciona carga negativa entre las proteínas. Se une un promedio de 1,4 mg de SDS por mg de proteína. Las muestras se

colocaron en un bloque de calentamiento a 95 °C durante tres minutos asegurando la desnaturalización.

Posteriormente se realizó una electroforesis. Para ello se utilizó un marcador de tamaño de proteínas (PagegeRuler™Plus Prestained Protein Ladder, Fermentas, Life Sciences). La escala de tamaño de proteína estaba comprendida entre 15 y 50 kDa. Los geles se pasaron con un potencial de 130 V durante 45 minutos.

Una vez separadas las proteínas en el gel, se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. Para ello se utilizó un tampón de transferencia (60 ml etanol, 30 ml NuPAGE, 600 ml ddH₂O). Se humedecieron las almohadillas de transferencia, el papel de filtro y el papel de nitrocelulosa en el tampón de transferencia. En una cámara de inmunotransferencia de Western se colocó en el siguiente orden: ánodo, almohadilla-filtro-gel-membrana-filtro-almohadilla, cátodo. Se aplicaron 25 V durante 1,5 horas para permitir que las proteínas se desplazaran a la membrana.

Para verificar la separación de proteínas y transferir con éxito la membrana se coloreó con el colorante denominado Ponceau. Este colorante se une a las proteínas y nos permitió ver si las muestras contenían bandas similares de proteínas.

La membrana se colocó en un tampón de bloqueo (50 ml TBST –tampón salino Tris con polisorbato 20, 2,5 g leche en polvo desnatada, 0,05 % azida sódica) durante 1 hora para bloquear la membrana contra uniones no específicas. No hubo control de carga. El tampón de bloqueo y los anticuerpos primarios contra HIST (de histona, 18 kDa), MDH₂ (malato deshidrogenasa, 36 kDa) y LDH (lactato deshidrogenasa, 35 kDa) se mezclaron 1:500, 1:100 y 1:1000 respectivamente (anticuerpo: tampón de bloqueo) y se añadieron a la membrana. La membrana se colocó en una mesa agitadora durante 2 horas para permitir que los anticuerpos primarios se unieran. Los anticuerpos primarios se retiraron y las membranas se lavaron con TBST en una mesa de agitación durante 5 min cuatro veces. Las membranas estaban listas para los anticuerpos secundarios.

Los anticuerpos secundarios (anti-rabbit IgG 1:5000) ligados a la fosfatasa alcalina se usaron para visualizar las bandas de proteínas a las que se unen los anticuerpos primarios. La fosfatasa alcalina es una enzima capaz de sustratos desfosforilados. Aquí el fosfato dipotásico de 5-bromo-4-cloro-3-indolilo (BCIP) era el sustrato de fosfatasa alcalina, que puede ser desfosforilado por la enzima, seguido de dimerización. Los dímeros pueden reducir azul de nitro tetrazolio (NBT) para formar una sal insoluble de diformazán de color azul oscuro. Para detectar las bandas de proteína se añadió suficiente BCIP/NBT para cubrir la superficie de la membrana. La reacción se detuvo cuando aparecieron bandas en la membrana y lavando las membranas en ddH₂O. Las membranas se dejaron secar al aire y, una vez secas, se escanearon para obtener las imágenes digitales que se almacenaron en un ordenador.

2.14. Determinación de proteínas

2.14.1. Ensayo de Lowry

El método de Lowry es capaz de detectar concentraciones de proteína de hasta 10 µg/ml, y la sensibilidad es moderadamente constante de una proteína a otra. El método se basa en la reacción de folin-ciocalteu (mezcla de fosfomolibdato y fosfowolframato) que implica una oxidación catalizada por cobre de aminoácidos aromáticos (tirosina y triptófano) y la reducción del fosfomolibdowolframato a azul de heteropolimolibdeno, produciendo un fuerte color azul que puede cuantificarse midiendo la absorbancia a 750 nm.^{11,12}

La muestra de lisado celular se diluyó con ddH₂O en diferentes grados (1: 1, 1: 4, 1: 9) con un volumen final de 200 µl. Se añadieron 2 ml de solución A (Na₂CO₃, CuSO₄ y K-Na-tartrato) a cada una de las muestras diluidas. Se mezclaron y se dejaron a temperatura ambiente durante 10 min. A continuación, se añadieron 200 µl de solución B (folin-ciocalteu), y se mezclaron por vórtex inmediatamente después. Las muestras se protegieron de la luz, y la absorbancia se midió a 750 nm después de 30 minutos. Paralelamente, se realizó una curva estándar utilizando albúmina de suero bovino (BSA) con concentraciones de 0,00, 0,10, 0,25, 0,50, 0,75 y 1,00 mg/ml.

El reactivo folin-ciocalteu no sólo reacciona con los grupos fenol de la tirosina y el triptófano sino que también puede reaccionar con cualquier agente reductor presente en la muestra.¹¹

2.14.2. Reacción Bimet

Este es un kit de ensayo de proteínas de los laboratorios Bio-Rad™ y se usó para las muestras de transferencia Western. Bajo condiciones alcalinas, los enlaces peptídicos de las proteínas reaccionan con Cu(II), produciendo Cu(I) que reacciona con el reactivo folin (sodio 1,2-naftoquinona-4-sulfonato) y cambiando el espectro de absorción de la muestra. A esta reacción se denomina reacción de Biuret.¹¹

Este método es capaz de detectar concentraciones de proteína de hasta 5 µg/ml. El método es similar al ensayo Lowry descrito anteriormente, pero también contiene el reactivo folínico. Se utiliza normalmente en concentraciones de proteína de 5 µg/ml - 2,0 mg/ml. Este ensayo proteico tiene ventajas comparadas con el ensayo de Lowry al tener un desarrollo de color más rápido (90 % del máximo en 15 minutos) y el color es estable durante un período de tiempo más largo. También es más resistente a los agentes reductores que el ensayo de Lowry original, por lo que puede utilizarse con el tampón de lisis de células en las transferencias de Western.

Para realizar este ensayo se procedió de la siguiente manera. Se mezcló 1 µl de muestra de lisado celular o fracción celular con 24 µl de tampón de lisis. El reactivo A, contiene una solución alcalina de tartrato de cobre, se mezcla con el reactivo S (contiene SDS) en relación 50:1. Se añadían 125 µl de esta solución a las muestras de lisado celular. Se añadieron a las muestras 1 ml de reactivo B (reactivo folínico) y se dejaron durante 15 minutos protegidos de la luz. La absorbancia se medía a 600 nm y las concentraciones de proteína se calcularon de acuerdo con una curva estándar con BSA en las concentraciones de 0,00, 0,10, 0,25, 0,50, 0,75 y 1,00 mg/ml.

2.15. Ensayos de transporte con taurina

La taurina se aisló por primera vez del ácido biliar del buey hace unos 200 años.¹³ El nombre, taurina, se le dio por el nombre latino del buey, *Bos Taurus*. La taurina es un aminoácido sulfónico, es decir, en comparación con los aminoácidos proteínogénicos, tiene un grupo sulfónico en lugar de un grupo carboxílico. Además, el grupo amino se coloca en el carbono β en vez de en el carbono α (como sucede en los α-aminoácidos). Su nombre sistemático ácido β-aminoetano sulfónico.

La taurina participa en diferentes procesos biológicos siendo el fundamental la formación de la bilis. Representa aproximadamente el 0,1 % del peso corporal total, por lo que es el aminoácido libre más abundante del cuerpo humano.¹⁴ Los adultos pueden sintetizar la taurina principalmente en el hígado y en cierta medida en el sistema nervioso central (SNC). La taurina se sintetiza a partir de cisteína y el primer paso de su síntesis es la oxidación de la cisteína por cisteína dioxigenasa. En la Figura 2.12 se indica el camino de biosíntesis de la taurina a partir del aminoácido cisteína. Los bebés tienen bajos niveles de cisteína dioxigenasa haciendo de la taurina un aminoácido semiesencial. Como consecuencia la dieta de los bebés se basa más en alimento animal debido a su mayor contenido en taurina (la taurina se encuentra 100 veces más en tejidos animales que en vegetales).¹⁵

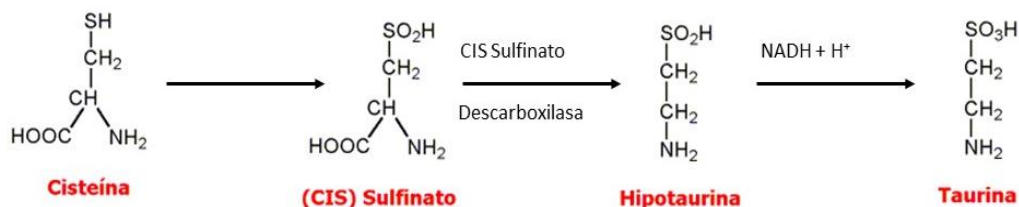


Figura 2.12. Síntesis de taurina a partir de cisteína.

Se ha estimado que la taurina representa el 46 % de la reserva total de aminoácidos libres en las células cardíacas de la rata y las concentraciones pueden ser tan altas como 30 mM (miocardio) y 40-53 mM en las células tumorales ascíticas de Ehrlich (ELA).^{14,16-18} Sin embargo, las concentraciones plasmáticas de taurina están a una concentración alrededor de 40-100 μ M. Por tanto, existe un gradiente termodinámico muy desfavorable para la entrada de taurina en la célula por lo que se requiere de un transportador muy efectivo.

La determinación de captación/eliminación celular de la taurina es una indicación de desequilibrio homeostático de este y otros aminoácidos.

Se determinó la captación de taurina a través del transportador de taurina (TauT) así como la liberación de taurina en condiciones celulares isotónicas y en presencia de compuestos a evaluar durante 18 h.

Para los experimentos de transporte al interior celular, las células crecieron hasta una confluencia del 80 % en placas de cultivo de polietileno de 6 pocillos (9,6 cm²/pocillo). Un pocillo se usó para determinar el contenido de proteína representativo. Las células se lavaron tres veces con medio isotónico (NaCl 300 mOsm, pH 7,4) y se dejaron con 600 μ l de medio isotónico. El flujo se inició por la adición de 50 μ l de solución de ³H-taurina que contenía 37000 Bq ml⁻¹ (taurina 0,005 mM) a los pocillos en el tiempo 0, 2, 4, 6 y 8 min. El flujo se terminó mediante la eliminación del medio extracelular a tiempo 10 min, enjuague rápido de las células mediante la adición/aspiración de 1 ml de solución de MgCl₂ enfriada con hielo, seguido de lisis celular con etanol al 96 %. Después de la evaporación del etanol, la actividad ³H se extrajo con ddH₂O y se determinó usando un contador de centelleo Perkin Elmer usando Ultima Gold™. Se determinó el contenido de proteína en cada pocillo a partir de la actividad de ³H-taurina (cpm -cuentas por minuto- por pocillo) usando la actividad específica extracelular (cpm nmol⁻¹) y el contenido de proteína (mg de proteína por pocillo). Se determinó la captación de taurina (nmol g-proteína⁻¹ min⁻¹) como la pendiente de un gráfico del contenido de taurina celular en función del tiempo usando regresión lineal. Se hicieron al menos tres repeticiones del experimento, es decir, en tres pasajes diferentes de cada una de las tres líneas celulares.

El flujo de taurina hacia el exterior celular se estimó en células que previamente crecieron hasta 80 % de confluencia en placas de cultivo de polietileno de 6 pocillos y se cargaron en medio celular suplementado con ³H-taurina (18500 Bq por pocillo) durante 2 h (37 °C, CO₂ al 5 % y humedad controlada). Antes del inicio del experimento, las células se lavaron tres veces con 1 ml de medio NaCl isotónico. El experimento de salida celular se realizó transfiriendo el medio de NaCl del pocillo a viales y reemplazándolo con el nuevo medio a intervalos de dos minutos. Después de retirar la última muestra, se determinó el isótopo que quedaba dentro de las células mediante la adición de 1 ml de NaOH 1 M, agitando suavemente (1h) y transfiriendo posteriormente NaOH y dos veces lavados

(ddH₂O) a los viales. La actividad ³H se determinó usando Ultima Gold™. La actividad total de ³H en el sistema celular se determinó como la suma de la actividad ³H liberada durante el experimento de salida celular y la actividad ³H detectada en los lavados con NaOH/ddH₂O. La constante de velocidad fraccionaria (min⁻¹) para la liberación de taurina en condiciones isotónicas se calculó a partir de la ecuación:

$$k = \frac{\ln(X_1) - \ln(X_2)}{t_1 - t_2} \quad \text{Ec. 6}$$

donde X_1 y X_2 son las fracciones que permanecen en la célula a tiempos t_1 y t_2 .

2.16. Extracción y cuantificación de ADN

En diferentes estudios de la presente Tesis se procedió a la extracción y cuantificación de ADN con el fin de determinar la relación metal/ADN. La cantidad de metalofármaco se determinaba mediante ICP-MS (ver apdo. 9). Conocida esta relación, se podía comparar la cantidad de metalofármaco presente en el ADN para compararla con el total acumulado en el interior celular.

Se cultivaban en placas Petri para cultivo de tejidos hasta llegar a una confluencia de 80-90 %. Después de la exposición a los complejos a estudiar, las células se tripsinizaban durante 5 min y se les añadía medio de cultivo suplementado para detener la acción de la tripsina. La suspensión resultante se recogía en tubos falcon y se centrifugaba a 200 *g* 5 min, descartando posteriormente el sobrenadante. Una vez obtenido el pellet celular, las células se lavaban con PBS 2 veces, repitiendo el proceso de centrifugado y se dejaban en frío. A partir de este momento todo el proceso de extracción de ADN se hizo en frío (con hielo). Se añadía DNAzol a los tubos de muestras con células (reactivo de aislamiento de ADN genómico, de la casa MRC) suplementado con RNasa A (100 mg ml⁻¹). El ADN genómico se precipitaba a partir del lisado celular con 500 μ l de etanol 100 % deo durante 2-3 min. El líquido viscoso resultante (ADN) se pasaba a un nuevo tubo eppendorf. El ADN obtenido se lavaba dos veces con una dilución de etanol en agua al 75 %. Finalmente, se dejaba evaporar todo el etanol a temperatura ambiente y, una vez seco el precipitado, se solubilizaba con agua miliQ o con una solución de NaOH 8 mM.

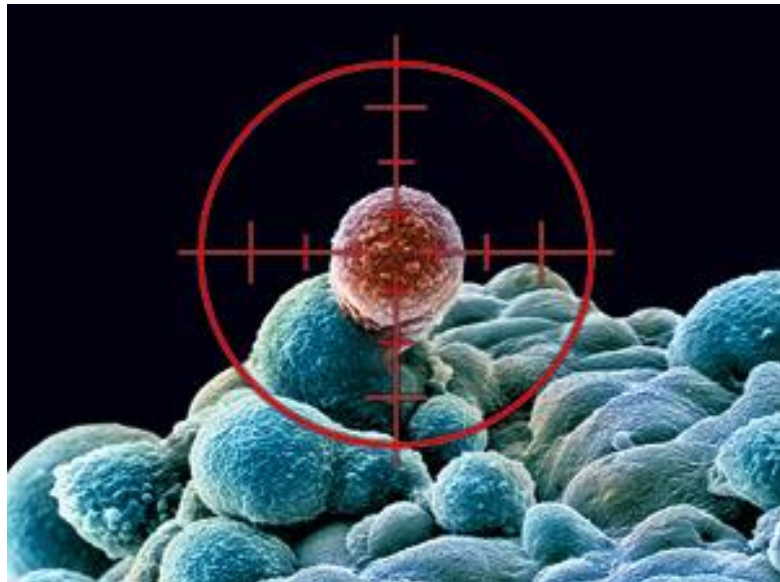
El contenido de ADN en cada muestra se determinaba mediante la absorbancia a 260 nm en un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000.

2.17. Bibliografía

1. Chen, T. R. "Microscopic demonstration of mycoplasma contamination in cell cultures and cell culture media", **1975**, TCA manual / Tissue Culture Association, (1), 229-232.
2. Aranda, E.; Owen, G. I. "A semi-quantitative assay to screen for angiogenic compounds and compounds with angiogenic potential using the EA.hy926 endothelial cell line", **2009**, Biol Res, (42), 377-389.
3. Kleinman, H. K.; Martin, G. R. "Matrigel: basement membrane matrix with biological activity", **2005**, Semin Cancer Biol, (15), 378-386.
4. Rival, Y.; Benéteau, N.; Taillandier, T.; Pezet, M.; Dupont-Passelaigue, E.; Patoiseau, J.-F.; Junquéro, D.; Colpaert, F. C.; Delhon, A. "PPAR α and PPAR δ activators inhibit cytokine-induced nuclear translocation of NF- κ B and expression of VCAM-1 in EAhy926 endothelial cells", **2002**, Eur J Pharmacol, (435), 143-151.
5. Marimietri, D.; Nico, B.; Vacca, A.; Mangieri, D.; Catarsi, P.; Ponzoni, M.; Ribatti, D. "Synergistic inhibition of human neuroblastoma-related angiogenesis by vinblastine and rapamycin", **2005**, Oncogene, (24), 6785-6795.
6. Cui, Y.; Han, Z.; Hu, Y.; Song, G.; Hao, C.; Xia, H.; Ma, X. "MicroRNA-181b and microRNA-9 mediate arsenic-induced angiogenesis via NRP1", **2012**, J Cell Physiol, (227), 772-783.
7. Schneider, C. A.; Rasband, W. S.; Eliceiri, K. W. "NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis", **2012**, Nat Meth, (9), 671-675.
8. Carpentier, G. "ImageJ Contribution: Angiogenesis Analyzer", **2012**.
9. Towbin, H.; Staehelin, T.; Gordon, J. "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications", **1979**, Proc Natl Acad Sci U S A, (76), 4350-4354.
10. Taylor, S. C.; Posch, A. "The Design of a Quantitative Western Blot Experiment", **2014**, BioMed Res Internat, (2014), 8.
11. "Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology", **2010**, 7 ed.; Cambridge University Press: Cambridge.
12. Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L.; Randall, R. J. "Protein measurement with the Folin phenol reagent", **1951**, J Biol Chem, (193), 265-275.
13. Tiedemann, F.; Gmelin, L. "Einige neue Bestandtheile der Galle des Ochsen", **1827**, Annalen der Physik, (85), 326-337.
14. Anderson, C. M.; Howard, A.; Walters, J. R.; Ganapathy, V.; Thwaites, D. T. "Taurine uptake across the human intestinal brush-border membrane is via two transporters: H⁺-coupled PAT1 (SLC36A1) and Na⁺- and Cl⁻-dependent TauT (SLC6A6)", **2009**, J Physiol, (587), 731-744.
15. Huxtable, R. J. "Taurine in the central nervous system and the mammalian actions of taurine", **1989**, Prog Neurobiol, (32), 471-533.
16. Han, X.; Patters, A. B.; Jones, D. P.; Zelikovic, I.; Chesney, R. W. "The taurine transporter: mechanisms of regulation", **2006**, Acta Physiol (Oxf), (187), 61-73.
17. Schuller-Levis, G. B.; Park, E. "Taurine: new implications for an old amino acid", **2003**, FEMS Microbiol Lett, (226), 195-202.
18. Lambert, I. H. "Regulation of the cellular content of the organic osmolyte taurine in mammalian cells", **2004**, Neurochem Res, (29), 27-63.

Capítulo 3

Objetivos



En el Grupo de Metalofármacos del Departamento de Química Inorgánica de la Universidad de Murcia se sintetizan y caracterizan químicamente multitud de compuestos de coordinación de metales de la 2ª y 3ª series de transición con nuevos ligandos específicos. La finalidad de su estudio es encontrar potentes y específicos metalofármacos contra el cáncer, con reducidos efectos secundarios.

Dentro de este marco general, el objetivo de la presente Tesis Doctoral consistía en estudiar un conjunto de complejos de oro, rutenio, iridio y platino para determinar su citotoxicidad y sus mecanismos de acción frente a diferentes tipos de líneas celulares cancerígenas. La finalidad última sería encontrar un compuesto o grupo de compuestos que presentaran una potencialidad cancerígena superior al CDDP, es decir, mejorar la quimioterapia clásica, y, a su vez, y fundamentalmente, reducir los efectos secundarios del cisplatino, es decir, mejorar la selectividad.

Los complejos tipo estudiados fueron, concretamente:

- Compuestos de oro(I) con ligandos derivados de metiltiourea (Figura 3.1.A).
- Compuestos de Ru(II) e Ir(III) basados en ligandos C^N tipo 2-fenilbenzimidazol (Fig.3.1B).
- Compuestos luminiscentes de Ir(III) bis C^N-ciclometalados (Fig. 3.1.C).
- Compuestos de platino(II) no convencionales con ligandos ciclometalados basados en arilmetanaminas (Fig. 3.1.D).

Las líneas celulares cancerígenas objetivo de estudio se indican en la Tabla 2.1 (apdo. 2.2 de Materiales y Métodos). Para determinar la selectividad de los compuestos se utilizaron las líneas celulares sanas BGM y LLC-PK1, de forma que si la citotoxicidad hacia estas líneas fuera muy baja comparada con el potencial citotóxico respecto de las cancerígenas estaríamos, en efecto, en presencia de compuestos potencialmente selectivos.

Otro objetivo adicional y fundamental de esta Tesis era determinar el mecanismo de acción de los compuestos. Para ello, en primer lugar, era necesario conocer su localización preferente en el interior celular, distinguiendo si se acumulaban en el núcleo, en la mitocondria o en otros orgánulos. Para dilucidar los mecanismos de acción era también primordial comprobar si los compuestos causaban apoptosis u otro tipo de muerte celular, así como establecer si generaban ROS y, en paralelo, incrementaban o no la producción de caspasa-3, enzima esencial en la muerte apoptótica celular.

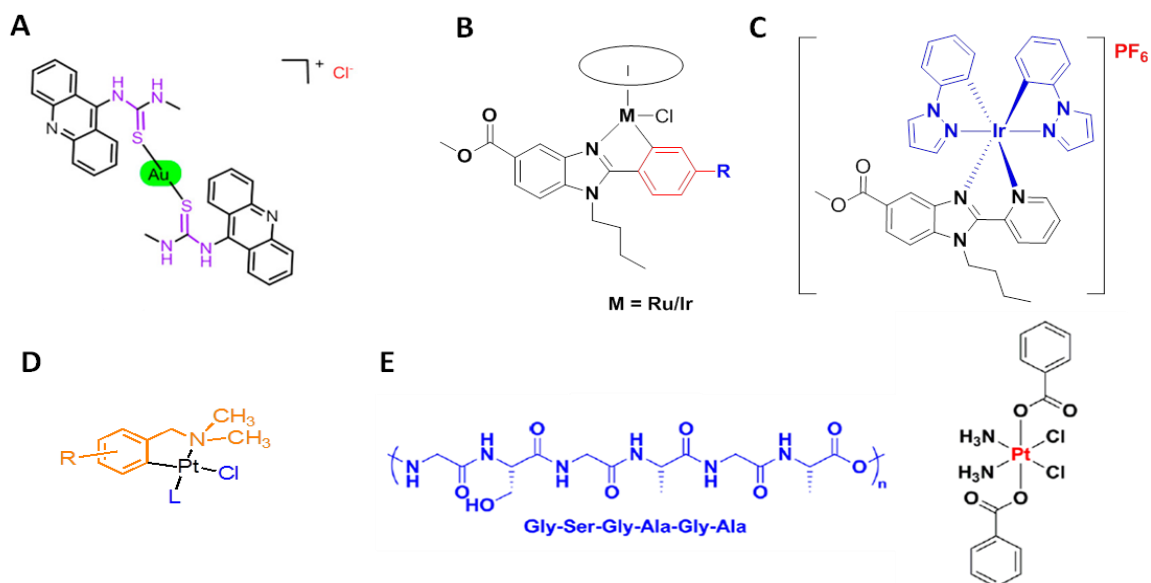


Figura 3.1. A-D) Algunos de los complejos metálicos estudiados en esta Tesis. E) Secuencia de aminoácidos de la fibroína de seda.

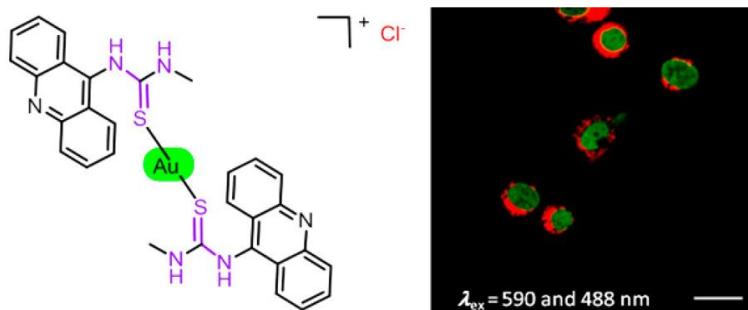
Adicionalmente y como se ha indicado en la Introducción (apdo. 1.3.5), la angiogénesis es el primer paso esencial en la formación de metástasis. La determinación del posible carácter antiangiogénico de los metalocomplejos era otra finalidad esencial en esta Tesis. Encontrar un compuesto que impida la angiogénesis a concentraciones subcitotóxicas sería un primer paso en la búsqueda de metalocompuestos que ataquen al cáncer por este otro camino, paralelo a la citotoxicidad.

Por último, en el Grupo de Metalofármacos también se comenzó, hace ya unos años, una vía extraordinariamente atractiva en cuanto al transporte y efectividad citotóxica de metalofármacos: la encapsulación en nanopartículas, más concretamente, en nanopartículas de seda. También pretendíamos en la presente Tesis caracterizar las nanopartículas de seda que contenían un profármaco de platino(IV) (Figura 3.1.E). Un objetivo primordial de este apartado consistía en determinar su citotoxicidad, comparándola con la del compuesto no encapsulado y, como en los casos anteriores, estudiar el mecanismo de acción específico de las nanopartículas (generación de apoptosis, detención del ciclo celular, acumulación en orgánulos celulares, entre otros aspectos).

En definitiva, en esta Tesis se perseguía encontrar nuevos metalocompuestos, y forma de transportarlos (nanopartículas de seda), caracterizando su modo de acción, de manera que pudieran servir para abrir caminos, quizás hasta ahora desconocidos, más efectivos y selectivos en la lucha frente al cáncer.

Capítulo 4

Actividad Biológica y Mecanismo de Acción de Compuestos de Oro(I)



Los resultados de este Capítulo se han publicado en:

Perez, S. A.; de Haro, C.; Vicente, C.; Donaire, A.; Zamora, A.; Zajac, J.; Kosthunova, H.; Brabec, V.; Bautista, D.; Ruiz, J. "New Acridine Thiourea Gold(I) Anticancer Agents: Targeting the Nucleus and Inhibiting Vasculogenic Mimicry", **2017**, ACS Chem. Biol., doi: 10.1021/acscchembio.7b00090

4.1. Introducción

El cisplatino (CDDP), el carboplatino y el oxaliplatino se han convertido en fármacos establecidos en el tratamiento de diversos cánceres sólidos.^{1,2} Sin embargo, el uso clínico de fármacos tradicionales basados en Pt(II) está limitado por la resistencia adquirida o intrínseca, un espectro limitado de actividad y alta toxicidad, dando lugar a efectos secundarios, como nefrotoxicidad y neurotoxicidad.³⁻⁵

Con el fin de eludir estas limitaciones, diferentes grupos de investigación han enfocado su atención a los complejos de otros metales preciosos como agentes terapéuticos.^{2,6-9} En este contexto, el estudio de los compuestos de oro(I) y de oro(III) han desarrollado un gran interés. Dos de estos complejos de oro activos como antitumorales son Auranofin y su análogo de cloruro Et_3PAuCl ¹⁰⁻¹² (Figura 1.1A). Ambos complejos exhiben sus actividades antitumorales principalmente por interferir con la tiorredoxina reductasa mitocondrial (TrxR).¹³⁻¹⁷ Además, se han sintetizado más compuestos de Au(I) con el fin de activar sus propiedades antitumorales a través de la inhibición de diferentes enzimas. Por ejemplo, el complejo citotóxico de trifenilfosfina $[\text{Au}(\text{NHC})(\text{PPh}_3)] \text{I}$ (Figura 4.1A) inhibe la enzima poli-ADP-ribosa polimerasa-1 (PARP-1),¹⁸ y varios complejos de oro(I) funcionalizados con tiourea son inhibidores de la tirosina quinasa.¹⁹ Asimismo, otros, tales como $[\text{Au}(\text{TU})_2]\text{Cl}$ (TU = 1,3-bis(4-metoxifenil)imidazolidin-2-tiona),²⁰ son inhibidores de la tiorredoxina reductasa. Por el contrario, es bien sabido que algunos compuestos de Au(III) son capaces de unirse covalentemente al ADN^{21,22} o inducir la muerte celular a través de la estabilización del ADN unido a la topoisomerasa I.²³

Por otro lado, los tumores malignos sólidos necesitan un suministro sanguíneo adecuado para permitir el crecimiento y la metástasis.^{24,25} En consecuencia, el tratamiento del cáncer mediante el bloqueo de la angiogénesis tumoral, propuesto por Judah Folkman hace 45 años, es ahora un mecanismo universalmente aceptado.^{26,27} Sin embargo, los limitados beneficios de supervivencia de los fármacos antiangiogénicos estimulaban el interés en la combinación de fármacos antiangiogénicos con quimioterapias establecidas.^{1,28} Dado que el NAMI-A demostró actividad antimetastásica *in vivo*,²⁹ se han publicado algunos complejos metálicos como inhibidores de la angiogénesis,³⁰⁻³⁸ incluyendo los complejos de Au(I) y de Au(III) mostrados en la Figura 4.1B.

Durante muchos años, la angiogénesis tumoral fue considerada como el único medio por el cual un tumor podía adquirir un suministro sanguíneo adecuado. Sin embargo, estudios recientes sugieren que los tumores pueden crecer también a través de mecanismos alternativos, incluyendo el mimetismo vascular (VM), por el cual las células tumorales, pero no las células endoteliales, forman estructuras

vasculares,^{24,39,40} lo que les permite una perfusión y diseminación diferentes. Las terapias antivasculares convencionales dirigidas a las células endoteliales no tienen efectos significativos en los tumores con el VM, y las tasas de supervivencia global para la mayoría de los pacientes con cáncer no se prolongan significativamente. Por lo tanto, la doble orientación de la angiogénesis endotelial y el VM mediados por células tumorales pueden ser necesarios para superar los problemas clínicos actuales con la terapia antiangiogénica, mejorando así el resultado clínico.

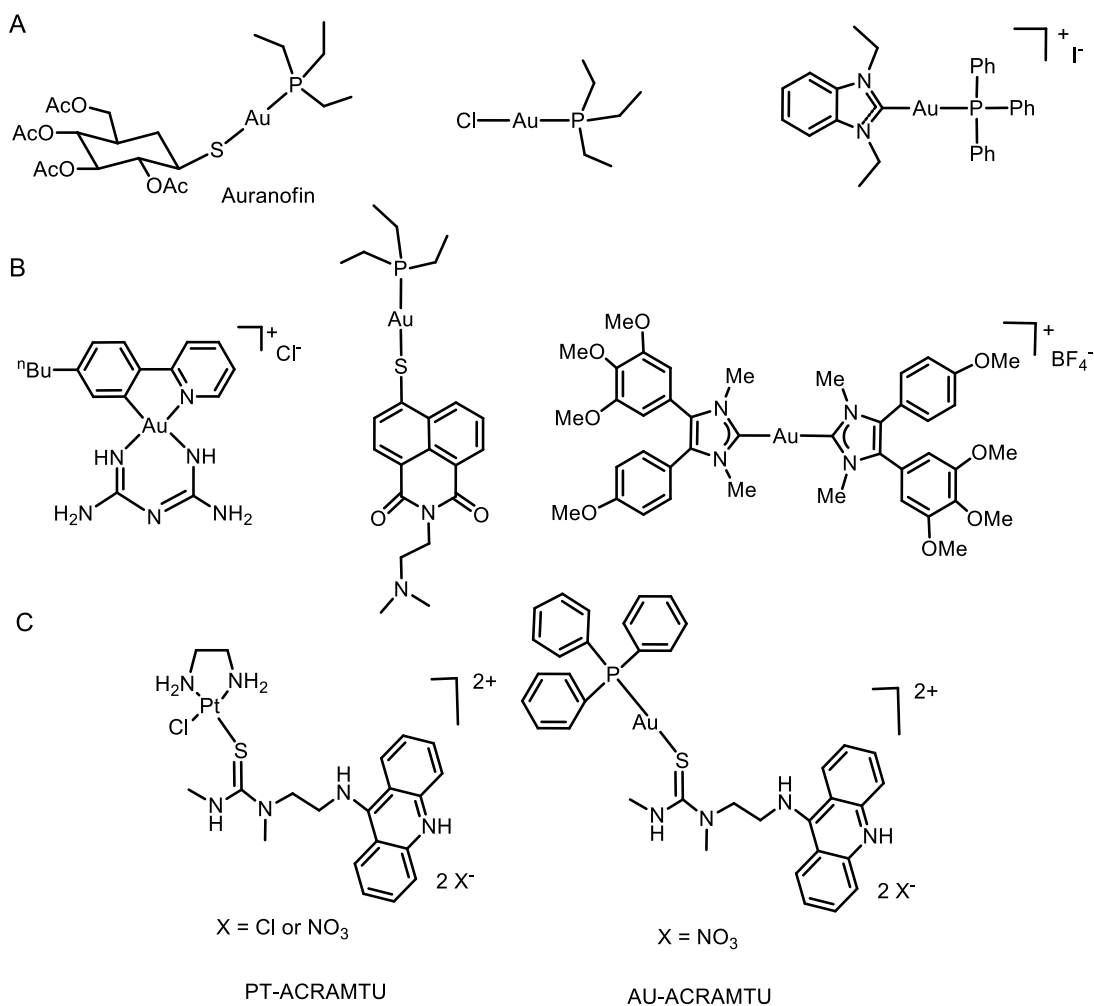


Figura 4.1. Algunos complejos de oro activos antitumorales (A) y complejos de oro antiangiogénicos y antitumorales (B).^{33,55,58} Los llamados PT-ACRAMTU y AU-ACRAMTU preparados por Bierbach (ver texto) (C).

Impulsado por el éxito de la denominada PT-ACRAMTU (PT = platino; ACRAMTU = 1-[2-(acridin-9-ilamino)etil]-1,3-dimetiltiourea), un conjugado de platino-acridina cuya diana es el ADN,^{41,42} y el análogo de oro dicatiónico AU-ACRAMTU (AU = oro, Figura 4.1C) que muestra una actividad potente contra *Mycobacterium tuberculosis*,⁴³ hemos preparado dos nuevos complejos relacionados de oro(I), ambos con el ligando acridinatiourea (**1**), [Au(ACRTU)₂]Cl (**2**), y el segundo [Au(ACRTU)(PPh₃)]PF₆ (**3**)

(ACRTU = 1-acridin-9-ilmethyltiourea) representados en la Figura 4.2. El objetivo es determinar sus potenciales antitumorales y explorar sus posibles propiedades antiangiogénicas. También hemos estudiado su mecanismo de acción en las líneas celulares ováricas y de cáncer de mama, utilizando una amplia variedad de técnicas *in vitro* y bioquímicas, incluyendo estudios de apoptosis y estudios de localización intracelular mediante microscopías confocal de fluorescencia y electrónica de transmisión. Hemos caracterizado, además, el efecto de estos compuestos sobre la topoisomerasa I. Por último, se ha estudiado la actividad antiangiogénica de los nuevos complejos Au(I) en la línea celular endotelial de vena umbilical humana inmortalizada EA.hy926 y el efecto mimético vasculogénico en la línea celular MDA-MB-231 altamente invasiva.

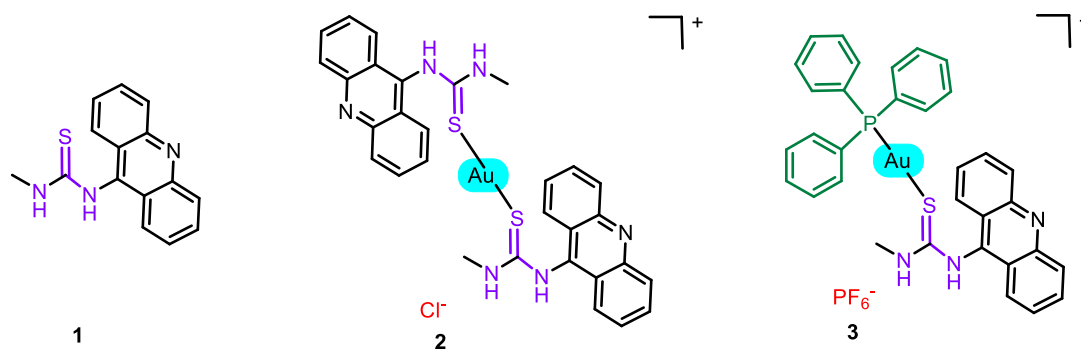


Figura 4.2. Estructura química del ligando el ligando acridinatiourea (ACRTU = 1-acridin-9-ilmethyltiourea) (**1**), y de los compuestos $[\text{Au}(\text{ACRTU})_2]\text{Cl}$ (**2**), y $[\text{Au}(\text{ACRTU})(\text{PPh}_3)]\text{PF}_6$ (**3**).

4.2. Resultados y discusión

4.2.1. Estudios citotóxicos

Para analizar el potencial de los compuestos **2** y **3** como agentes anticancerosos, se evaluó su citotoxicidad (Tabla 4.1) hacia células A2780 y un panel de líneas celulares de cáncer de mama humano, MDA-MB-231 (triple negativo), SK-BR-3 (HER2 +, ER α - y ER β -) y MCF-7 (ER +). A efectos de comparación, se evaluó también la citotoxicidad de CDDP, el ligando libre **1** y el complejo AuClPPh₃ en las mismas condiciones experimentales.

Los resultados en la Tabla 4.1 muestran una actividad antiproliferativa distinta de los compuestos **2** y **3** de acuerdo con las líneas celulares ensayadas. El compuesto **3** resultó ser más activo que **2** en todas las líneas celulares estudiadas. A su vez ambos compuestos son extremadamente citotóxicos (IC_{50} submicromolar) para las células A2780. Este efecto, aunque alto, no es tan marcado para las líneas celulares

de cáncer de mama. Curiosamente, ambos compuestos exhiben la mayor actividad en la línea celular MDA-MB-231 triple negativa, llegando a ser aproximadamente 13 veces más citotóxicos que CDDP. Debe tenerse en cuenta que el ligando **1** no es citotóxico ($IC_{50} > 50 \mu M$ excepto para MDA-MB-231) y que el complejo AuCIPPh₃ muestra valores de IC_{50} relativamente bajos (5,60-14 μM), aunque siempre superiores a **3**.

Tabla 4.1. IC_{50} (μM) para CDDP, AuCIPPh₃ y compuestos **1-3** a 48 h.

Comp.	A2780	MDA-MB-231	SK-BR-3	MCF-7	LLC-PK1	EA.hy926
1	> 50	10,94 ± 0,56	> 50	> 50	-	-
2	0,88 ± 0,20	2,75 ± 0,40	3,62 ± 0,14	5,32 ± 0,65	8,56 ± 2,64	3,57 ± 0,16
3	0,40 ± 0,18	2,69 ± 0,87	1,98 ± 0,33	2,35 ± 0,39	2,57 ± 0,38	1,17 ± 0,07
AuCIPPh ₃	14±1	10,33 ± 3,81	5,60 ± 0,24	8,68 ± 0,29	-	-
CDDP	2,88 ± 0,09	34,90 ± 7,54	7,79 ± 0,56	12,58±1,88	3,10 ± 0,07	9,86 ± 0,36

Debido a la alta estabilidad de **2** y **3** en disolución, no se detectó ningún ligando libre por RMN ¹H después de 24 h de incubación en mezclas de DMSO-d₆/D₂O (1:1) y DMSO-d₆/D₂O (100 mM NaCl) (1:1), el efecto citotóxico se atribuyó exclusivamente a los complejos de oro o a sus metabolitos.

4.2.2. Selectividad celular

La selectividad diferencial de un fármaco frente a células cancerosas y a células normales aumenta la probabilidad de citotoxicidad específica del cáncer, reduciendo los efectos secundarios. Como la nefrotoxicidad es uno de los efectos secundarios más agresivos de la quimioterapia, se determinó también la actividad antitumoral *in vitro* de **2** y **3** en una línea celular sana de riñón, LLC-PK1 (Tabla 4.1). Se encontró que el complejo **2** era menos tóxico que el CDDP y consecuentemente, los valores del factor de selectividad (IC_{50} de los compuestos para células normales de riñón divididas por el IC_{50} respecto de las células malignas) proporcionan evidencia de una citotoxicidad preferente de los compuestos hacia células cancerosas. Los compuestos **2** y **3** fueron más selectivos que CDDP (Figura 4.3), de 6 a 9 veces en A2780 y de 10 a 35 en células MDA-MB-231. Asimismo, se calcularon los valores de IC_{50} para **2** y **3** en la línea celular EA.hy926 (Tabla 4.1) con el objetivo de verificar que el efecto antiangiogénico no era debido a un efecto citotóxico sino más bien a su potencial antiangiogénico (ver más adelante).

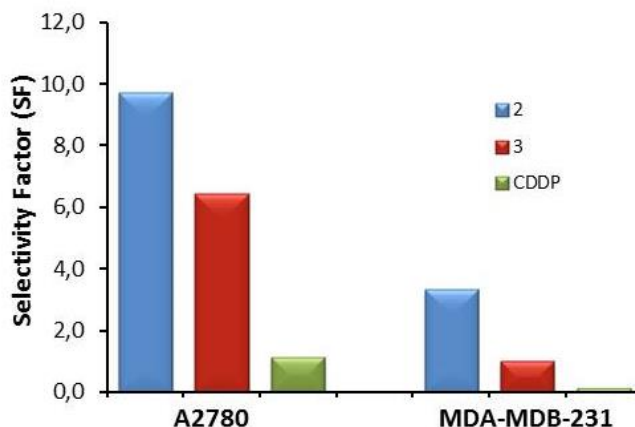


Figura 4.3. Factor de selectividad para las líneas celulares A2780 de cáncer de ovario y MDA-MB-231 de cáncer de mama.

4.2.3. Estudios de apoptosis y activación de caspasa-3

También se llevaron a cabo estudios apoptóticos con células MDA-MB-231 mediante análisis citométrico de flujo después de la exposición de fosfatidilserina con el kit de tinción de yoduro de propidio/tinción de anexina V-FLUOS. Los resultados se muestran en la Figura 4.4.

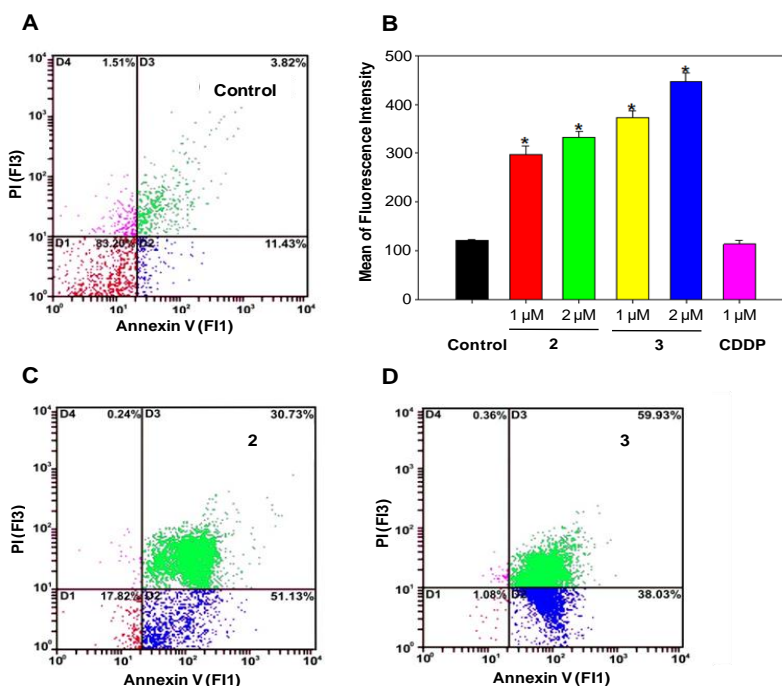


Figura 4.4. Apoptosis de células MDA-MB-231 después de 24 h para células control (A) y tratamiento con **2** (C) y **3** (D) usando anexina V/PI (a concentraciones de $2 \times IC_{50}$). Activación de caspasa-3 en células MDA-MB-231 por exposición a los complejos **2**, **3** y CDDP (B). * $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo.

Como se observa, los compuestos **2** y **3** inducen una alta incidencia de apoptosis (82 y 98 % respectivamente) en células MDA-MB-231 sin aumentar la población necrótica (< 1 %). Se observaron resultados similares en células MCF-7

después de 24 h de incubación con compuestos **2** y **3** (Figura 4.5). El encogimiento celular y la morfología mostrada en la Figura 4.9 también fueron consistentes con este tipo de muerte celular.

Para clarificar el mecanismo por el cual los complejos inducen la apoptosis, se estudió la actividad de la caspasa-3, una cisteína proteasa que desempeña papeles esenciales en la apoptosis, necrosis e inflamación,⁴⁴ utilizando el kit de detección de fluorescencia de caspasa-3 (FITC-DEVD-FMK) en células MDA-MB-231 (Figura 4.4B) y MCF-7 (Figura 4.5B) después de 24 h de exposición a los complejos **2** y **3** (1 y 2 μ M). En la Figura 4.4B y Figura 4.5B, se observa un aumento de la actividad de caspasa-3 para los compuestos con respecto al control y CDDP. Por lo tanto, **2** y **3** inducen la apoptosis mediante la activación de la caspasa-3 *in vitro*.

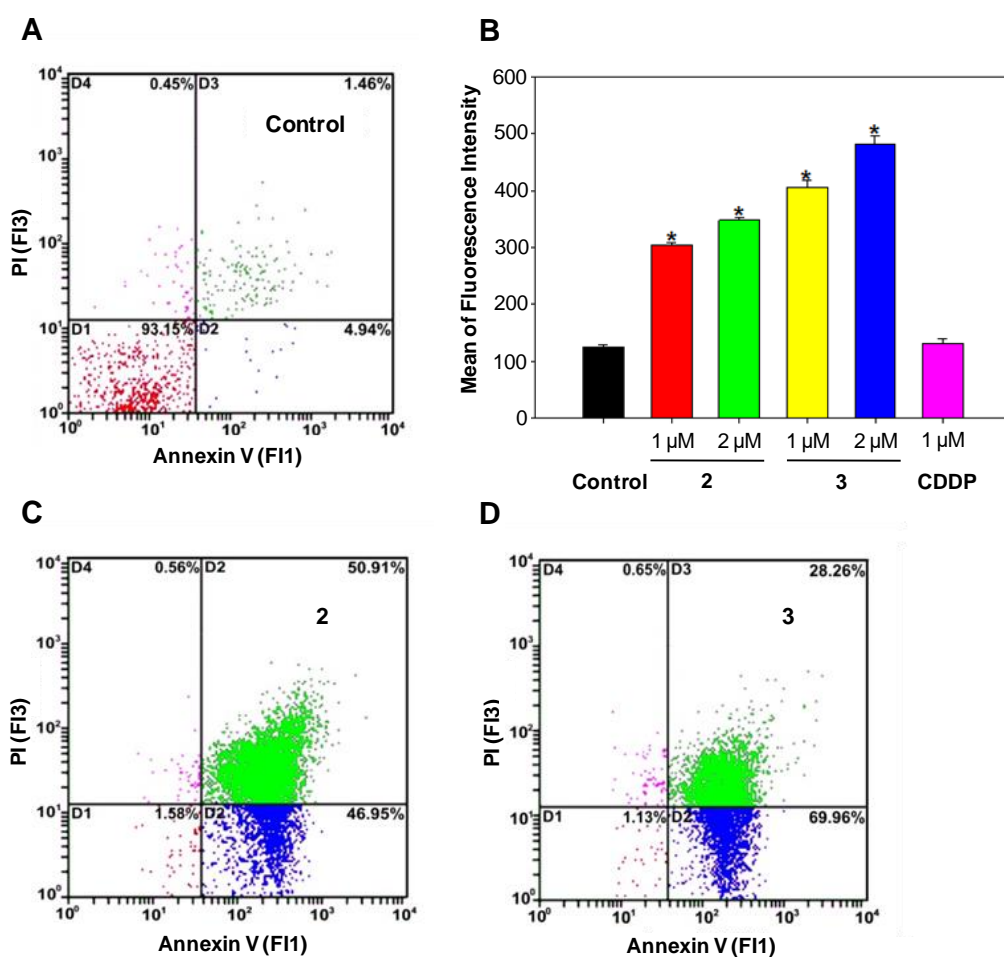


Figura 4.5. Análisis de apoptosis de células MCF-7 después de 24 h para células no tratadas (A) y tratamiento con **2** (C) y **3** (D) usando un ensayo de anexina V/PI (a concentraciones de $2 \times IC_{50}$). Activación de caspasa-3 en células MCF-7 causada por la exposición a los complejos **2**, **3** y CDDP (B). * $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo. Las barras de error indican \pm desviaciones estándar para dos conjuntos de tres puntos de datos para cada compuesto.

4.2.4. Detención del ciclo celular

Las células MDA-MB-231 se expusieron a los compuestos a concentraciones correspondientes a su IC₅₀ durante 24 h a 37 °C. A continuación, se recogieron y se trataron con 70 % de etanol, RNasa y se marcaron con IP para, finalmente, analizarse por citometría de flujo. Los histogramas obtenidos para los compuestos **2** y **3** se muestran en la Figura 4.6. Los complejos **2** y **3** provocaron una inducción significativa de la detención del ciclo celular en fase G₂/M, como se demuestra a partir de la población creciente en el pico G₂/M que acompaña de una reducción proporcional del G₀/G₁ y S (Figura 4.6B). Los puntos de control G₂/M bloquean la entrada en la mitosis como consecuencia de los agentes dañinos del ADN,^{45,46} produciendo la muerte celular mediante apoptosis.

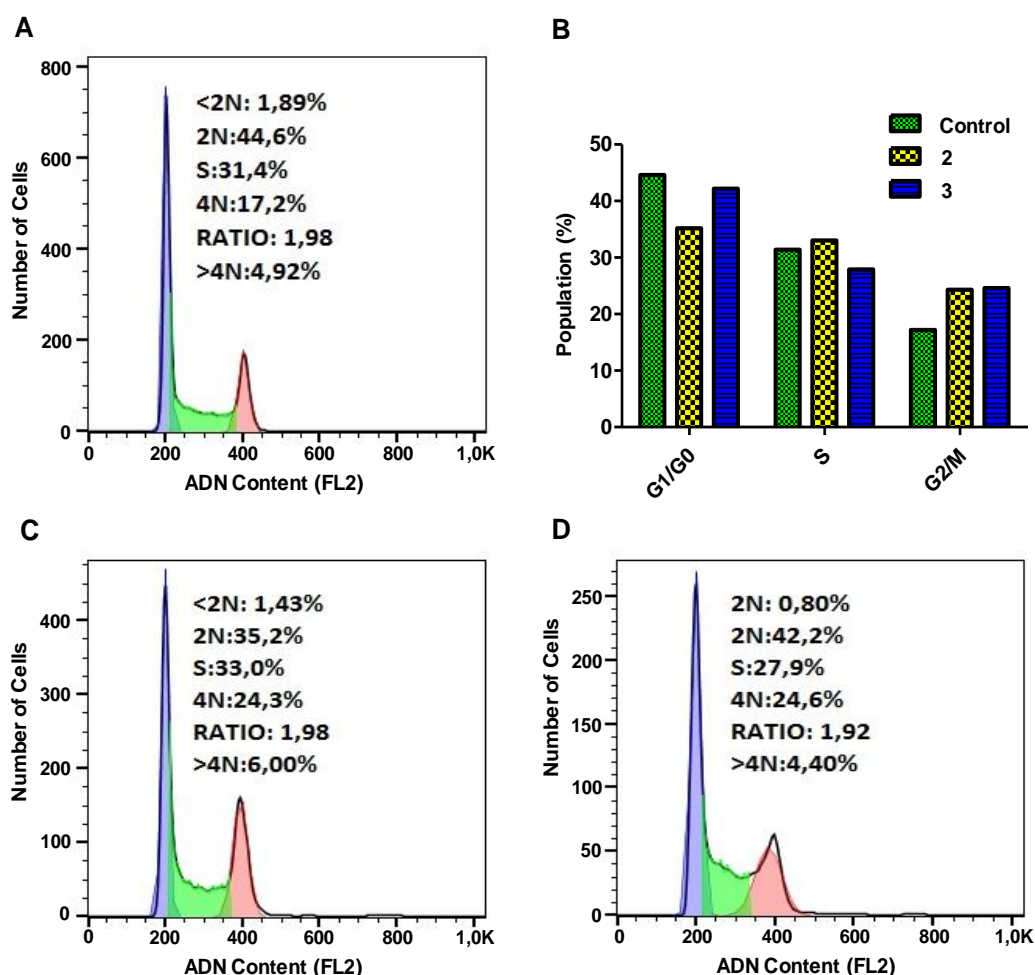


Figura 4.6. Análisis del ciclo celular de células MDA-MB-231. Intensidad de fluorescencia IP (FL2) para control negativo (A) y células expuestas a **2** (C) y **3** (D). Efecto de **2** y **3** en la distribución del ciclo celular estudiado después de 24 h de incubación (B).

4.2.5. Localización celular mediante microscopía confocal

Se investigó la distribución intracelular de **1-3** en células MCF-7. Las mitocondrias y los núcleos se marcaron durante 30 minutos con los marcadores

fluorescentes MitoTracker Red, para mitocondrias, y DAPI, para los núcleos (DAPI se une fuertemente a las regiones ricas en A-T), respectivamente, ambos a una concentración 100 nM. Después de 2 h de incubación con **2** (5 μM) y **3** (2 μM), los complejos se excitaron a una longitud de onda que no interfiere con los otros fluoróforos. La luminiscencia de **2** y **3** era claramente observable en las células tumorales (Figura 4.7F). El área de la emisión de **2** ó **3** (Figura 4.7E) no se superpone con el colorante MitoTracker Red (Figura 4.7G).

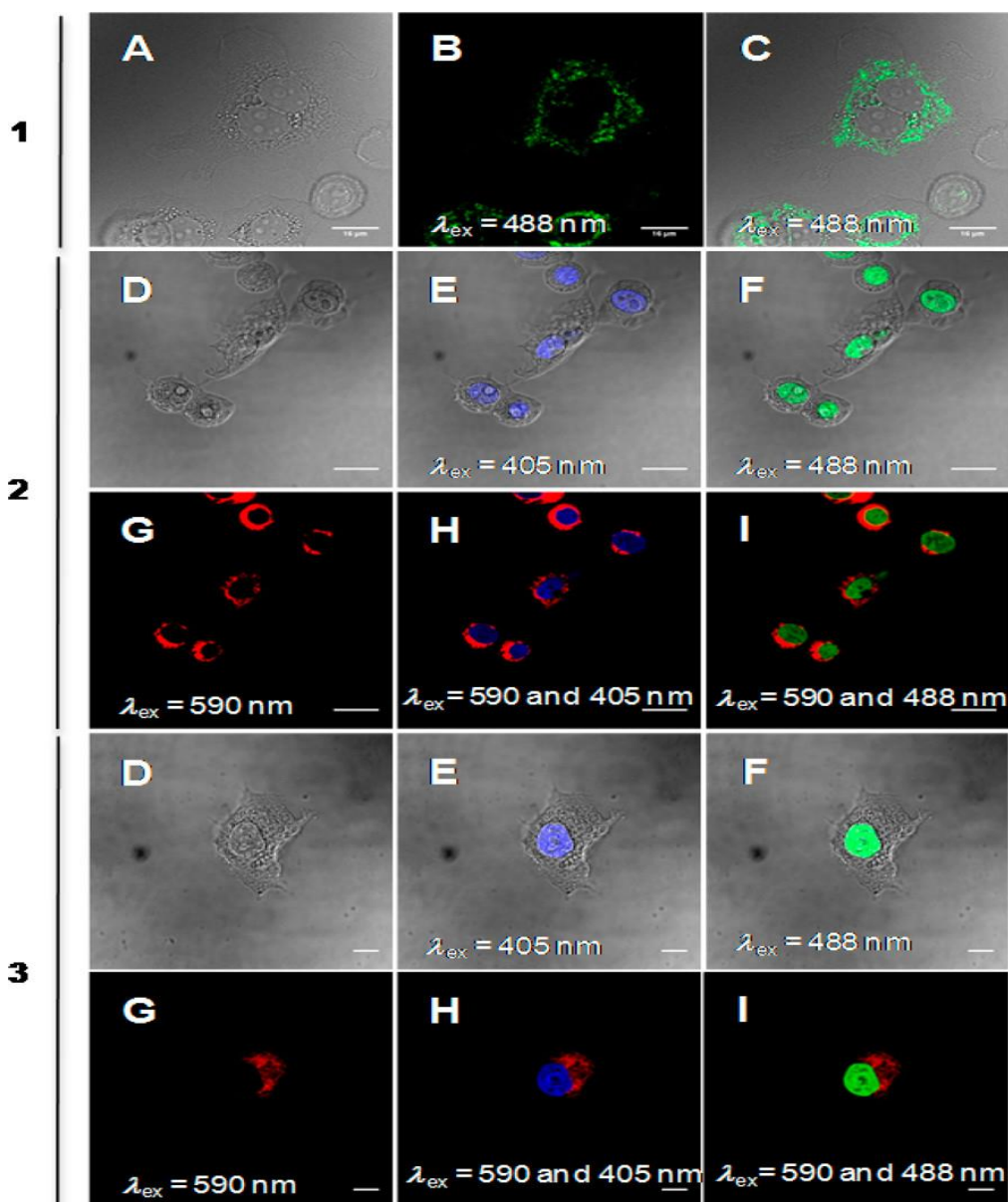


Figura 4.7. Determinación de la localización intracelular de **1-3** mediante experimentos de tinción con DAPI y MitoTracker Red en células MCF-7. Contraste de fase (A y D). Ligando **1** (B) y superposición de contraste de fase y 1 (C). Superposición de imágenes de DAPI y contraste de fase (E). Imagen de superposición de los compuestos **2** o **3** y contraste de fase (F). Imágenes de fluorescencia de MitoTracker Red (G). Imágenes de excitación doble de DAPI y MitoTracker Red (H). Imagen de excitación doble de **2** o **3** y MitoTracker Red (I). Barra de escala = 30 μm .

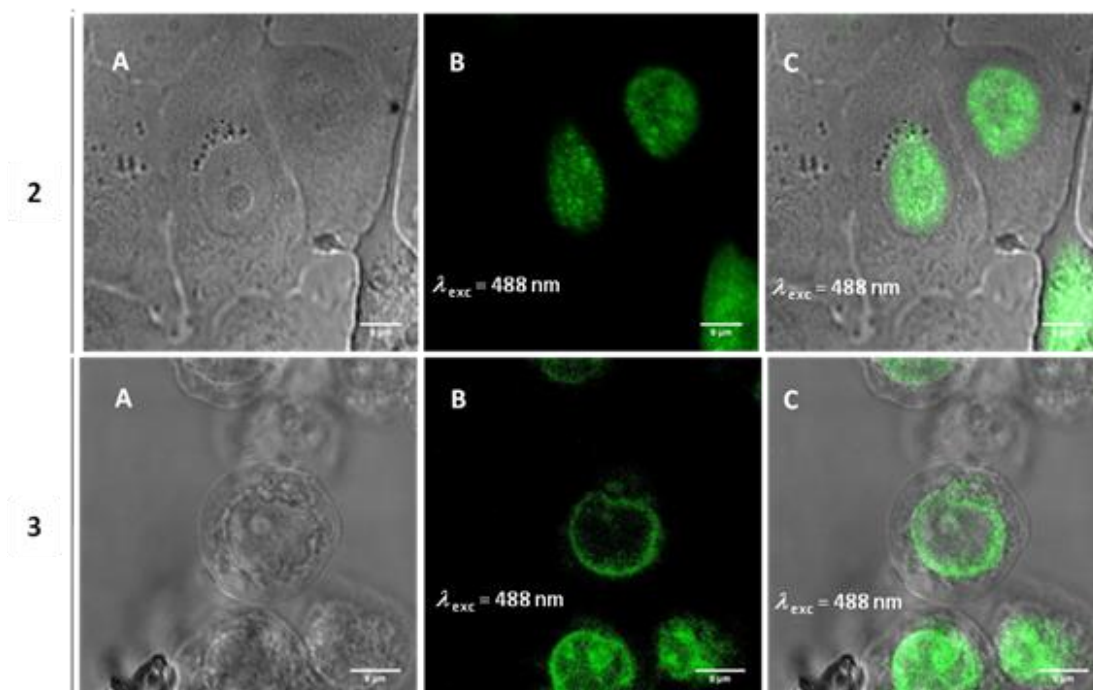


Figura 4.8. Microscopía confocal de MCF-7 tratadas con los complejos **2** y **3**. Las células se expusieron durante 2 horas a los complejos. Contraste de fases (**A**), Fluorescencia (**B**), superposición de las dos anteriores (**C**). Barra de escala: 8 μm .

Con el fin de evitar la posible interferencia de fluorescencia de DAPI en el experimento anterior, hemos realizado también estudios de microscopía confocal con células MCF-7 tratadas exclusivamente con los compuestos **2** o **3**, Figura 4.8. Esta Figura muestra claramente que los complejos se acumulan principalmente en el núcleo. Además, como se muestra en las Figuras 4.7B y 4.7C, el ligando **1** es un emisor fuerte en el citosol de células MCF-7, pero, sorprendentemente, no en el núcleo en las mismas condiciones experimentales utilizadas para los complejos **2** y **3**. Este resultado bastante inesperado podría ser una de las razones de la falta de citotoxicidad de **1** en esta línea celular de cáncer. De hecho, la ausencia de fluorescencia en el núcleo del ligando **1** puede explicarse asumiendo que 2 h no es suficiente tiempo para acumularse en dicho orgánulo, aunque otra posibilidad podría ser un proceso de enfriamiento en este organelo.⁴⁷ Cabe destacar, también, la ausencia de emisión extranuclear en la Figura 4.7F, que indica que no existe disociación significativa del ligando de acridina en el citoplasma.

4.2.6. Microscopía electrónica de transmisión

Esta técnica puede ser muy útil para el estudio de células cancerosas tratadas con los complejos de oro, ya que se trata de un metal de la tercera serie de transición y, por lo tanto, presenta una alta densidad electrónica. No se añadió ninguno de los

agentes de tinción convencionales; en consecuencia, las imágenes de contraste sólo se debieron al fármaco de oro añadido. Se observaron secciones ultrafinas de células MDA-MB-231 y MCF-7 tratadas con **2** y **3** (2 μ M) a 37 °C durante 24 h mediante TEM, como se muestra en la Figura 4.9. Se observa un mayor contraste, en particular en el núcleo y nucleolo, para células tratadas con **2** (Figuras 4.9B y 4.9E) y **3** (Figuras 4.9C y 4.9F) en comparación con el control. Además, se observa más densidad electrónica tanto en la eucromatina como en la heterocromatina en células tratadas con ambos complejos en comparación con el control. Los resultados están de acuerdo con la microscopía confocal e indican que estos compuestos interactúan principalmente con el ADN nuclear. Además, cabe destacar que algunas células mostraron cambios relacionados con la apoptosis, como las ampollas en la superficie celular (Figura 4.9B) y vacuolización citoplasmática (Figura 4.9F).

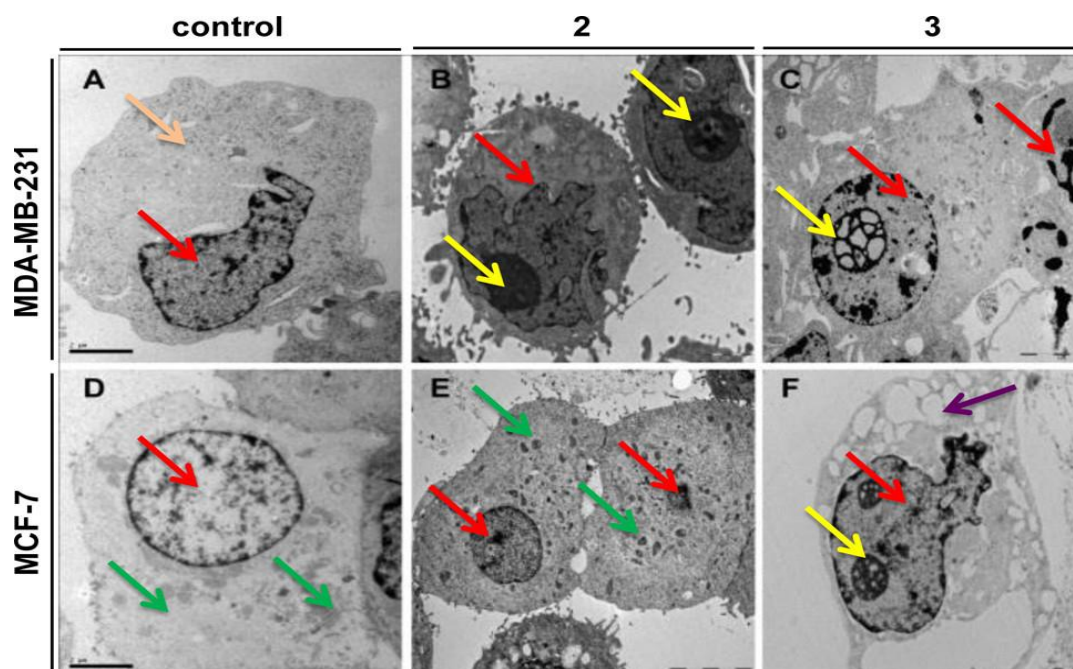


Figura 4.9. Imágenes TEM de células MDA-MB-231 no tratadas (A) y tratadas con **2** (B), **3** (C). Imágenes de células MCF-7 no tratadas (D) o tratadas con **2** (E), **3** (F). Se puede distinguir el núcleo (\rightarrow), el nucleolo (\rightarrow), las mitocondrias (\rightarrow), la vacuolización citoplasmática (\rightarrow) y el citoplasma (\rightarrow). También se observan células en una etapa temprana (E) o tardía (C) de apoptosis.

4.2.7. Estudios de internalización celular y acumulación.

Se han realizado estudios de internalización para **1-3** (5 μ M) en células A2780 y MCF-7 después de diferentes tiempos de incubación (2 min, 30 min y 1 h) aplicando citometría de flujo. Como se muestra en la Figura 4.10, el ligando libre **1** y los nuevos complejos son capaces de ingresar en células cancerosas muy fácilmente (incluso después de 2 min).

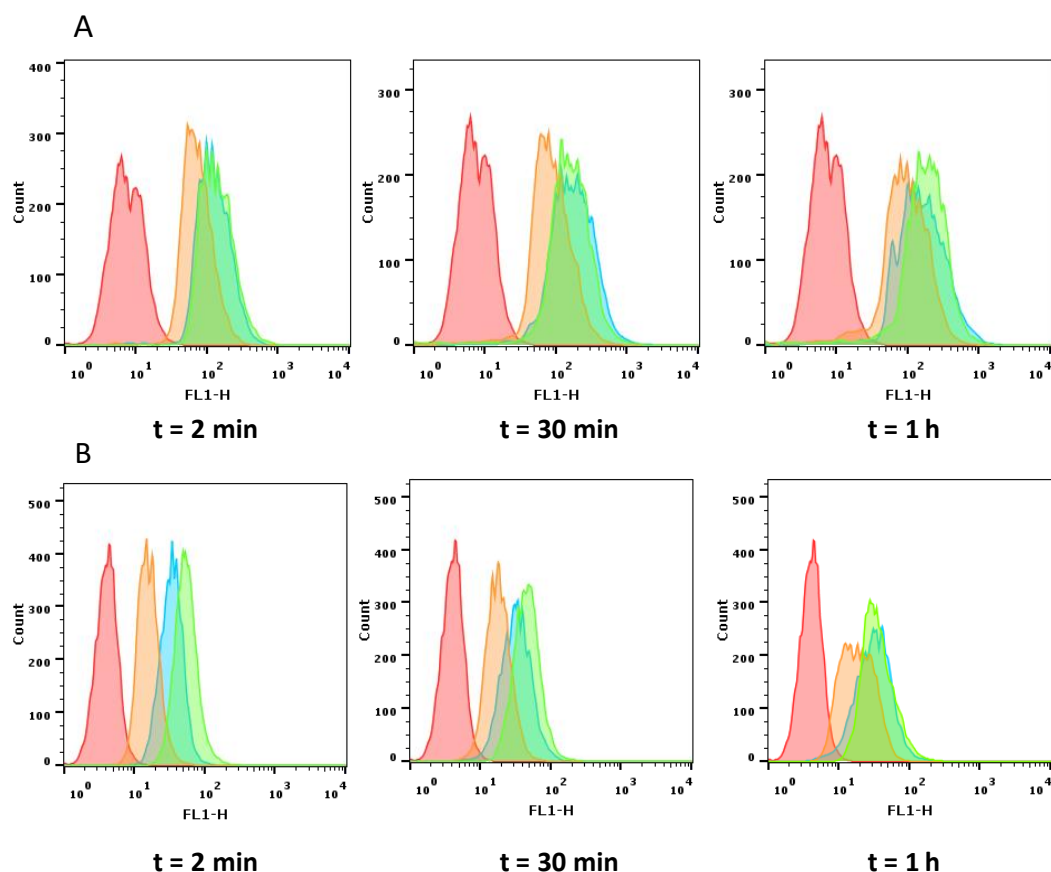


Figura 4.10. Internalización de **1-3** en células vivas usando citometría de flujo. Fluorescencia asociada a la línea celular MCF-7 (A) y A2780 (B). Fluorescencia celular tratada con **1** (azul), **2** (naranja), **3** (verde) at 5 μM y células sin tratar (rojo).

Tanto las células A2780 como MCF-7 no mostraron autofluorescencia (controles negativos en la Figura 4.10, rojo). Se estudió también la acumulación celular de los complejos de oro en la línea A2780 por ICP-MS con el fin de tratar de encontrar la posible relación entre la acumulación celular y la citotoxicidad de estos compuestos. Las concentraciones celulares se determinaron mediante ICP-MS después de 24 h de exposición a concentración 1 μM de los complejos.⁴⁸ Los resultados se resumen en la Tabla 4.2. Se encontró una relación directa entre la acumulación de Au y la actividad en la línea celular A2780. Por otra parte, también realizamos estudios para determinar la hidrofobicidad de ambos compuestos, definida esta como $\log P$ (donde P es el cociente de las concentraciones del compuesto en octanol y en agua, Tabla 4.2). El complejo más hidrófobo, **3**, dos veces más citotóxico que **2** (Tabla 4.1), se acumula en mayor medida en las células A2780. Por lo tanto, existe también una clara relación entre una mayor hidrofobicidad y un aumento en la acumulación celular. Dado que un aumento de la lipofilia causa una mayor acumulación celular, es probable que la difusión pasiva desempeñe un papel importante en el mecanismo de acumulación celular de estos complejos.⁴⁸

Tabla 4.2. Acumulación de compuestos de oro y CDDP (células A2780 tratadas durante 24 h a 1 μM) y valores de log *P*.

	pmol/10 ⁶ células ^a	ng/10 ⁶ cells ^a	log <i>P</i> ^b
2	39 ± 2	7,6 ± 0,4	0,57 ± 0,07
3	59 ± 4	12 ± 1	0,79 ± 0,03
CDDP	10 ± 2	1,9 ± 0,4	-2,30 ± 0,04

^a Acumulación total de los compuestos ensayados.

^b Log *P* (octanol/agua) a temperatura ambiente.

Todos los resultados están expresados como la media ± SD de tres experimentos independientes.

Los resultados de la localización celular para **2** y **3** mediante microscopía confocal y microscopía electrónica de transmisión (apdo. 2.5 y 2.6 de Materiales y Métodos) muestran que ambos complejos se acumulan preferentemente en el núcleo celular, donde se localiza el ADN. Por lo tanto, es razonable suponer que ambos compuestos, después de acumularse en las células tumorales, interactúan preferentemente con el ADN en el núcleo de la célula y no con el ARN.

4.2.8. Actividad mitocondrial

Se estudió la posible actividad desestabilizadora mitocondrial de los compuestos **2** y **3** mediante la determinación de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) intracelular y del potencial de la membrana mitocondrial en células MCF-7 y MDA-MB-231 (Figura 4.11). Se utilizó diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (DCFH-DA, apdo. 2.11) aplicando citometría de flujo.⁴⁹⁻⁵¹ Después de 24 h de incubación de células con **2** o **3** (1 ó 2 μM , una concentración próxima a su IC₅₀) y 30 minutos después de la adición de DCFH-DA, se determinó la fluorescencia verde resultante del producto de oxidación DCF (2',7'-diclorofluoresceína). No se observaron incrementos de producción de ROS después de la exposición de **2** y **3** con respecto al control.

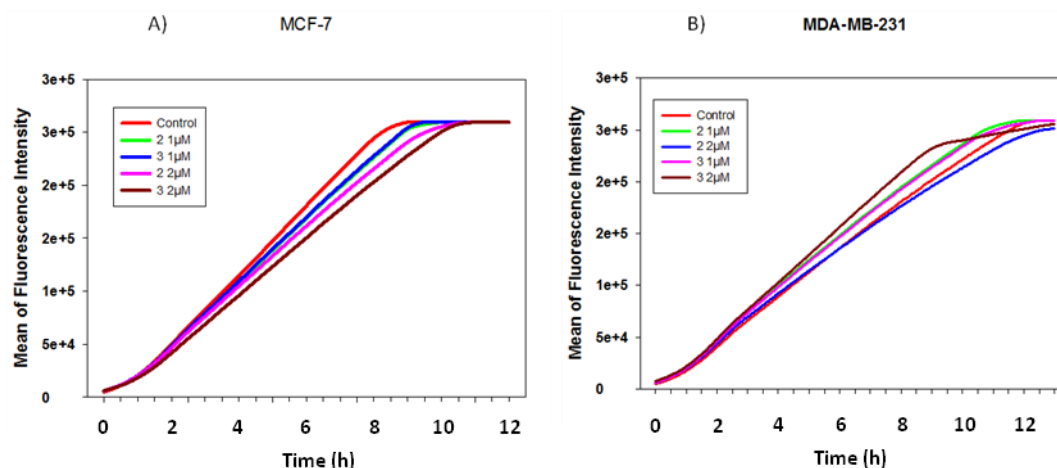


Figura 4.11. Análisis de los niveles de ROS producidos por la exposición de **2** y **3** en función del tiempo de exposición en las líneas celulares: A) MCF-7 y B) MDA-MB-231.

Las mitocondrias mantienen un alto potencial transmembrana negativo en su membrana interna debido a la generación de ATP a lo largo de la cadena de transporte de electrones. Esta propiedad física única puede ser explotada para la focalización mitocondrial usando restos cargados positivamente. Por ejemplo, Rho-123, un colorante lipofílico fluorescente con una carga positiva deslocalizada ($pK_a > 10$) en los anillos del xanteno, es altamente específico para las mitocondrias en células vivas.⁵²⁻⁵⁴ La pequeña variación en la fluorescencia de Rho-123 después del tratamiento a las células MCF-7 y MDA-MB-231 con los complejos (Figura 4.12) no indica cambios en el potencial de la membrana mitocondrial. Estos resultados apoyan la idea de que los complejos exhiben su actividad antitumoral a través de un mecanismo de acción dependiente del ADN.

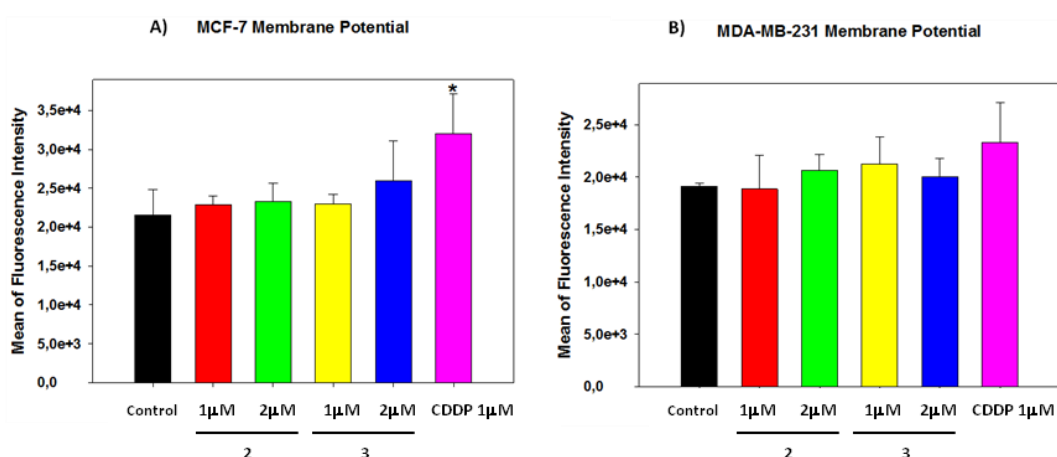


Figura 4.12. Medidas del potencial de membrana para los complejos **2**, **3** y cisplatino (1 y 2 μ M) cuando se exponen a A) MCF-7 y B) MDA-MB-231 después de 24 h. Las barras de error indican \pm la desviación estándar de la media de dos experimentos independientes con tres replicas.

4.2.9. Inhibición de la topoisomerasa I

Las topoisomerasas de ADN son enzimas esenciales implicadas en la regulación del superenrollamiento del ADN. Estas enzimas participan en casi todos los eventos relacionados con la estructura y función del ADN, incluyendo la replicación, la transcripción, la recombinación y la remodelación de la cromatina. Las topoisomerasas han sido identificadas como dianas clínicamente importantes para la quimioterapia contra el cáncer, y sus inhibidores se consideran agentes anticancerígenos prometedores.⁵⁵⁻⁵⁷ Además, los inhibidores de la topoisomerasa I a menudo se asocian con la unión intercalante al ADN.⁵⁸

Se utilizó un ensayo de relajación de ADN para examinar si la actividad de la topoisomerasa I eucariótica se ve afectada por la presencia de los complejos Au(I) (Figura 4.13).

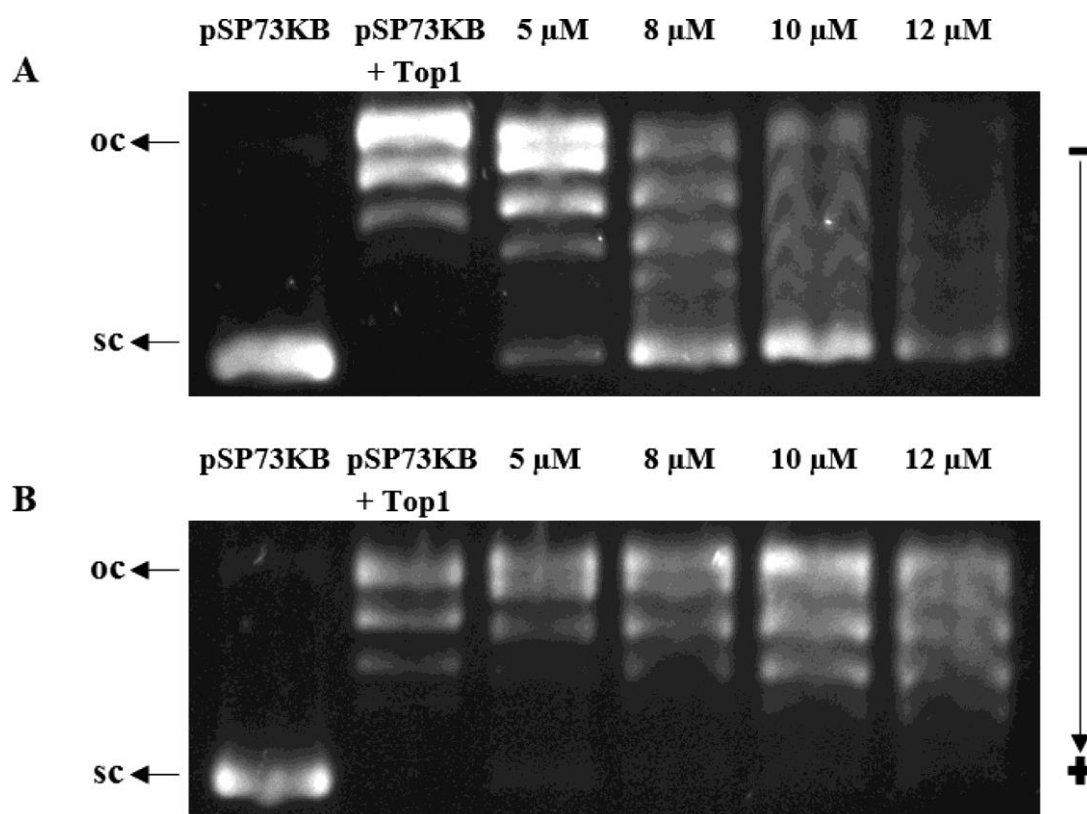


Figura 4.13. Relajación mediada por topo I del plásmido pSP73KB superenrollado negativamente (6.25×10^{-5} M) en ausencia o presencia de concentraciones crecientes en el intervalo de 0-12 μM de los complejos **2** (A) y **3** (B) analizados por electroforesis en gel de agarosa. SC = superenrollado; OC = circular abierta.

Este ensayo está basado en la monitorización de la conversión de plásmido negativo pSP73KB superenrollado de forma natural y preincubado con concentraciones crecientes de los complejos de Au(I) usando electroforesis en gel de

agarosa. Se evaluó el efecto de los compuestos **2** y **3** sobre la acción de la topoisomerasa I comparando el grado de relajación del plásmido superenrollado no modificado con el del plásmido modificado por el complejo Au(I). Los diferentes grados de relajación del plásmido presentan distintas movilidades electroforéticas en el gel. Los complejos de Au(I), **2** ó **3**, mostraron un efecto dependiente de la dosis sobre el desenrollamiento del ADN mediado por la topoisomerasa I (Figura 4.13). El complejo **2** poseía una actividad inhibitora algo mayor en la actividad de relajación de la topoisomerasa I. Por lo tanto, los resultados de los experimentos basados en el presente ensayo son consistentes con que ambos complejos, **2** o **3**, puedan unirse al ADN mediante intercalación.⁵⁹

4.2.10. Inhibición de la formación de tubos vasculares

La angiogénesis se evalúa a menudo por la capacidad de las células endoteliales para brotar, migrar y formar tubos vasculares *in vitro* en la matriz de Matrigel.^{27,60} La angiogénesis *in vitro* se midió 16 h después de incubar células EA.hy926 con los compuestos **2** y **3** a concentraciones subcitotóxicas (Tabla 4.1, Figura 4.14A para el complejo **2**). Se utilizó CDDP (1 μM) por comparación. Se cuantificó la formación resultante o inhibición de estructuras de tipo capilar (Figuras 4.14B para **2** y Figura 4.15 para **3**) usando una combinación del número de redes y el área de redes totales (μm^2).

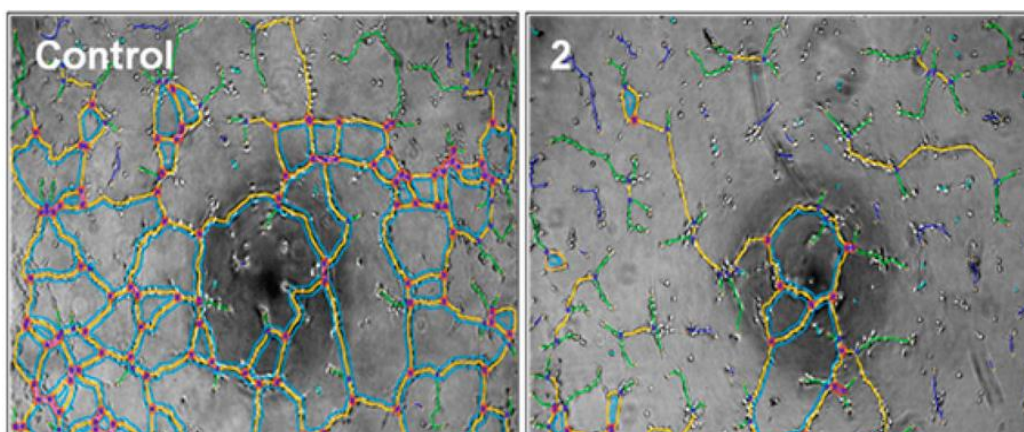


Figura 4.14. Efecto del complejo **2** en el ensayo de formación de tubos de células endoteliales. Imágenes típicas después de un proceso ImageJ de células EA.hy926 (A). Cuantificación del número de redes y el área de redes totales de la estructura tubular de células EA.hy926 tratadas con el compuesto **2** y CDDP (B). * $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo. Las barras de error indican \pm desviaciones estándar para dos conjuntos de tres puntos de datos para cada compuesto.

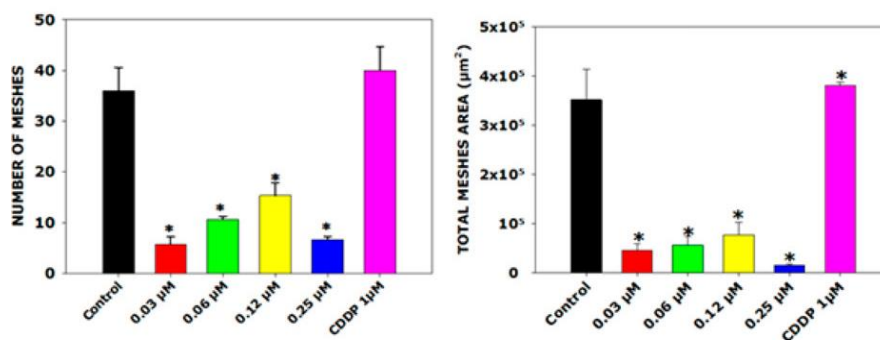


Figura 4.15. Cuantificación del efecto del complejo **3** en la formación de tubos endoteliales. Se cuantificó mediante el software ImageJ el número total de redes y el área total de las redes formadas por las células EA.hy926. Las barras de error indican \pm la desviación estandar de dos experimentos independientes con tres replicas para cada concentración. * $p < 0.05$ se considera estadísticamente significativo.

Ambos complejos inhiben la formación de tubos vasculares a $0,25 \mu\text{M}$ (concentración 14 y 4 veces menor que el IC_{50} de **2** y **3** en la línea celular EA.hy926, respectivamente). El efecto inhibitor de ambos compuestos permanece cuando la concentración se reduce hasta $0,06 \mu\text{M}$. Hay que señalar que **2** inhibe eficazmente la formación del tubo a $0,03 \mu\text{M}$, es decir, a una concentración 119 veces menor que su IC_{50} . En consecuencia, se concluye que la inhibición de la angiogénesis podría contribuir a las capacidades anticancerosas de estos compuestos. Se debe tener presente que el compuesto **2** inhibe la angiogénesis a concentraciones 30 veces inferiores que su IC_{50} en células A2780.

4.2.11. Inhibición de la mimetización vascular en células MDA-MB-231.

Las células MDA-MB-231 (apdo. 2.2.1 de Materiales y Metodos), altamente metastásicas, muestran la capacidad de imitar el patrón de las redes vasculogénicas encontradas en los tumores agresivos, un fenómeno conocido como mimetismo vasculogénico (VM). Teniendo en cuenta la potente actividad antiproliferativa contra el cáncer de mama metastásico, así como la actividad antiangiogénica, se evaluó el modo de acción de los compuestos **2** y **3** a las concentraciones sub- IC_{50} en células MDA-MB-231. Para ello, se realizaron experimentos similares utilizados para estudiar la angiogénesis, tales como la inhibición de la formación de tubos (Figura 4.16A y 4.16B) y la migración celular (Figura 4.16C y 4.16D). La reducción de la concentración de $2,0 \mu\text{M}$ y $1,0 \mu\text{M}$ se llevó a cabo con el fin de rechazar completamente el efecto citotóxico como responsable de la inhibición. En primer lugar, se midió la formación de tubos vasculares después de 16 h de incubación. Como puede observarse en la Figura 4.16B, ambos complejos inhiben

significativamente la estructura de formación de tipo capilar a 1 μM . Posteriormente, se realizó el ensayo de cicatrización de heridas basado en el raspado de las células y la medición de su capacidad para cerrarlo después de 8 h con y sin la adición de los compuestos.⁶¹ La Figura 4.16C muestra que **2** disminuyó la movilidad de las células MDA-MB-231 con respecto al control. En la Figura 4.16D se resumen los resultados para **2** y **3** como el porcentaje de área libre de células después del tratamiento durante 8 h.

A la vista de los resultados concluimos que estos compuestos inhiben significativamente la formación de estructuras capilares y la migración celular en células MDA-MB-231 a concentraciones en las que no se observaron efectos antiproliferativos significativos. Por tanto, estas dos características no se debían a dichos efectos.

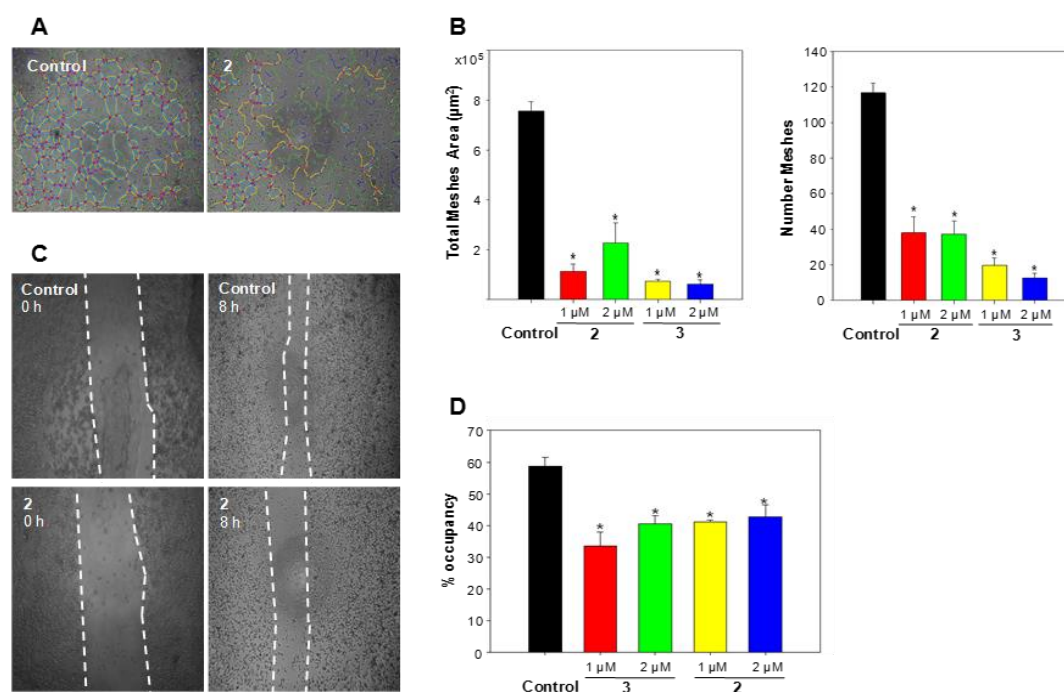


Figura 4.16. Efecto de complejos de oro en el desarrollo de VM en células MDA-MB-231 *in vitro*. Imágenes obtenidas con el programa ImageJ (apartado 8.1 de Materiales y Métodos) para un control y para **2** (1 μM durante 16 h) (A). Cuantificación, después del proceso de ImageJ, del número y del área de redes totales de las células MDA-MB-231 tratadas con **2** y **3** (B). Efecto de **2** en la migración de células MDA-MB-231. Imágenes típicas de la herida al comienzo del experimento y después de 8 h para el medio de cultivo (control) y con **2** (1 μM) (C). Porcentaje de ocupación (apartado 8.2 de Materiales y Métodos) de **2** y **3** en la migración de células MDA-MB-231 (D). * $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo. Las barras de error indican \pm desviaciones estándar de las medias para dos experimentos con tres puntos para cada compuesto.

4.3. Conclusiones

Se ha estudiado la actividad biológica de dos nuevos complejos monocatiónicos intercaladores de ADN de oro(I) con el ligando 1-acridin-9-il-3-metiltiourea, a saber: $[\text{Au}(\text{ACRTU})_2]\text{Cl}$ (**2**) y $[\text{Au}(\text{ACRTU})(\text{PPh}_3)]\text{PF}_6$ (**3**). Ambos compuestos son altamente activos en células A2780, sensibles al cisplatino, exhibiendo valores de IC_{50} en el rango submicromolar. Además, los compuestos **2** y **3** son también citotóxicos para las líneas de células de tumor de mama MDA-MB-231 (triple negativo), SK-BR-3 (HER2+, ER α - y ER β -) y MCF-7 (ER+). Hemos realizado un trabajo completo que contribuye a una comprensión más profunda del mecanismo de acción de una clase potencialmente interesante de nuevos agentes anticancerígenos. Los nuevos compuestos aumentaron la actividad caspasa-3 en células MCF-7 y MDA-MB-231. Asimismo, estos complejos no son capaces de aumentar la producción de ROS en células MCF-7 y MDA-MB-231 y no afectan el potencial de membrana de las mitocondrias.

El ligando **1** y los complejos **2** y **3** son fuertemente emisivos en las células. Los estudios de citometría de flujo revelan que todos ellos son capaces de internalizarse en células cancerosas muy rápidamente. Ambos complejos se localizaron en el núcleo de las células MCF-7 según se observó por TEM y por microscopía confocal. Por el contrario, el ligando **1** es un emisor fuerte en el citosol pero, sorprendentemente, no en el núcleo. Los nuevos complejos exhiben un efecto dependiente de la dosis sobre el desenrollamiento del ADN mediado por topoisomerasa I. Además, inhiben eficazmente la angiogénesis en la línea de células endoteliales de la vena umbilical humana inmortalizada EA.hy926 a concentraciones subcitotóxicas y muestran tanto comportamiento antimimético vasculogénico como propiedades antimigratorias en la línea celular altamente invasiva MDA-MB-231. En resumen, en este trabajo hemos resaltado el valor de la angiogénesis y la mimetización vasculogénica como estrategia para la terapia contra el cáncer y hemos discutido los beneficios del desarrollo de moléculas pequeñas que exhiben estas propiedades además de su citotoxicidad.

4.4. Bibliografía

1. Teoh, D. G.; Secord, A. A. "Antiangiogenic therapies in epithelial ovarian cancer", **2011**, *Cancer Control*, (18), 31-43.
2. Barry, N. P.; Sadler, P. J. "Exploration of the medical periodic table: towards new targets", **2013**, *Chem Commun*, (49), 5106-5131.
3. Kelland, L. "The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy", **2007**, *Nat Rev Cancer*, (7), 573-584.

4. Wang, D.; Lippard, S. J. "Cellular processing of platinum anticancer drugs", **2005**, Nat Rev Drug Discov, (4), 307-320.
5. Kelland, L. R. "Preclinical perspectives on platinum resistance", **2000**, Drugs, (59 Suppl 4), 1-8; discussion 37-38.
6. Rackham, O.; Nichols, S. J.; Leedman, P. J.; Berners-Price, S. J.; Filipovska, A. "A gold(I) phosphine complex selectively induces apoptosis in breast cancer cells: Implications for anticancer therapeutics targeted to mitochondria", **2007**, Biochem Pharmacol, (74), 992-1002.
7. Ott, I.; Gust, R. "Non Platinum Metal Complexes as Anti-cancer Drugs", **2007**, Archiv der Pharmazie, (340), 117-126.
8. Gasser, G.; Ott, I.; Metzler-Nolte, N. "Organometallic Anticancer Compounds", **2011**, J Med Chem, (54), 3-25.
9. Wachter, E.; Zamora, A.; Heidary, D. K.; Ruiz, J.; Glazer, E. C. "Geometry matters: inverse cytotoxic relationship for cis/trans-Ru(II) polypyridyl complexes from cis/trans-[PtCl₂(NH₃)₂]", **2016**, Chem Commun (Camb), (52), 10121-10124.
10. Liu, W.; Gust, R. "Metal N-heterocyclic carbene complexes as potential antitumor metallodrugs", **2013**, Chem Soc Rev, (42), 755-773.
11. Ott, I. "On the medicinal chemistry of gold complexes as anticancer drugs", **2009**, Coord Chem Rev, (253), 1670-1681.
12. Che, C.-M.; Sun, R. W.-Y. "Therapeutic applications of gold complexes: lipophilic gold(III) cations and gold(I) complexes for anti-cancer treatment", **2011**, Chem Comm, (47), 9554-9560.
13. Meyer, A.; Bagowski, C. P.; Kokoschka, M.; Stefanopoulou, M.; Alborzinia, H.; Can, S.; Vlecken, D. H.; Sheldrick, W. S.; Wolf, S.; Ott, I. "On the biological properties of alkynyl phosphine gold(I) complexes", **2012**, Angew Chem Int Ed Engl, (51), 8895-8899.
14. Tiekink, E. R. T. "Phosphinegold(I) Thiolates – Pharmacological Use and Potential", **2003**, Bioinorg ChemAppl, (1), 53-67.
15. Hickey, J. L.; Ruhayel, R. A.; Barnard, P. J.; Baker, M. V.; Berners-Price, S. J.; Filipovska, A. "Mitochondria-targeted chemotherapeutics: the rational design of gold(I) N-heterocyclic carbene complexes that are selectively toxic to cancer cells and target protein selenols in preference to thiols", **2008**, J Am Chem Soc, (130), 12570-12571.
16. Baker, M. V.; Barnard, P. J.; Berners-Price, S. J.; Brayshaw, S. K.; Hickey, J. L.; Skelton, B. W.; White, A. H. "Cationic, linear Au(I) N-heterocyclic carbene complexes: synthesis, structure and anti-mitochondrial activity", **2006**, Dalton Trans, 3708-3715.
17. Ott, I.; Qian, X.; Xu, Y.; Vlecken, D. H.; Marques, I. J.; Kubutat, D.; Will, J.; Sheldrick, W. S.; Jesse, P.; Prokop, A.; Bagowski, C. P. "A gold(I) phosphine complex containing a naphthalimide ligand functions as a TrxR inhibiting antiproliferative agent and angiogenesis inhibitor", **2009**, J Med Chem, (52), 763-770.
18. Rubbiani, R.; Salassa, L.; de Almeida, A.; Casini, A.; Ott, I. "Cytotoxic Gold(I) N-heterocyclic Carbene Complexes with Phosphane Ligands as Potent Enzyme Inhibitors", **2014**, ChemMedChem, (9), 1205-1210.
19. Yang, M.; Pickard, A. J.; Qiao, X.; Gueble, M. J.; Day, C. S.; Kucera, G. L.; Bierbach, U. "Synthesis, Reactivity, and Biological Activity of Gold(I) Complexes Modified with Thiourea-Functionalized Tyrosine Kinase Inhibitors", **2015**, Inorg Chem, (54), 3316-3324.

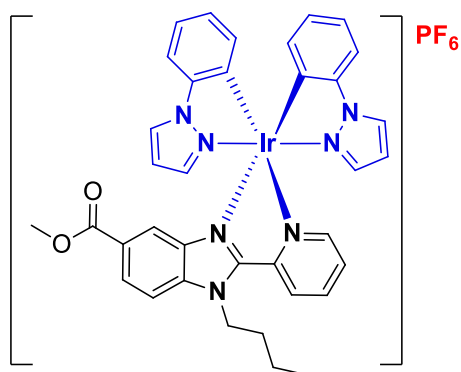
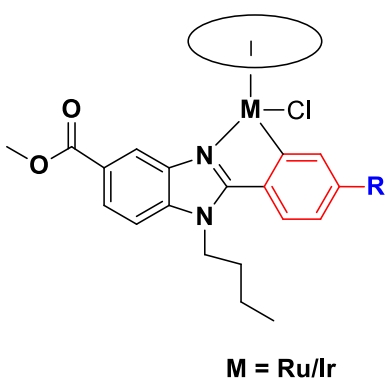
20. Yan, K.; Lok, C. N.; Bierla, K.; Che, C. M. "Gold(I) complex of *N,N'*-disubstituted cyclic thiourea with *in vitro* and *in vivo* anticancer properties-potent tight-binding inhibition of thioredoxin reductase", **2010**, Chem Commun, (46), 7691-7693.
21. Ronconi, L.; Marzano, C.; Zanello, P.; Corsini, M.; Miolo, G.; Macca, C.; Trevisan, A.; Fregona, D. "Gold(III) dithiocarbamate derivatives for the treatment of cancer: solution chemistry, DNA binding, and hemolytic properties", **2006**, J Med Chem, (49), 1648-1657.
22. Casini, A.; Cinellu, M. A.; Minghetti, G.; Gabbiani, C.; Coronello, M.; Mini, E.; Messori, L. "Structural and Solution Chemistry, Antiproliferative Effects, and DNA and Protein Binding Properties of a Series of Dinuclear Gold(III) Compounds with Bipyridyl Ligands", **2006**, J Med Chem, (49), 5524-5531.
23. Yan, J. J.; Chow, A. L.-F.; Leung, C.-H.; Sun, R. W.-Y.; Ma, D.-L.; Che, C.-M. "Cyclometalated gold(III) complexes with *N*-heterocyclic carbene ligands as topoisomerase I poisons", **2010**, Chem Comm, (46), 3893-3895.
24. Cao, Y. "Future options of anti-angiogenic cancer therapy", **2016**, Chin J Cancer, (35), 21.
25. Maj, E.; Papiernik, D.; Wietrzyk, J. "Antiangiogenic cancer treatment: The great discovery and greater complexity (Review)", **2016**, Int J Oncol, (49), 1773-1784.
26. Folkman, J. "Endogenous angiogenesis inhibitors", **2004**, Apmis, (112), 496-507.
27. Aranda, E.; Owen, G. I. "A semi-quantitative assay to screen for angiogenic compounds and compounds with angiogenic potential using the EA.hy926 endothelial cell line", **2009**, Biol Res, (42), 377-389.
28. Ma, J.; Waxman, D. J. "Combination of Anti-angiogenesis with Chemotherapy for More Effective Cancer Treatment", **2008**, Mol canc thera, (7), 3670-3684.
29. Rademaker-Lakhai, J. M.; van den Bongard, D.; Pluim, D.; Beijnen, J. H.; Schellens, J. H. "A Phase I and pharmacological study with imidazolium-trans-DMSO-imidazole-tetrachlororuthenate, a novel ruthenium anticancer agent", **2004**, Clin Cancer Res, (10), 3717-3727.
30. Yang, L.; Zhang, J.; Wang, C.; Qin, X.; Yu, Q.; Zhou, Y.; Liu, J. "Interaction between 8-hydroxyquinoline ruthenium(II) complexes and basic fibroblast growth factors (bFGF): inhibiting angiogenesis and tumor growth through ERK and AKT signaling pathways", **2014**, Metallomics, (6), 518-531.
31. Nowak-Sliwinska, P.; van Beijnum, J. R.; Casini, A.; Nazarov, A. A.; Wagnieres, G.; van den Bergh, H.; Dyson, P. J.; Griffioen, A. W. "Organometallic ruthenium(II) arene compounds with antiangiogenic activity", **2011**, J Med Chem, (54), 3895-3902.
32. Liu, L.-J.; Lin, S.; Chan, D. S.-H.; Vong, C. T.; Hoi, P. M.; Wong, C.-Y.; Ma, D.-L.; Leung, C.-H. "A rhodium(III) complex inhibits LPS-induced nitric oxide production and angiogenic activity in cellulose", **2014**, J Inorg Biochem, (140), 23-28.
33. Wilbuer, A.; Vlecken, D. H.; Schmitz, D. J.; Kraling, K.; Harms, K.; Bagowski, C. P.; Meggers, E. "Iridium complex with antiangiogenic properties", **2010**, Angew Chem Int Ed Engl, (49), 3839-3842.
34. Nazarov, A. A.; Baquie, M.; Nowak-Sliwinska, P.; Zava, O.; van Beijnum, J. R.; Groessl, M.; Chisholm, D. M.; Ahmadi, Z.; McIndoe, J. S.; Griffioen, A. W.; van den Bergh, H.; Dyson, P. J. "Synthesis and characterization of a new class of anti-angiogenic agents based on ruthenium clusters", **2013**, Sci Rep, (3), 1485.
35. Sun, R. W.; Ng, M. F.; Wong, E. L.; Zhang, J.; Chui, S. S.; Shek, L.; Lau, T. C.; Che, C. M. "Dual anti-angiogenic and cytotoxic properties of ruthenium(III) complexes containing pyrazolato and/or pyrazole ligands", **2009**, Dalton Trans, 10712-10716.

36. Clavel, C. M.; Paunescu, E.; Nowak-Sliwinska, P.; Griffioen, A. W.; Scopelliti, R.; Dyson, P. J. "Discovery of a highly tumor-selective organometallic ruthenium(II)-arene complex", **2014**, J Med Chem, (57), 3546-3558.
37. Muenzner, J. K.; Biersack, B.; Kalie, H.; Andronache, I. C.; Kaps, L.; Schuppan, D.; Sasse, F.; Schobert, R. "Gold(I) biscarbene complexes derived from vascular-disrupting combretastatin A-4 address different targets and show antimetastatic potential", **2014**, ChemMedChem, (9), 1195-1204.
38. Muenzner, J. K.; Rehm, T.; Biersack, B.; Casini, A.; de Graaf, I. A.; Worawutputtpong, P.; Noor, A.; Kempe, R.; Brabec, V.; Kasparkova, J.; Schobert, R. "Adjusting the DNA Interaction and Anticancer Activity of Pt(II) N-Heterocyclic Carbene Complexes by Steric Shielding of the Trans Leaving Group", **2015**, J Med Chem, (58), 6283-6292.
39. Maniotis, A. J.; Folberg, R.; Hess, A.; Seftor, E. A.; Gardner, L. M.; Pe'er, J.; Trent, J. M.; Meltzer, P. S.; Hendrix, M. J. "Vascular channel formation by human melanoma cells in vivo and in vitro: vasculogenic mimicry", **1999**, Am J Pathol, (155), 739-752.
40. Liu, X.; Wang, X.; Du, W.; Chen, L.; Wang, G.; Cui, Y.; Liu, Y.; Dou, Z.; Wang, H.; Zhang, P.; Chang, L.; Yi, L.; Cai, J.; Jiang, C. "Suppressor of fused (Sufu) represses Gli1 transcription and nuclear accumulation, inhibits glioma cell proliferation, invasion and vasculogenic mimicry, improving glioma chemo-sensitivity and prognosis", **2014**, Oncotarget, (5), 11681-11694.
41. Martins, E. T.; Baruah, H.; Kramarczyk, J.; Saluta, G.; Day, C. S.; Kucera, G. L.; Bierbach, U. "Design, Synthesis, and Biological Activity of a Novel Non-Cisplatin-type Platinum-Acridine Pharmacophore", **2001**, J Med Chem, (44), 4492-4496.
42. Suryadi, J.; Bierbach, U. "DNA metalating-intercalating hybrid agents for the treatment of chemoresistant cancers", **2012**, Chemistry, (18), 12926-12934.
43. Eiter, L. C.; Hall, N. W.; Day, C. S.; Saluta, G.; Kucera, G. L.; Bierbach, U. "Gold(I) analogues of a platinum-acridine antitumor agent are only moderately cytotoxic but show potent activity against Mycobacterium tuberculosis", **2009**, J Med Chem, (52), 6519-6522.
44. Salvesen, G. S.; Riedl, S. J. "Caspase mechanisms", **2008**, Adv Exp Med Biol, (615), 13-23.
45. Choi, J. A.; Kim, J. Y.; Lee, J. Y.; Kang, C. M.; Kwon, H. J.; Yoo, Y. D.; Kim, T. W.; Lee, Y. S.; Lee, S. J. "Induction of cell cycle arrest and apoptosis in human breast cancer cells by quercetin", **2001**, Int J Oncol, (19), 837-844.
46. Dighe, S. U.; Khan, S.; Soni, I.; Jain, P.; Shukla, S.; Yadav, R.; Sen, P.; Meeran, S. M.; Batra, S. "Synthesis of beta-Carboline-Based N-Heterocyclic Carbenes and Their Antiproliferative and Antimetastatic Activities against Human Breast Cancer Cells", **2015**, J Med Chem, (58), 3485-3499.
47. Imstepf, S.; Pierroz, V.; Raposinho, P.; Bauwens, M.; Felber, M.; Fox, T.; Shapiro, A. B.; Freudenberg, R.; Fernandes, C.; Gama, S.; Gasser, G.; Motthagy, F.; Santos, I. R.; Alberto, R. "Nuclear Targeting with an Auger Electron Emitter Potentiates the Action of a Widely Used Antineoplastic Drug", **2015**, Bioconj Chem, (26), 2397-2407.
48. Zajac, J.; Kostrhunova, H.; Novohradsky, V.; Vrana, O.; Raveendran, R.; Gibson, D.; Kasparkova, J.; Brabec, V. "Potentiation of mitochondrial dysfunction in tumor cells by conjugates of metabolic modulator dichloroacetate with a Pt(IV) derivative of oxaliplatin", **2016**, J Inorg Biochem, (156), 89-97.
49. Novohradsky, V.; Zerzankova, L.; Stepankova, J.; Kisova, A.; Kostrhunova, H.; Liu, Z.; Sadler, P. J.; Kasparkova, J.; Brabec, V. "A dual-targeting, apoptosis-inducing organometallic half-sandwich iridium anticancer complex", **2014**, Metallomics, (6), 1491-1501.

50. Robinson, J. P.; Bruner, L. H.; Bassoe, C. F.; Hudson, J. L.; Ward, P. A.; Phan, S. H. "Measurement of intracellular fluorescence of human monocytes relative to oxidative metabolism", **1988**, *J Leukoc Biol*, (43), 304-310.
51. Kalyanaraman, B.; Darley-Usmar, V.; Davies, K. J.; Dennery, P. A.; Forman, H. J.; Grisham, M. B.; Mann, G. E.; Moore, K.; Roberts, L. J., 2nd; Ischiropoulos, H. "Measuring reactive oxygen and nitrogen species with fluorescent probes: challenges and limitations", **2012**, *Free Radic Biol Med*, (52), 1-6.
52. Chen, L. B. "Mitochondrial membrane potential in living cells", **1988**, *Annu Rev Cell Biol*, (4), 155-181.
53. Yoong, S. L.; Wong, B. S.; Zhou, Q. L.; Chin, C. F.; Li, J.; Venkatesan, T.; Ho, H. K.; Yu, V.; Ang, W. H.; Pastorin, G. "Enhanced cytotoxicity to cancer cells by mitochondria-targeting MWCNTs containing platinum(IV) prodrug of cisplatin", **2014**, *Biomaterials*, (35), 748-759.
54. Ke, S. Z.; Ni, X. Y.; Zhang, Y. H.; Wang, Y. N.; Wu, B.; Gao, F. G. "Camptothecin and cisplatin upregulate ABCG2 and MRP2 expression by activating the ATM/NF-kappaB pathway in lung cancer cells", **2013**, *Int J Oncol*, (42), 1289-1296.
55. Coleman, L. W.; Rohr, L. R.; Bronstein, I. B.; Holden, J. A. "Human DNA topoisomerase I: An anticancer drug target present in human sarcomas", **2002**, *Hum Pathol*, (33), 599-607.
56. Palumbo, M.; Gatto, B.; Moro, S.; Sissi, C.; Zagotto, G. "Sequence-specific interactions of drugs interfering with the topoisomerase-DNA cleavage complex", **2002**, *Arch Biochem Biophys*, (1587), 145-154.
57. Sriram, D.; Yogeewari, P.; Thirumurugan, R.; Bal, T. R. "Camptothecin and its analogues: a review on their chemotherapeutic potential", **2005**, *Nat Prod Res*, (19), 393-412.
58. Webb, M. R.; Ebeler, S. E. "A gel electrophoresis assay for the simultaneous determination of topoisomerase I inhibition and DNA intercalation", **2003**, *Anal Biochem*, (321), 22-30.
59. Janockova, J.; Plsikova, J.; Koval, J.; Jendzelovsky, R.; Mikes, J.; Kasparkova, J.; Brabec, V.; Hamulakova, S.; Fedorocko, P.; Kozurkova, M. "Tacrine derivatives as dual topoisomerase I and II catalytic inhibitors", **2015**, *Bioorg Chem*, (59), 168-176.
60. Khoo, C. P.; Micklem, K.; Watt, S. M. "A comparison of methods for quantifying angiogenesis in the Matrigel assay in vitro", **2011**, *Tissue Eng Part C Methods*, (17), 895-906.
61. Hu, J.; Verkman, A. S. "Increased migration and metastatic potential of tumor cells expressing aquaporin water channels", **2006**, *Faseb J*, (20), 1892-1894.

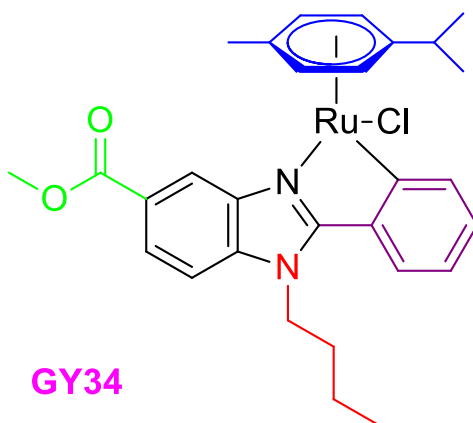
Capítulo 5

Actividad Biológica de Compuestos de Rutenio(II) e Iridio(III) Basados en Benzimidazol



Sección 5A

Actividad Biológica y Mecanismo de Acción del 2-fenil-benzimidazol de Rutenio(II) GY34



Los resultados de esta Sección se han publicado en:

Dam, C. S.; Perez Henarejos, S. A.; Tsolakou, T.; Segato, C. A.; Gammelgaard, B.; Yellol, G. S.; Ruiz, J.; Lambert, I. H.; Sturup, S. *"In vitro characterization of a novel C,N-cyclometalated benzimidazole Ru(II) arene complex: stability, intracellular distribution and binding, effects on organic osmolyte homeostasis and induction of apoptosis"*, **2015**, *Metallomics*, (7), 885-895.

5A.1. Introducción

Hoy en día, el cáncer es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad a nivel mundial. La Organización Mundial de la Salud espera un aumento del 70% en el número de nuevos casos en las próximas dos décadas.¹ Durante muchos años el cisplatino ha sido el tratamiento de elección contra una amplia gama de cánceres como son los de ovario, testículo, de cabeza y cuello, de vejiga y de pulmón.² Sin embargo, la eficacia del cisplatino está limitada por la adquisición intrínseca de resistencia³ y por sus efectos secundarios graves, tales como ototoxicidad, neuropatía periférica, mielosupresión y nefrotoxicidad.

En consecuencia, la búsqueda de nuevos fármacos prometedores está favoreciendo la investigación en este campo. La búsqueda de un buen candidato como agente anticancerígeno comienza con una serie de estudios básicos tales como la determinación de los valores de IC_{50} , los estudios de apoptosis y la detención del ciclo celular. Por otra parte, el conocimiento sobre la estabilidad del compuesto y el mecanismo de acción son también factores muy valiosos para decidir el futuro destino de un nuevo compuesto. Particularmente, el modo de acción distinto al cisplatino posee una importancia significativa como mecanismo capaz de superar la resistencia y, por lo tanto, de mejorar la terapia contra el cáncer.

El propósito del presente capítulo fue profundizar en el estudio de la actividad biológica y el modo de acción del nuevo compuesto C^N-ciclometalado de Ru(II) [(η^6 -*p*-cimeno)RuCl(κ^2 -N^C-L)] (L=1-butil-2-fenil-benzimidazol-5-carboxilato de metilo desprotonado), conocido como GY34 (Fig. 5A.1) y publicado por Yellol y colaboradores (ver Sección 5B).⁴ De acuerdo con los estudios anteriores, GY34 demostraba incrementar la actividad citotóxica comparada con la del cisplatino en líneas celulares de adenocarcinoma colorrectal HT-29 (IC_{50} GY34: $2,2 \pm 0,4 \mu\text{M}$, IC_{50} cisplatino: $9,5 \pm 0,2 \mu\text{M}$), en cáncer de mama humano T47D (IC_{50} GY34: $5,5 \pm 0,2 \mu\text{M}$, IC_{50} cisplatino: $38 \pm 2 \mu\text{M}$) y en las células A2780cis de cáncer de ovario humano resistentes al cisplatino (IC_{50} GY34: $6,4 \pm 0,1 \mu\text{M}$, IC_{50} cisplatino: $15 \pm 1 \mu\text{M}$).⁴ Además, GY34 detenía el ciclo celular en la fase S e inducía apoptosis de HT-29. Finalmente, el nivel de acumulación de metal en las células T47D se incrementó después de la exposición a GY34 con respecto al tratamiento con cisplatino.⁴

En conjunto, estos datos indicaban que GY34 se trata de un fármaco potencial candidato para el tratamiento anticancerígeno y justifica la importancia de una investigación más profunda del compuesto.

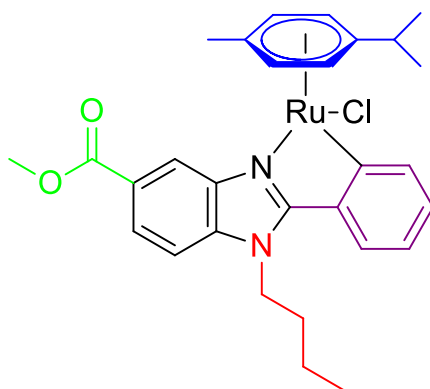


Figura 5A.1. Estructura de GY34.

5A.2. Resultados y discusión

En este capítulo, el nuevo compuesto de Ru(II) GY34 se caracterizó respecto a la estabilidad y la transformación en disolución, distribución intracelular y la unión a biomoléculas del citosol, además del flujo de osmolitos que presentaba a través de la membrana celular para la inducción de apoptosis. Los resultados se compararon en todos los casos con cisplatino.

5A.2.1. Estabilidad de GY34

La estabilidad de GY34 en disolución se evaluó mediante la aplicación de RP-HPLC-ICP-MS. Se analizó dicha estabilidad inmediatamente después de la preparación de soluciones 1 μ M de GY34 en fase móvil (acetato de amonio 20 mM en MeOH al 65 % v/v, pH=6,8) y en medio RPMI-1640, respectivamente, y después de 24 h a temperatura ambiente. Los resultados se resumen en la Figura 5A.2. Los cromatogramas obtenidos inmediatamente después de la preparación de las soluciones GY34 contienen una banda grande (tiempo de retención, $t_r \sim 4,5$ min) que muy probablemente se puede asignar a GY34. Después de 24 h a temperatura ambiente aparece un segundo pico, de área también grande ($t_r \sim 2$ min). Estos datos indican que GY34 a temperatura ambiente se transforma en otra especie que contiene rutenio y que la transformación ocurre tanto en la fase móvil como en el medio celular.

Se hizo un intento de dilucidar estas estructuras usando RP-HPLC-ESI-MS. Una disolución de GY34 1 mM en DMSO y RPMI-1640 (20: 80 %, v/v) se analizó inmediatamente después de la preparación (el cromatograma iónico total -TIC- muestra un pico grande a $t_r \sim 4,5$ min y un pico más pequeño a $t_r \sim 2$ min, no mostrado) y después de 24 h a temperatura ambiente (Figuras 5A.3 y 5A.4). Teniendo en cuenta la ligera

diferencia en el tiempo de retención causada por diferentes volúmenes en los sistemas RP-HPLC-ICP-MS y RP-HPLC-ESI-MS, los tres picos mostrados en la Fig. 5A.3 corresponden muy probablemente a los picos en $t_r \sim 2$, ~ 3 y $\sim 4,5$ min en los cromatogramas de ICP-MS mostrados en la Figura 5A.2. La intensidad en el pico entre los cromatogramas ICP-MS y ESI-MS probablemente se debe a la diferente sensibilidad de los dos métodos.

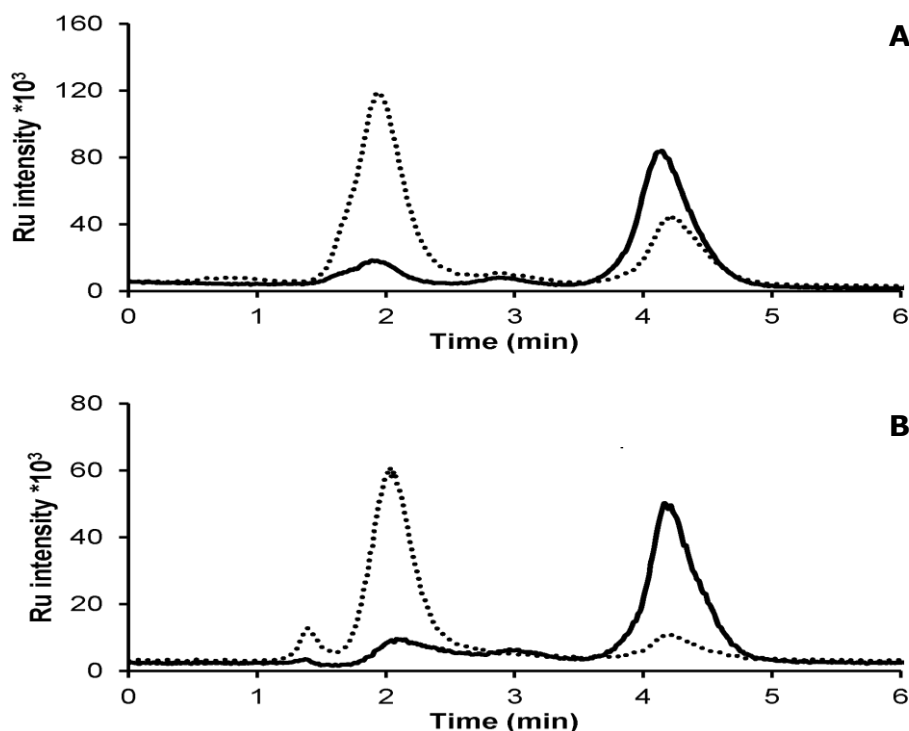


Figura 5A.2. Cromatogramas RP-HPLC-ICP-MS de GY34 1 μ M en A fase móvil y B medio celular RPMI-1640. Las curvas continuas se obtuvieron inmediatamente después de la preparación y las discontinuas después de 24 h a temperatura ambiente.

Los respectivos espectros de masas (Figura 5A.4) demuestran que la banda TIC a ~ 3 min contiene especies de m/z 529,3 y 607,2 y que el pico TIC de $\sim 4,5$ min corresponde a especies de m/z 543,2 y 621,3. Verificado por comparación con el espectro de masas, el pico TIC a ~ 3 min se puede asignar a la estructura de GY34 una vez perdido el cloruro y en la que se ha hidrolizado el éster metílico (m/z 529,3, véase la Figura 5A.4A para la estructura) y a esta misma estructura con DMSO añadido (m/z 607,2). De la misma manera, se puede asignar el pico TIC de $\sim 4,5$ min a GY34 sin cloruro (m/z 543,2, ver Figura 5A.4B para la estructura) y a la misma estructura con DMSO añadido (m/z 621,3). No se espera que la adición de DMSO a la especie GY34 ocurra en disolución, sino más bien como resultado de una interacción entre GY34 y DMSO en la interfase ESI-MS. El espectro de masas del pico TIC a ~ 2 min (no mostrado) no permitió elucidar la estructura de las especies de rutenio relacionadas con el patrón isotópico característico de rutenio. Una explicación podría ser que el pico TIC a ~ 2 min corresponde a una subespecie de GY34

que se fragmenta durante ESI, dejando el fragmento que contiene rutenio desionizado. Esta especie no cargada no sería, por tanto, detectable por ESI-MS, pero sí sería capaz de producir una señal en ICP-MS, ya que contiene rutenio. En la Figura 5A.4 se demuestra que el cloruro de GY34 se elimina inmediatamente después de disolver el compuesto en medio de cultivo celular o en la fase móvil. Además, GY34 se transforma en varias especies diferentes en función del tiempo. Por lo tanto, la actividad citotóxica de GY34 propuesta por Yellol *et al*,⁴ es más probable que no sea causada por el mismo compuesto GY34, sino por una subespecie del compuesto. Esto está de acuerdo con el hecho de que el cisplatino en solución es también hidrolizado, intercambiando uno o ambos iones cloruro con agua.⁵ Por lo tanto, la posible transformación en la solución de metalofármacos recién sintetizados debe tenerse en cuenta a la hora de realizar experimentos.

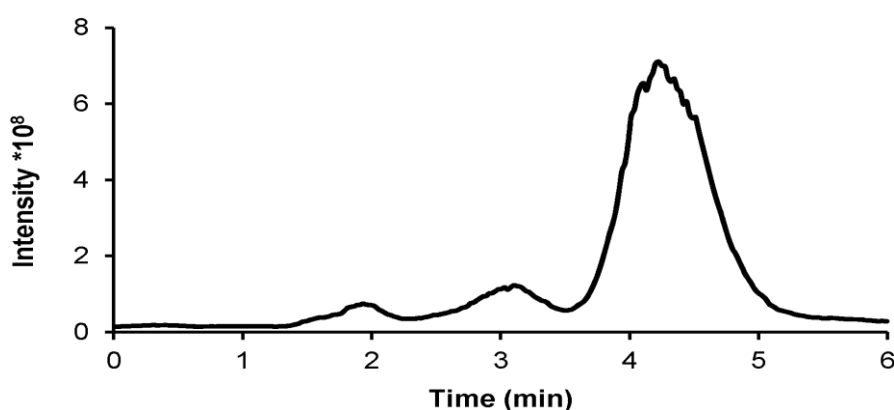


Figura 5A.3. Cromatograma total de iones obtenido por RP-HPLC-ESI-MS de GY34 1 mM en medio celular RPMI-1640 después de 24 h.

Otro aspecto importante de la estabilidad en disolución es la solubilidad del analito. Por RMN, nuestro grupo ha demostrado⁴ que GY34 es soluble en DMSO puro a una concentración de 20 mM, y que las disoluciones GY34 200 μ M preparadas en DMSO al 10% son estables hasta 48 h. Los compuestos que son ligeramente solubles a menudo precipitan con el tiempo y la concentración real aplicada al realizar los experimentos puede no coincidir con la concentración esperada. En el presente trabajo, se investigó la distribución intracelular de GY34, como se describe a continuación. Para estos experimentos, se añadió GY34 al medio de cultivo celular para obtener una concentración de 10 μ M. Después de la incubación se extrajo una alícuota del medio celular y se determinó la concentración de GY34 mediante análisis de ICP-MS. Curiosamente, se encontró que las concentraciones reales de GY34 en el medio celular oscilaban entre 2-10 μ M para diferentes repeticiones. Como se analiza más adelante, la distribución intracelular de GY34 parece depender de la concentración GY34 en el medio celular durante la incubación. Una vez más, esto establece la estabilidad del analito como un parámetro muy crítico y enfatiza la importancia de evaluar y controlar la concentración real del analito a lo largo de los experimentos. La

solubilidad limitada de GY34 en el medio de cultivo celular también realza la importancia del procedimiento usado para preparar muestras para el análisis de ICP-MS. Simplemente filtrar y diluir las muestras hará que el precipitado de GY34 se pierda, lo que conduce a resultados erróneos. En este trabajo las muestras se digirieron a 60 °C usando HNO₃ al 65 % y H₂O₂ al 30 %, incluso realizando digestión por microondas. Por lo tanto, si alguna proporción de GY34 precipitara en las muestras antes del análisis de ICP-MS, el resultado no se verá afectado, ya que el procedimiento de preparación de la muestra asegurará que todo el GY34 se disuelva.

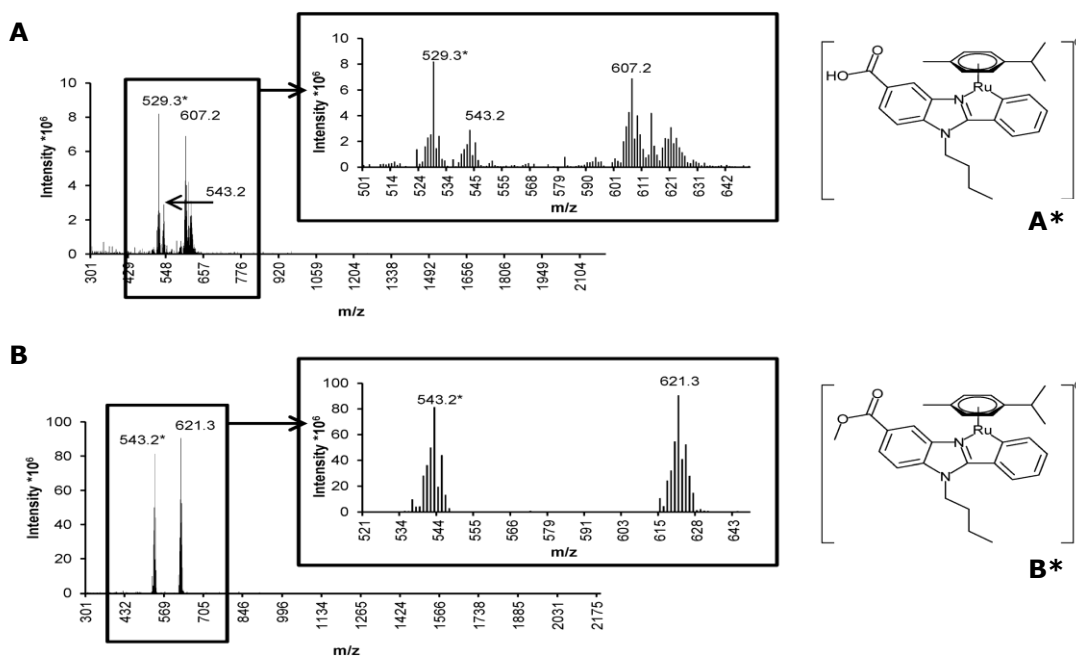


Figura 5A.4. Espectros de masas de las cuatro bandas de interés extraídos del cromatograma de iones totales (TIC): (A) pico a 3 min y (B) pico a 4,5 min. Las estructuras de las especies m/z 529,3 y 543,2 están representadas a la derecha (A* y B*, respectivamente).

5A.2.2. Distribución intracelular

Con el fin de obtener conocimiento sobre el mecanismo de acción de GY34, se investigó la distribución intracelular del compuesto en células ELA. Las células se incubaron durante 18 horas con GY34 10 μ M y después se fraccionó el contenido celular en: fracción nuclear, mitocondrial y citosólica. Para ello empleamos un nuevo protocolo específico para este trabajo y que ha sido comentado en detalle en Materiales y Métodos (apdo. 2.12). Para el mejor seguimiento de la discusión que aquí se establece volvemos a reproducir la Figura 2.11 de Materiales y Métodos (ahora renombrada como Figura 5A.5).

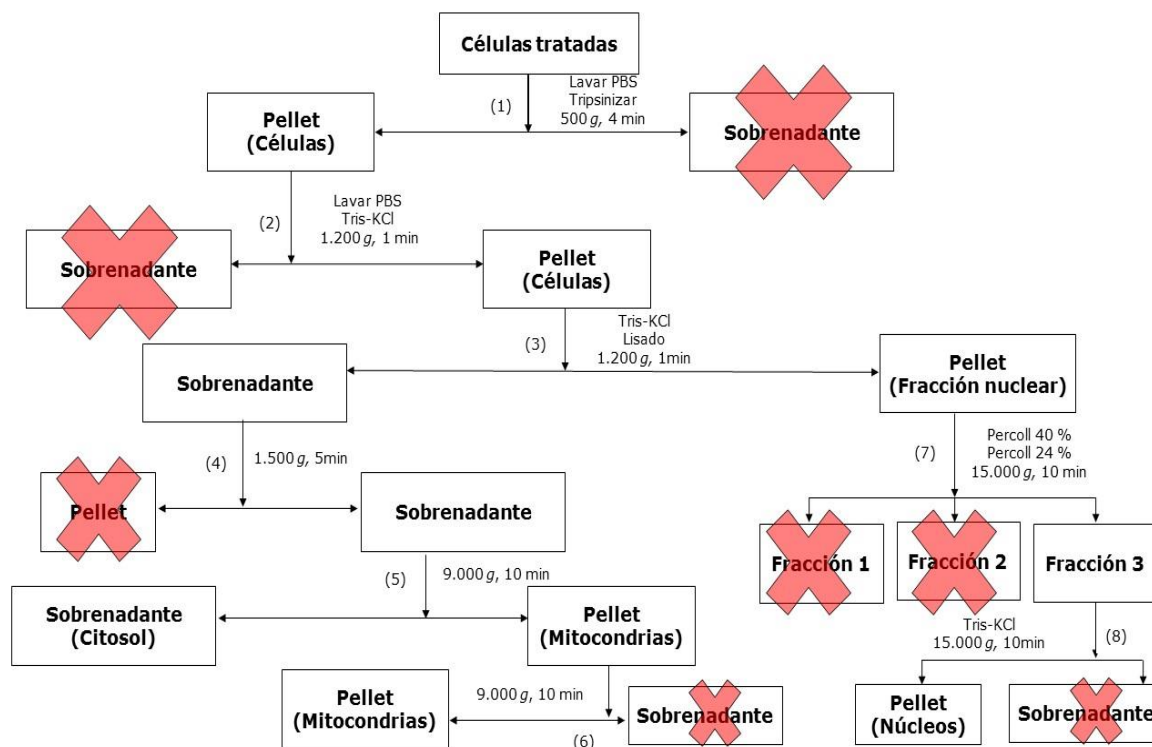


Figura 5A.5. Esquema del fraccionamiento subcelular (renombrado de la Figura 2.11 de Material y Métodos)

El contenido de GY34 en cada fracción se determinó por análisis de ICP-MS. El resultado se muestra en la Tabla 5A.1. De acuerdo con esta Tabla la mayor parte del GY34 tomado por las células ELA se localiza en el citosol y en las mitocondrias. Este resultado indica que GY34 podría dirigirse a las mitocondrias, en contraste con el cisplatino cuya diana es el ADN nuclear.⁶ Se sabe que las células ELA son resistentes al cisplatino.⁷ La capacidad de GY34 para inducir la apoptosis en las células ELA (véase más adelante) sugiere mecanismo de acción diferente de GY34 comparado con el de CDDP.

Tabla 5A.1 Distribución intracelular de GY34 en la línea celular ELA.

Fracción	Porcentaje ^a	
	1	2
Núcleo	4	3
Mitocondria	18	21
Citosol	78	76

^a El tiempo de incubación fue de 18 h a una concentración de 10 µM de compuesto. Los valores corresponden al porcentaje en cada una de las fracciones subcelulares de dos replicados.

Como se mencionó anteriormente, la concentración de GY34 en el medio de cultivo celular durante la incubación varió entre las repeticiones de los experimentos. Curiosamente, la concentración en el medio celular pareció afectar la distribución

intracelular de GY34. Para las repeticiones 2-3 ($\sim 10 \mu\text{M}$ de GY34 en medio celular) se detectó más concentración de GY34 en las mitocondrias que en los núcleos (Tabla 5A.1). Por otro lado, para la réplica 1 ($\sim 2 \mu\text{M}$ de GY34 en medio celular) la captación de GY34 fue de 32 %, 10 % y 58 % de GY34 en núcleos, mitocondrias y citosol, respectivamente. Estos resultados indican que GY34 a concentraciones bajas se distribuye principalmente en los núcleos celulares, mientras que a concentraciones más altas GY34 se acumula también en las mitocondrias. Posiblemente, GY34 se dirige a los núcleos celulares hasta que se obtiene saturación, después de lo cual se inicia su distribución en la mitocondria. Cabe remarcar que la diferente distribución intracelular de GY34 entre réplicas no se debe al procedimiento de fraccionamiento celular aplicado, sino más bien a las dificultades de estabilidad de GY34 en el medio celular. Aplicando el método en células A2780 incubadas con cisplatino a una concentración de $10 \mu\text{M}$ se obtuvieron los siguientes resultados: $1,0 \pm 0,3$ de cisplatino en los núcleos, $6,0 \pm 0,9$ en las mitocondrias y $93,0 \pm 0,6$ en el citosol. El número de experimentos realizados fue de 3 ($n = 3$) y los errores, como se indican, fueron bajos, lo que demuestra una reproducibilidad satisfactoria entre las repeticiones.

La importancia de obtener fracciones limpias cuando se predice la distribución intracelular de un compuesto se resalta por el elevado contenido de GY34 en el citosol en comparación con el existente en núcleos y mitocondrias. Si los núcleos o mitocondrias estuvieran contaminados con citosol, un contenido nuclear o mitocondrial engañosamente mayor de GY34 parecería conducir a deducciones falsas sobre el mecanismo de acción. En este trabajo se realizó una electroforesis y la transferencia a matriz de celulosa mediante Western blot con el fin de evaluar la pureza de las fracciones obtenidas. El resultado se muestra en la Figura 5A.6. En dicha Figura se puede observar que los núcleos esperados contienen histona H3 (HIST, un marcador de núcleos) pero no contienen ni malato deshidrogenasa 2 (MDH, marcador de mitocondrias), ni lactato deshidrogenasa B (LDH, un marcador de citosol). Por lo tanto, la fracción nuclear no estaba contaminada ni con mitocondrias ni con citosol. De la misma manera, el citosol contiene LDH, pero no HIST o MDH, por lo que esta fracción no se contaminó ni con histona ni con mitocondria. Las mitocondrias contienen una cantidad sustancial de MDH y no de HIST. No obstante, se observa una banda muy difuminada de LDH. Este resultado podría indicar una contaminación menor de la fracción mitocondrial con citosol. Por el contrario, la LDH observada en la mitocondria podría originarse, muy probablemente, a partir de la LDH incrustada en la membrana mitocondrial interna⁸ y, en consecuencia, no se debería a contaminación con el citosol. El lavado repetido de la mitocondria (ver pasos 5 y 6 en la Figura 5A.5) debería haber eliminado la mayor parte del citosol de la superficie de la mitocondria. No obstante, no se puede descartar que una pequeña cantidad de citosol se haya internalizado en el espacio de membrana interna de las mitocondrias, causando una contaminación menor. En base a estos experimentos, se asumió que la pureza de las

fracciones mitocondriales obtenidas utilizando el actual protocolo de fraccionamiento es suficiente y que el contenido menor de citosol presente en la membrana mitocondrial interna es insignificante.

En la bibliografía se describen varios ejemplos de fraccionamiento subcelular y aislamiento de organelos subcelulares.⁹⁻¹³ Sin embargo, hasta el conocimiento de los autores no se han publicado procedimientos con características idénticas al método de fraccionamiento presentado aquí. En el trabajo de Hornig-Do y colaboradores,⁹ se utilizaron microperlas superparamagnéticas para aislar la mitocondria de células HEK 293, HeLa y de osteosarcoma humano. La técnica de Western blot rebatió la posibilidad de contaminación citosólica, pero, a su vez, mostró un rastro de núcleos en la fracción mitocondrial. Sólo se aislaron mitocondrias; no se aislaron ni núcleos ni citosol. Aplicando un gradiente de centrifugación con percoll, Wieckowski y colaboradores obtuvieron una fracción mitocondrial de células MEF que no contenían ni citosol ni núcleos.¹⁰ De la misma manera, la centrifugación diferencial permitió que Dai y colaboradores aislaran las mitocondrias limpias de las células SKOV3 y A2780.¹¹ Ninguno de ambos grupos consiguieron aislar ni núcleos ni citosol.^{10,11} Zayed y colaboradores aislaron mediante fraccionamiento, en células epiteliales de adenocarcinoma de pulmón humano A549, células de cáncer colorrectal humano HT-29 y HCA7 en el citosol, membranas celulares, núcleos y el citoesqueleto utilizando el kit de extracción subcelular (ProteoExtracts de Merck Millipore), pero no verificaron la pureza de las fracciones obtenidas.¹² En el trabajo de Groessl *et al.*,¹³ se utilizaron el kit de aislamiento de mitocondrias para cultivo celular de Thermo Scientific y el kit de fraccionamiento celular Biovision FractionPREP, para aislar núcleos, mitocondrias y citosol a partir de células A2780. Las transferencias de Western proporcionadas en el espectro ESI de dicho trabajo muestran que la mitocondria contiene LDH.¹³ No quedaba claro si la aparición de LDH se debía a una contaminación citosólica de las mitocondrias o a la LDH localizada en la membrana mitocondrial interna,⁸ como se discutió anteriormente. Para mapear la distribución intercelular de un compuesto, es de gran importancia obtener fracciones limpias. Además, el método debe ser capaz de fraccionar las células en los núcleos, las mitocondrias y el citosol. Por todo ello, se cree que el método de fraccionamiento presentado en este trabajo presenta ambas características. Además, el método es menos costoso que los kits de fraccionamiento comercialmente disponibles.

Un paso crítico en el procedimiento de fraccionamiento es la homogenización (etapa 3, Figura 5A.5). La aplicación de demasiada fuerza romperá las mitocondrias resultando en un rendimiento reducido de éstas junto con la contaminación mitocondrial del citosol. Por el contrario, cuando se aplica una fuerza muy pequeña, sólo se homogeniza una parte menor de las células. Esto da como resultado un rendimiento mitocondrial también disminuido y contribuirá, además, a la contaminación de los núcleos con células intactas. La etapa 7 de la Figura 5A.5 en el procedimiento de fraccionamiento sirve para precipitar

los núcleos que posteriormente serán lavados. Sin embargo, si el homogenizado contiene células pequeñas, intactas, con una densidad similar a los núcleos, la fracción nuclear estará contaminada con células intactas y se observarán bandas de transferencia en el Western para LDH y MDH. La probabilidad de contaminación nuclear con células pequeñas, intactas aumenta con el número de células intactas que de nuevo depende de la fuerza aplicada durante la homogeneización. Para validar la calidad de la homogeneización, la electroforesis en gel de SDS y la transferencia de Western deberían realizarse siempre junto con cada fraccionamiento.

Con el fin de evaluar la cantidad de GY34 perdida durante el fraccionamiento se calculó el balance de masa. Antes de la homogenización, se muestreó un volumen de células intactas permitiendo que la cantidad total de GY34 absorbida por las células se determinara mediante análisis de ICP-MS. El balance de masa se obtuvo entonces relacionando la suma del GY34 detectado en las fracciones nuclear, mitocondrial y citosólica y la cantidad total de GY34 captado por las células. En las fracciones se recuperó el $31 \pm 9 \%$ (media \pm SD, $n = 3$) del GY34 total captado por las células. Probablemente se perdió una parte de GY34 con las células intactas. Asimismo, se esperaba cierto grado de pérdida en las numerosas etapas de lavado y decantación durante todo el procedimiento. Finalmente, el efecto para evitar la contaminación de las fracciones también provoca una pérdida de compuesto. Por ejemplo, cuando se decanta un sobrenadante, se tuvo que dejar una parte del mismo encima del precipitado para asegurar que no se transmitió pellet. Por lo tanto, debe tenerse en cuenta una compensación entre la pureza de la fracción y la recuperación del metal. Aunque se recuperó una cantidad relativamente pequeña de GY34 en las fracciones, los autores no creen que esta pérdida afecte la distribución obtenida de GY34 en las células. En el trabajo de Zayed *et al.*, mencionado anteriormente, se obtuvo una recuperación de platino de $> 99 \%$ después de que se llevó a cabo el fraccionamiento subcelular usando un kit de extracción.¹² Aparentemente, las fracciones obtenidas no se lavaron en la misma extensión que en el método de fraccionamiento actual, lo que probablemente explique la mejor recuperación del metal. En el presente trabajo se priorizó la pureza de la fracción, debido a su importancia al determinar la distribución intracelular.

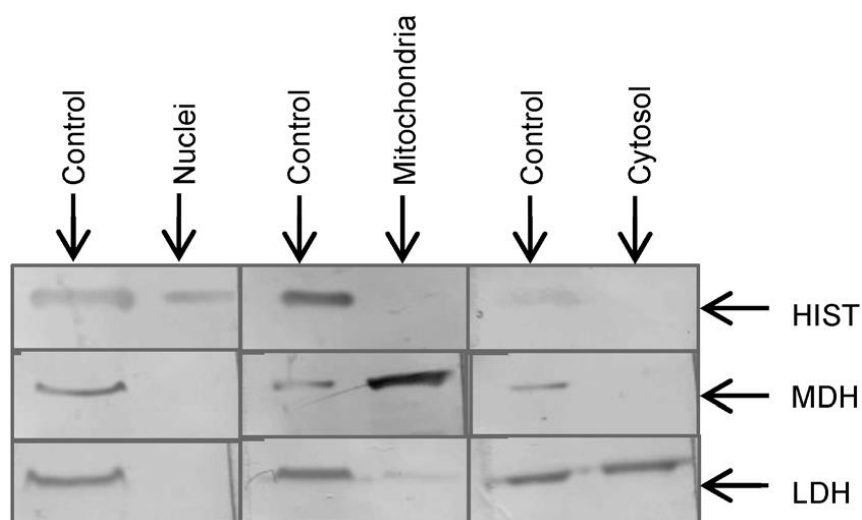


Figura 5A.6 Western blot de núcleos, mitocondria y citosol obtenidos del fraccionamiento celular de la línea celular ELA incubada con GY34 10 μ M durante 18 h (n = 3). Se utilizaron los siguientes marcadores: histona H3 (HIST, 18kDa, marcador para el núcleo), malato deshidrogenasa 2 (MDH, 36 kDa, marcador para mitocondria) y lactato deshidrogenasa B (LDH, 35 Kda, marcador para citosol).

5A.2.3. Unión de GY34 con biomoléculas citosólicas

Otra forma de obtener información del mecanismo de acción de un nuevo compuesto es estudiar si se une a biomoléculas en la célula. Según lo revisado por Almeida *et al.*¹⁴ y Casini y Reedijk,¹⁵ hay indicios de que la biodistribución, la absorción y la acción farmacológica de los metalofármacos dependen de las interacciones con proteínas. En este capítulo, se incubaron células ELA con GY34 10 μ M durante 18 h, se aisló el citosol y se fraccionó usando filtros de 3 kDa. El contenido de GY34 en las dos fracciones resultantes se determinó mediante análisis de ICP-MS. El $96,0 \pm 0,2$ (media \pm SD, n = 3) de GY34 del citosol se encontró en la fracción de alto peso molecular (>3 kDa). Esto indica que, en el citosol, la mayoría de GY34 se encuentra unido a biomoléculas de alto peso molecular, probablemente proteínas. Sólo una parte muy menor del compuesto permanece libre o unido a moléculas pequeñas. En consecuencia, la citotoxicidad de GY34 es probablemente facilitada por su interacción con dianas proteicas.

Kasherman y colaboradores realizaron experimentos análogos con cisplatino en células A2780 y llegaron a la conclusión de que dos tercios de cisplatino se asociaban con especies de 43 kDa.¹⁶ Este dato corrobora la hipótesis de que los metalofármacos se unen a proteínas una vez dentro del citosol en lugar de permanecer libres. La hipótesis se sustenta en cierta medida en la obra de Heffeter y colaboradores.¹⁷ Estos autores realizaron experimentos de SEC-ICP-MS sobre el citosol de células KB-3-1 derivadas de carcinoma cervical humano, previamente tratadas con el fármaco KP1019 (fármaco basado en rutenio) y su sal sódica KP1339. En estos experimentos observaron que, después de 3 h,

la mayoría del rutenio se encontraba en la fracción de >150 kDa. Por el contrario, después de 24 h el rutenio se redistribuía a la fracción de <40 kDa.¹⁷

Con el fin de determinar si la cantidad de GY34 perdida en los filtros era despreciable, se determinó también el contenido de GY34 en el citosol no fraccionado. Esto permitió calcular la cantidad perdida en los filtros mediante un simple balance de masas. El 91 ± 9 (promedio \pm SD, $n = 3$) del total de GY34 citosólico se localizó en las fracciones de <3 kDa, por un lado, y de >3 kDa, por otro, validando una pérdida insignificante de GY34 durante la filtración centrífuga.

5A.2.4. Efecto de GY34 sobre el flujo de osmolitos orgánicos

Las células expuestas a estímulos fisiológicos o citotóxicos se eliminan por apoptosis, proceso celular controlado genéticamente (ver apartado 3.2, Introducción). La apoptosis se caracteriza por una contracción inicial de las células (disminución del volumen), que refleja la pérdida neta de iones, osmolitos orgánicos y agua.^{18,19}

Se ha demostrado que el inicio de la apoptosis se puede retrasar o prevenir por la limitación de la actividad de las rutas de intercambio dependientes del volumen celular. Estas rutas normalmente facilitan la pérdida del osmolito orgánico taurina y la regulación de transportadores dependientes de Na^+ , por ejemplo, TauT, que facilita la acumulación de taurina.²⁰

La resistencia a cisplatino en células ELA comparada con la sensibilidad de cisplatino en células EATCs se correlaciona con una menor acumulación nuclear del compuesto, una disminución en la pérdida inicial de iones y agua, así como un incremento en la actividad TauT. La adquisición de resistencia al cisplatino en la línea celular A2780 se correlaciona con un aumento en la actividad TauT y, en paralelo, una disminución en la ruta de intercambio de taurina dependiente del volumen. En consecuencia, se ha demostrado que la actividad de TauT promueve la resistencia a cisplatino en células renales²¹ y la resistencia a múltiples fármacos en el cáncer colorrectal.²²

En el presente capítulo, las células A2780, A2780cis (resistencia adquirida, extrínseca) resistentes a cisplatino, así como células ELA resistentes a cisplatino (resistencia innata, intrínseca) fueron expuestas a cisplatino o GY34 a concentraciones 5 μM durante 18 h. En la Figura 5A.7 se observa que después de 18 h de exposición a cisplatino la captación de taurina aumenta y, paralelamente, se reduce la liberación de taurina en células A2780. Recientemente se ha demostrado que la resistencia al cisplatino en las células A2780cis se correlaciona con una mayor acumulación de taurina, seguida por una mayor capacidad para acumular taurina y un deterioro simultáneo de liberación de taurina,²³ por ejemplo, la respuesta al cisplatino observada en las células A2780 (Figura 5A.7) refleja muy probablemente el inicio de un fenotipo de resistencia a la exposición a

cisplatino dentro de las 18 h de incubación. Por el contrario, la exposición a cisplatino durante 18 h no tiene efectos sobre el transporte de taurina en las células A2780cis o ELA. GY34, por otro lado, reduce la captación de taurina en las tres líneas celulares y estimula la liberación de taurina en las líneas celulares resistentes.

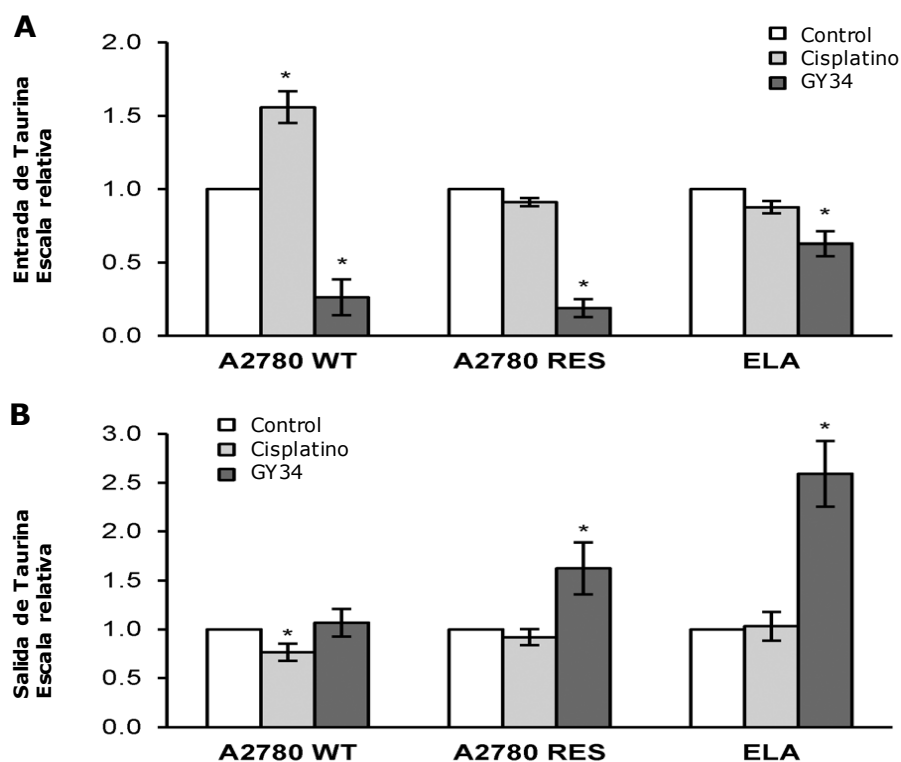


Figura 5A.7. Flujo de entrada (A) y salida (B) de taurina en condiciones isotónicas en las líneas celulares A2780, A2780cis y ELA. Los valores son las medias con la desviación estándar de tres repeticiones de los experimentos. * Diferencias significativas con los controles (test t-Student).

La regulación negativa de la captación de taurina y el aumento de la liberación de taurina después de la exposición a GY34 podría reflejar que GY34 induce la muerte celular en la línea celular sensible a cisplatino, así como en las líneas celulares resistentes a cisplatino. Por este motivo se analizó la progresión de la muerte celular y de la apoptosis en células ELA después de la exposición a cisplatino y a GY34. El inicio de la apoptosis por fármacos químicos implica típicamente daño al ADN, activación de quinasas específicas (ATM/ATR) que (a través de la fosforilación/activación del factor de transcripción p53) provoca la síntesis de proteínas proapoptóticas y, posteriormente, la activación de caspasa 3.²³

La exposición de fosfatidilserina en la superficie de las células apoptóticas es una clara señal de progresión apoptótica y normalmente sirve como señal a las células fagocíticas para envolver/degradar estas células apoptóticas.²⁴ En la Figura 5A.8, que ilustra el análisis por citometría de flujo de células ELA después de la exposición de GY34 o de cisplatino (5 μ M en ambos casos, durante 18 h), se puede observar que GY34 inicia

la muerte celular (aumento de la señalización de yoduro de propidio) y la apoptosis (aumento de la emisión de anexina-V). Esto indica que GY34 inicia la muerte celular en parte por apoptosis en células resistentes a cisplatino y que este compuesto puede, por tanto, ser capaz de superar la resistencia a cisplatino.

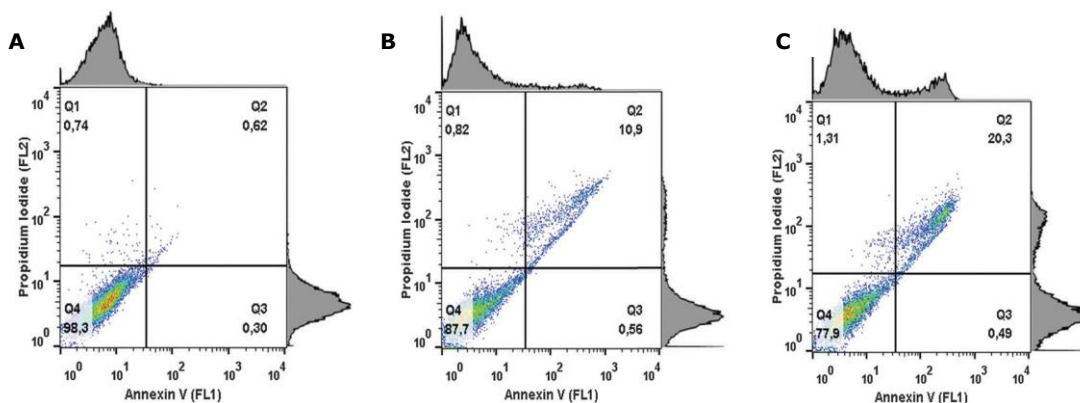


Figura 5A.8. Análisis de apoptosis por citometría de flujo en células ELA. (A) control, (B) exposición a 5 μM de cisplatino y (C) exposición a 5 μM de GY34. Las células en Q2 indican apoptosis tardía.

5A.3. Conclusiones

En el presente capítulo se ha investigado, el potencial del nuevo compuesto de rutenio(II) GY34. A su vez, se ha presentado un nuevo procedimiento de fraccionamiento capaz de obtener núcleos, mitocondrias y citosol limpios para el estudio de la distribución intracelular de metalofármacos. GY34 se encontró mayoritariamente (76-78 %) en el citosol y sólo en muy pequeña proporción (3-4 %) en el núcleo celular (el resto de GY34, 18-21 %, se localizó en las mitocondrias). Además, se ha comprobado que la estabilidad y la transformación del analito durante los experimentos influyen significativamente en el resultado. Se demuestra así la relevancia de monitorizar estos parámetros. Se ha aplicado aquí un enfoque distinto, más diverso del comúnmente practicado, considerando los aspectos tanto químicos como biológicos. Los experimentos realizados pueden utilizarse como un protocolo general y una herramienta adicional en la evaluación inicial de nuevos métodos basados en metalodrogas.

5A.4. Bibliografía

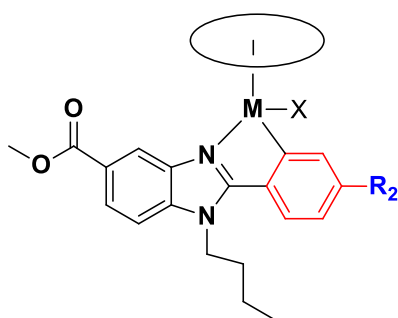
1. OMS, "Nota descriptiva N°297", **2015**, Dec 22, 2016, <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>
2. Dasari, S.; Tchounwou, P. B. "Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action", **2014**, Eur J Pharmac, (0), 364-378.
3. Galluzzi, L.; Senovilla, L.; Vitale, I.; Michels, J.; Martins, I.; Kepp, O.; Castedo, M.; Kroemer, G. "Molecular mechanisms of cisplatin resistance", **2012**, Oncogene, (31), 1869-1883.

4. Yellol, G. S.; Donaire, A.; Yellol, J. G.; Vasylyeva, V.; Janiak, C.; Ruiz, J. "On the antitumor properties of novel cyclometalated benzimidazole Ru(II), Ir(III) and Rh(III) complexes", **2013**, Chem Commun (Camb), (49), 11533-11535.
5. Wang, D.; Lippard, S. J. "Cellular processing of platinum anticancer drugs", **2005**, Nat Rev Drug Discov, (4), 307-320.
6. Cepeda, V.; Fuertes, M. A.; Castilla, J.; Alonso, C.; Quevedo, C.; Perez, J. M. "Biochemical mechanisms of cisplatin cytotoxicity", **2007**, Anticancer Agents Med Chem, (7), 3-18.
7. Tastesen, H. S.; Holm, J. B.; Moller, J.; Poulsen, K. A.; Moller, C.; Sturup, S.; Hoffmann, E. K.; Lambert, I. H. "Pinpointing differences in cisplatin-induced apoptosis in adherent and non-adherent cancer cells", **2010**, Cell Physiol Biochem, (26), 809-820.
8. Rojo, E. E.; Guiard, B.; Neupert, W.; Stuart, R. A. "Sorting of D-lactate dehydrogenase to the inner membrane of mitochondria. Analysis of topogenic signal and energetic requirements", **1998**, J Biol Chem, (273), 8040-8047.
9. Hornig-Do, H. T.; Gunther, G.; Bust, M.; Lehnartz, P.; Bosio, A.; Wiesner, R. J. "Isolation of functional pure mitochondria by superparamagnetic microbeads", **2009**, Anal Biochem, (389), 1-5.
10. Wieckowski, M. R.; Giorgi, C.; Lebiedzinska, M.; Duszynski, J.; Pinton, P. "Isolation of mitochondria-associated membranes and mitochondria from animal tissues and cells", **2009**, Nat Protoc, (4), 1582-1590.
11. Dai, Z.; Yin, J.; He, H.; Li, W.; Hou, C.; Qian, X.; Mao, N.; Pan, L. "Mitochondrial comparative proteomics of human ovarian cancer cells and their platinum-resistant sublines", **2010**, Proteomics, (10), 3789-3799.
12. Zayed, A.; Shoeib, T.; Taylor, S. E.; Jones, G. D. D.; Thomas, A. L.; Wood, J. P.; Reid, H. J.; Sharp, B. L. "Determination of Pt-DNA adducts and the sub-cellular distribution of Pt in human cancer cell lines and the leukocytes of cancer patients, following mono- or combination treatments, by inductively-coupled plasma mass spectrometry", **2011**, Int J Mass Spectrom, (307), 70-78.
13. Groessel, M.; Zava, O.; Dyson, P. J. "Cellular uptake and subcellular distribution of ruthenium-based metallodrugs under clinical investigation versus cisplatin", **2011**, Metallomics, (3), 591-599.
14. de Almeida, A.; Oliveira, B. L.; Correia, J. D. G.; Soveral, G.; Casini, A. "Emerging protein targets for metal-based pharmaceutical agents: An update", **2013**, Coord Chem Rev, (257), 2689-2704.
15. Casini, A.; Reedijk, J. "Interactions of anticancer Pt compounds with proteins: an overlooked topic in medicinal inorganic chemistry?", **2012**, Chem Sci, (3), 3135-3144.
16. Kasherman, Y.; Sturup, S.; Gibson, D. "Is glutathione the major cellular target of cisplatin? A study of the interactions of cisplatin with cancer cell extracts", **2009**, J Med Chem, (52), 4319-4328.
17. Heffeter, P.; Böck, K.; Atil, B.; Hoda, M. A. R.; Körner, W.; Bartel, C.; Jungwirth, U.; Keppler, B. K.; Micksche, M.; Berger, W.; Koellensperger, G. "Intracellular protein binding patterns of the anticancer ruthenium drugs KP1019 and KP1339", **2010**, J Biol Inorg Chem, (15), 737-748.
18. Hoffmann, E. K.; Lambert, I. H.; Pedersen, S. F. "Physiology of cell volume regulation in vertebrates", **2009**, Physiol Rev, (89), 193-277.
19. Lambert, I.; Hoffmann, E.; Pedersen, S. "Cell volume regulation: physiology and pathophysiology", **2008**, Acta physiol, (194), 255-282.
20. Lambert, I. H.; Kristensen, D. M.; Holm, J. B.; Mortensen, O. H. "Physiological role of taurine – from organism to organelle", **2015**, Acta physiol, (213), 191-212.
21. Han, X.; Yue, J.; Chesney, R. W. "Functional TauT protects against acute kidney injury", **2009**, J Am Soc Nephrol, (20), 1323-1332.

22. Yasunaga, M.; Matsumura, Y. "*Role of SLC6A6 in promoting the survival and multidrug resistance of colorectal cancer*", **2014**, *Sci Rep*, (4), 4852.
23. Sorensen, B. H.; Thorsteinsdottir, U. A.; Lambert, I. H. "*Acquired cisplatin resistance in human ovarian A2780 cancer cells correlates with shift in taurine homeostasis and ability to volume regulate*", **2014**, *Am J Physiol Cell Physiol*, (307), C1071-1080.
24. Capelluto, D. G. S. "*Lipid-mediated protein signaling*", **2013**, Springer.

Sección 5B

Estudios SAR de 2-fenil-benzimidazol C^N ciclometalados semi-sándwich de rutenio(II) e iridio(III)



$R_2 = \text{H, Me, F, CF}_3, \text{MeO, NO}_2, \text{ and Ph}$

$M = \text{Ru/Ir}$

Los resultados de esta Sección se han publicado en:

Yellol, J.; Perez, S. A.; Buceta, A.; Yellol, G.; Donaire, A.; Szumlas, P.; Bednarski, P. J.; Makhoulfi, G.; Janiak, C.; Espinosa, A.; Ruiz, J. "Novel C,N-Cyclometalated Benzimidazole Ruthenium(II) and Iridium(III) Complexes as Antitumor and Antiangiogenic Agents: A Structure-Activity Relationship Study", **2015**, J Med Chem, (58), 7310-7327.

5B.1. Introducción

El descubrimiento de la actividad anticancerígena del cisplatino por Rosenberg y colaboradores¹ no sólo transformó la quimioterapia contra el cáncer y amplió la gama de agentes quimioterápicos aplicados de forma rutinaria de fármacos orgánicos a compuestos basados en metales,² sino que también estimuló el uso de otros metales como posibles compuestos quimioterapéuticos.³ El potencial de diferentes agentes anticancerígenos teniendo como base los metales ha sido ampliamente explorado. Especialmente se han desarrollado complejos de Ru, Ir y Os en la búsqueda y descubrimiento de nuevos fármacos.^{3,4} Y más específicamente, se ha demostrado que complejos semi-sándwich de estos metales con ligandos hidrófobos tales como *p*-cimeno (Figura 1.12A y B) y C₅Me₅ (Figura 1.13) ven facilitada su difusión a través de la membrana celular. Asimismo, los restantes sitios de coordinación del metal pueden modificarse con diferentes ligandos para modular sus propiedades biológicas y farmacológicas.^{5,6} Por otra parte, la angiogénesis (ver apdo. 1.5.3.) es una marca distintiva del desarrollo tumoral y de la metástasis consecuente, por lo que se trata de una posible diana en la búsqueda de fármacos efectivos. Además, los beneficios de la limitada supervivencia de los fármacos antiangiogénicos han estimulado el interés en la combinación de estos fármacos con quimioterapias establecidas.^{7,8} Como quiera que se ha demostrado la actividad antimetastásica *in vivo* del compuesto de rutenio NAMI-A (Figura 1.11), también se han probado otros complejos no tóxicos de Ru(II)⁹⁻¹² e Ir(III)¹³ como inhibidores de la angiogénesis.

Por otra parte, los recientes estudios preliminares llevados a cabo por nuestro grupo con compuestos antitumorales tanto de platino(II) como de rutenio(II), rodio(III) e iridio(III) (ver Figura 5B.1 para estos últimos) han permitido concluir que las modificaciones estructurales introducidas en los ligandos podrían modular la actividad anticancerígena de los compuestos metálicos (*Structure-Activity Relationship, SAR*).^{14,15}

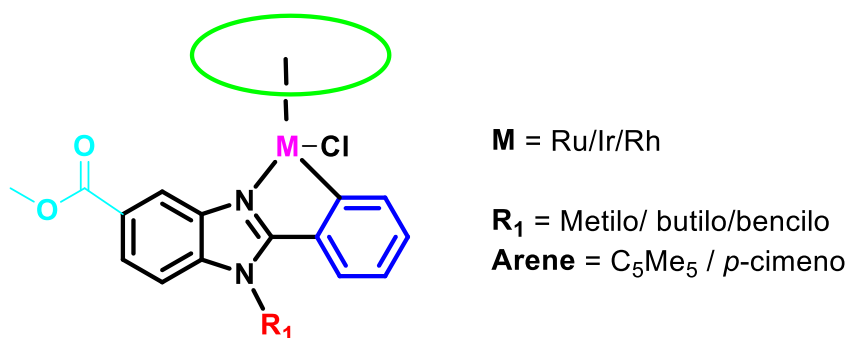


Figura 5B.1. Algunos complejos semi-sándwich de Ru(II), Rh(III) e Ir(III) estudiados previamente por nuestro grupo de investigación.¹⁵

Paralelamente, Sadler y colaboradores han establecido una relación entre la velocidad de hidrólisis de los complejos semi-sándwich de Ru(II) y su actividad anticancerígena.¹⁶

Los complejos metálicos basados en benzimidazol (un farmacóforo ampliamente utilizado)^{17,18} son conocidos por sus aplicaciones como agentes anticancerígenos^{15,19,20} y anti-Alzheimer,²¹ además de por sus interesantes propiedades fotofísicas y sus aplicaciones como sensores aniónicos.^{22,23}

Dada la interesante actividad biológica mostrada por estos compuestos semi-sándwich C^N-ciclometalados¹⁵ (mejor que la otros análogos de Ru(II) preparados recientemente por otros grupos)^{24,25} se planteó a continuación investigar la posible influencia de los efectos electrónicos del ligando 2-fenil-benzimidazol sobre la fortaleza de los enlaces M–C o M–N, así como la velocidad de hidrólisis de estos compuestos metálicos, factores que finalmente podrían afectar a la actividad antitumoral de los mismos. Con esta idea, se diseñó la síntesis de nuevos complejos con 2-fenil-benzimidazol en los que la posición 4 del anillo fenilo se modificara con distintos grupos dadores y aceptores electrónicos (o sustituyentes aromáticos como Ph) para la realización de un estudio de la relación estructura-actividad (SAR) de los complejos de Ru(II) y sus análogos de Ir(III) (Figura 5B.2). Se decidió mantener el sustituyente butilo unido al N del benzimidazol, ya que como se observó en los estudios preliminares daba lugar a especies más activas que aquellas con derivados bencilo o metilo.

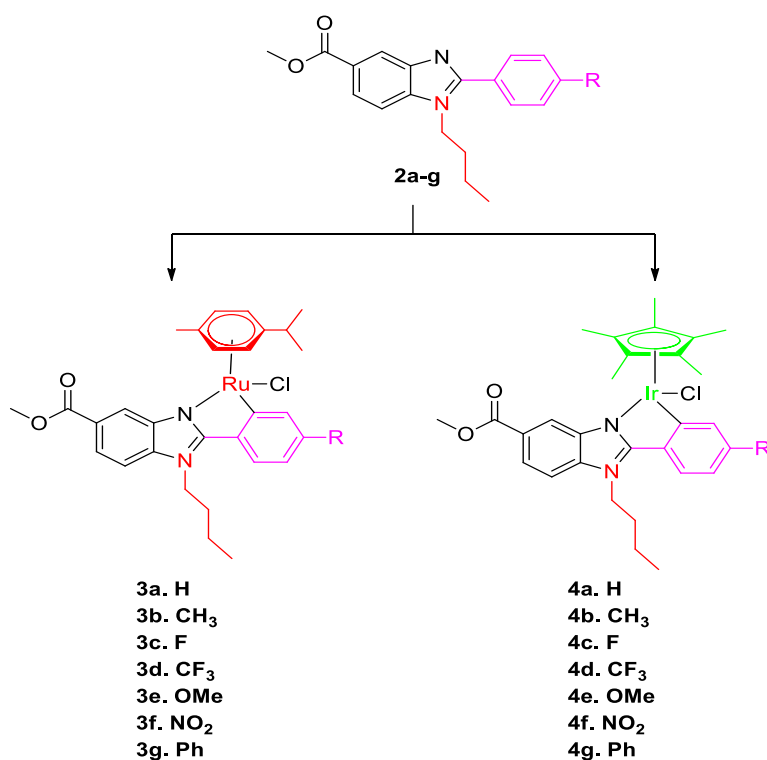


Figura 5B.2. Complejos semi-sándwich de Ru(II) e Ir(III) estudiados en esta Sección.

En la Figura 5B.2 se muestran las fórmulas químicas de dichos compuestos, sus distintos sustituyentes y el código asignado a cada uno de ellos. Debe señalarse que el compuesto **3a** coincide con el compuesto GY34 descrito en la Sección 5A.

El estudio estructura-actividad se realizó para estos compuestos con respecto a la citotoxicidad, la apoptosis y la detención del ciclo celular en una serie de células cancerígenas humanas. Adicionalmente se ha investigado el carácter antiangiogénico en la línea celular endotelial EA.hy926, así como la influencia en la inducción de caspasa-3 y de especies reactivas de oxígeno (ROS).

5B.2. Resultados y discusión

5B.2.1. Estudios de citotoxicidad

Se evaluó la citotoxicidad de los nuevos complejos **3a-3g** y **4a-4g** frente a un panel de líneas celulares de cáncer humano, incluyendo A2780 (células de cáncer de ovario humano), A2780cis (células de cáncer de ovario humano con resistencia adquirida a cisplatino), 5637 (células de cáncer de vejiga humana), A427, LCLC-103H (ambas células de carcinoma de pulmón humano), SISO (células de adenocarcinoma cervical uterino humano) y HT-29 (células de adenocarcinoma colorrectal humano). Debido a la baja solubilidad en agua de los complejos, los compuestos ensayados se disolvieron primero en DMF y luego se diluyeron en serie en medio de cultivo completo de manera que el contenido de DMF efectivo no excediera el 0,4%, como se describió previamente²⁶ (ver apdo. 2.4.1), además del cisplatino, diluido en agua, que se usó como control positivo. La Tabla 5B.1 presenta los valores de IC₅₀ de los compuestos. Por otra parte, también se calcularon los valores de IC₅₀ para **3a-3g** y **4a-4g** en la línea celular endotelial EA.hy926 de la vena umbilical humana (Tabla 5B.1) con el objetivo de verificar que el efecto antiangiogénico no se debió a un efecto citotóxico, sino a su potencial antiangiogénico.

La potencia inhibidora del crecimiento celular de todos los complejos metálicos era notablemente mucho mayor que la de sus ligandos (por ejemplo, en comparación con **2a**). La mayoría de los complejos eran aún más activos que el CDDP en las líneas celulares A427 y HT29. Como se muestra en la Tabla 5B.1, se investigó el efecto en la citotoxicidad respecto a las líneas celulares indicadas de los sustituyentes H, Me, F, CF₃, MeO, NO₂ y Ph en la posición R₄ del anillo fenilo del ligando quelante 2-fenilbenzimidazol del anillo de los complejos de rutenio (**3a-3g**) e iridio (**4a-4g**). La sustitución del metilo no produce ningún efecto sobre la potencia en comparación con el compuesto no sustituido (**3a**) en la serie de rutenio, pero pierde cierta potencia en los complejos de iridio para la mayor parte de las líneas celulares. La influencia del fluor se observó con los complejos de rutenio e iridio, en los que la actividad del complejo sustituido con flúor se incrementó algo en todas las líneas celulares estudiadas, excepto la línea celular HT-29 para el iridio (**4c**).

La sustitución de trifluorometilo mejora la actividad del complejo de rutenio **3d** en casi todas las líneas celulares, mientras que para el complejo de iridio **4d** no hubo efecto sobre la potencia en las líneas celulares LCLC, SISO y HT-29. La actividad aumenta mediante la sustitución por el grupo donante de electrones metoxo en las líneas celulares A427, LCLC y SISO para el complejo de rutenio **3e**. De forma similar, la sustitución por el grupo donante nitro también aumenta la potencia de **3f** en las líneas celulares A427, LCLC y SISO en comparación con el complejo de rutenio parental **3a**, mientras que muestra un comportamiento mixto en los complejos de iridio con respecto a todas las líneas celulares.

Tabla 5B.1. Resultados de IC₅₀ (μM) para **2a**, **3a–3g** y **4a–4g** y cisplatino a 48 h. Los resultados se muestran como la media ± la desviación estándar de tres experimentos independientes.

Comp.	A2780	A2780cis	5637	A427	LCLC	SISO	HT29	EA.hy926
3a	1,82 ±0,35	2,37±0,10	2,90±0,11	2,58±0,64	3,52±0,58	3,92±0,29	2,88±0,55	7,05±1,07
3b	1,48±0,35	1,46±0,14	2,53±0,57	2,99±0,24	3,50±0,40	3,73±0,34	3,31±0,04	5,49±1,57
3c	1,36±0,07	3,26±0,32	1,87±0,32	1,85±0,29	2,16±0,20	2,05±0,09	2,74±0,11	> 8
3d	1,24±0,45	1,98±0,23	1,25±0,17	1,28±0,07	1,41±0,40	1,39±0,21	1,93±0,07	3,35±0,04
3e	1,56±0,48	2,18±0,22	2,27±0,23	1,84±0,60	2,45±0,46	2,34±0,46	2,76±0,31	5,10±0,25
3f	1,30±0,45	2,52±0,16	2,66±0,19	1,47±0,18	2,32±0,03	2,28±2,26	2,35±0,27	7,21±0,04
3g	1,07±0,34	0,96±0,23	1,56±0,50	1,24±0,07	1,31±0,08	1,82±0,17	1,99±0,08	1,67±0,03
4a	1,78±0,85	2,59±0,42	5,56±0,25	3,78±0,41	9,86±1,04	5,49±0,93	1,37±0,38	2,85±0,10
4b	3,60±0,28	5,65±0,78	9,37±0,53	7,25±0,28	15,14±0,49	13,87±0,17	8,68±0,92	> 8
4c	2,31±0,39	3,37±0,41	2,95±0,71	4,28±0,55	5,58±0,33	4,76±0,87	9,50±0,75	2,99±0,09
4d	2,70±0,13	1,93±0,15	2,45±0,10	2,62±0,56	6,63±0,88	6,65±0,04	3,77±0,31	5,22±0,88
4e	2,78±0,12	1,70±0,38	3,70±0,09	2,35±0,62	5,10±0,33	3,42±0,26	6,27±0,69	1,19±0,05
4f	2,29±0,46	3,76±0,64	5,15±0,12	2,34±0,06	3,47±0,13	3,61±0,93	5,73±0,43	1,98±0,40
4g	1,22±0,41	1,21±0,48	1,48±0,88	1,59±0,34	3,61±0,21	3,79±0,31	4,01±0,56	5,95±0,92
2a	> 15	> 15	> 20	> 50	> 20	> 20	> 25	> 15
CDDP	1,90±0,20	19,57±1,82	3,39±0,05	6,09±1,49	1,92±0,54	0,98±0,07	7,00±0,07	9,86±0,64

Ciertamente en los complejos de rutenio no se detectaron amplias discrepancias entre los grupos con efecto dador o aceptor de electrones para todas las líneas celulares de cáncer estudiadas. Curiosamente, la sustitución de fenilo muestra una mayor potencia

tanto en los complejos rutenio como iridio (**3g** y **4g**, respectivamente) en comparación con sus compuestos progenitores en todas las líneas celulares. En general, los complejos de rutenio son más activos que los correspondientes complejos de iridio.

5B.2.2. Resistencia adquirida

Como es bien conocido, la línea celular A2780cis posee todos los mecanismos principales conocidos de resistencia a cisplatino:²⁷ reducción en los niveles intracelulares de fármaco, reparación del ADN, un aumento a la tolerancia al daño celular, nivel elevado de tiol celular (GSH) e incapacidad de promover vías de muerte celular. La capacidad del compuesto para superar la resistencia adquirida al cisplatino se determinó a partir del factor de resistencia, RF, definido como la relación entre los valores para IC₅₀ de las líneas de ovario resistente y sensible al CDDP. Un RF <2 se considera como el límite más allá del cual el compuesto no denota resistencia cruzada.²⁸ En general, todos los nuevos compuestos estudiados aquí son capaces de superar la resistencia al cisplatino. Los RF son mucho más bajos que el RF de cisplatino (Figura 5B.3).

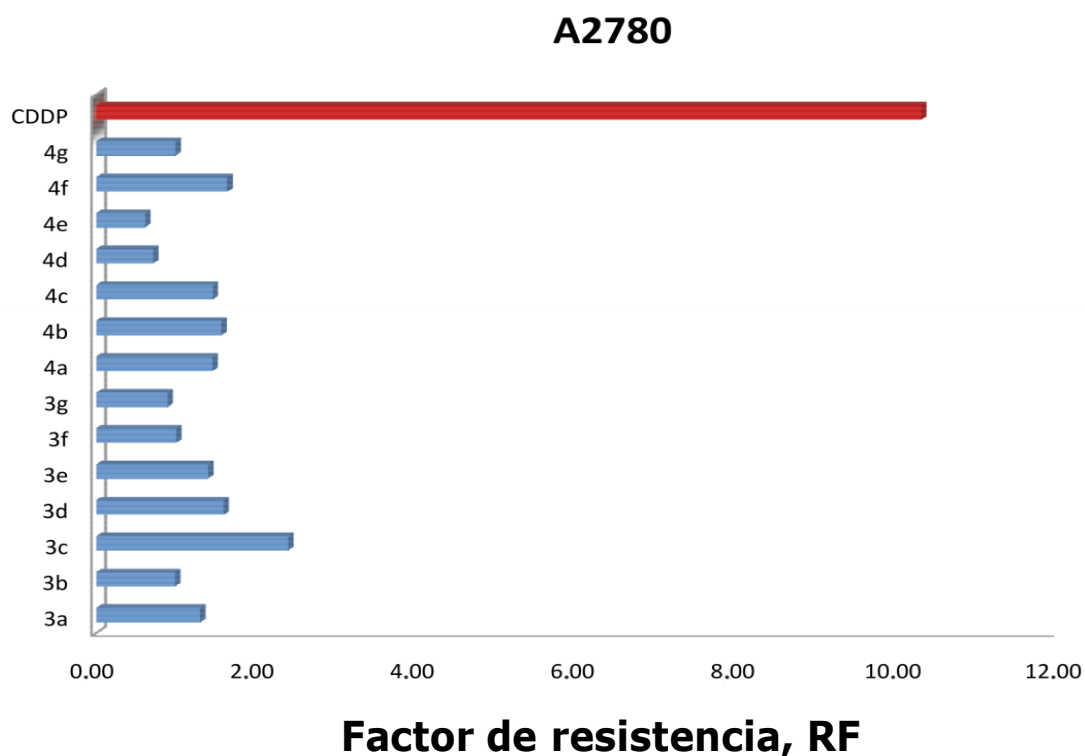


Figura 5B.3. Factor de resistencia, RF, para los complejos estudiados y CDDP, y para las líneas celulares A2780 y A2780cis.

5B.2.3. Estudios de acumulación celular

Se estudió la acumulación celular de los complejos de Ru(II) **3b**, **c** y **g** en las líneas celulares de cáncer de ovario A2780 para investigar la posible relación entre la captación celular y la citotoxicidad. Se determinaron las concentraciones metálicas celulares por absorción atómica (AAS) después de 24 h de la exposición a los compuestos **3b**, **3c** y **3g** a concentración 2 μM . Los resultados se resumen en la Figura 5B.4. Como se observa, para estos compuestos no existe una relación directa entre la acumulación de rutenio celular en las células ováricas A2780 y la citotoxicidad.

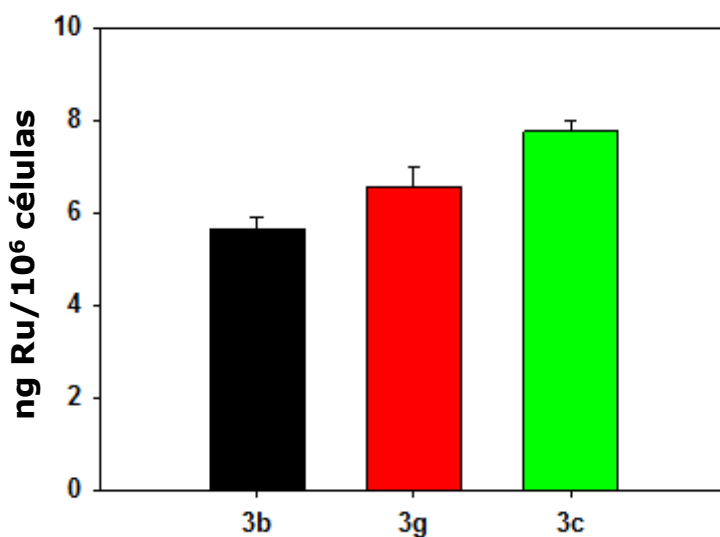


Figura 5B.4. Acumulación intracelular de rutenio en la línea celular A2780 a 24 h de exposición con los complejos **3b**, **3c** y **3g**. Los experimentos se hicieron por triplicado.

5B.2.4. Metal unido a ADN celular

Los niveles de iridio y rutenio en el ADN nuclear se determinaron después de la exposición de las células A2780 a los complejos **3g** y **4g** a una concentración 2 μM durante 24 h. Se encontró que el contenido de iridio del ADN nuclear extraído de las células A2780 tratadas con **4g** era de $0,74 \pm 0,05$ pg de Ir por ng de ADN, un valor muy pequeño comparado con el del complejo de iridio $[(\eta^5\text{-C}_5\text{Me}_4\text{C}_6\text{H}_4\text{C}_6\text{H}_5)\text{Ir}(\text{phen})\text{Cl}]^+$ (phen = fenantrolina), que se ha demostrado que provoca daño al ADN nuclear así como la disfunción mitocondrial en las células de cáncer de ovario.²⁹ Se encontró que el contenido de rutenio del ADN nuclear extraído de las células A2780 tratadas con **3g** era también bajo ($1,1 \pm 0,09$ pg de Ru por ng de ADN). Este resultado concuerda con la distribución intracelular observada para el compuesto de rutenio **3a** en células Ehrlich Lettre'Ascites (ELA) de la Sección 5A: su contenido es elevado en el citosol (78%) en comparación con núcleos y mitocondrias.

5B.2.5. Estudios de apoptosis

Se llevaron a cabo estudios de apoptosis de los complejos de rutenio **3d** y **3f**, y para los complejos de iridio **4d** y **4f** con las líneas celulares 5637 y SISO. La exposición de la fosfatidilserina (PS) al lado externo de la membrana celular, un signo temprano de apoptosis, fue seguido por un ensayo de citometría de flujo basado en el método de Annexin V-FLUOS y yoduro de propidio (IP), que también puede identificar los estados de necrosis o de apoptosis tardía. Como se muestra en la Figura 5B.5, está claro que los complejos **3d**, **3f**, **4d** y **4f** inducen una alta incidencia de apoptosis temprana a tardía en ambas células 5637 y SISO a las 24 h sin aumentar la población necrótica.

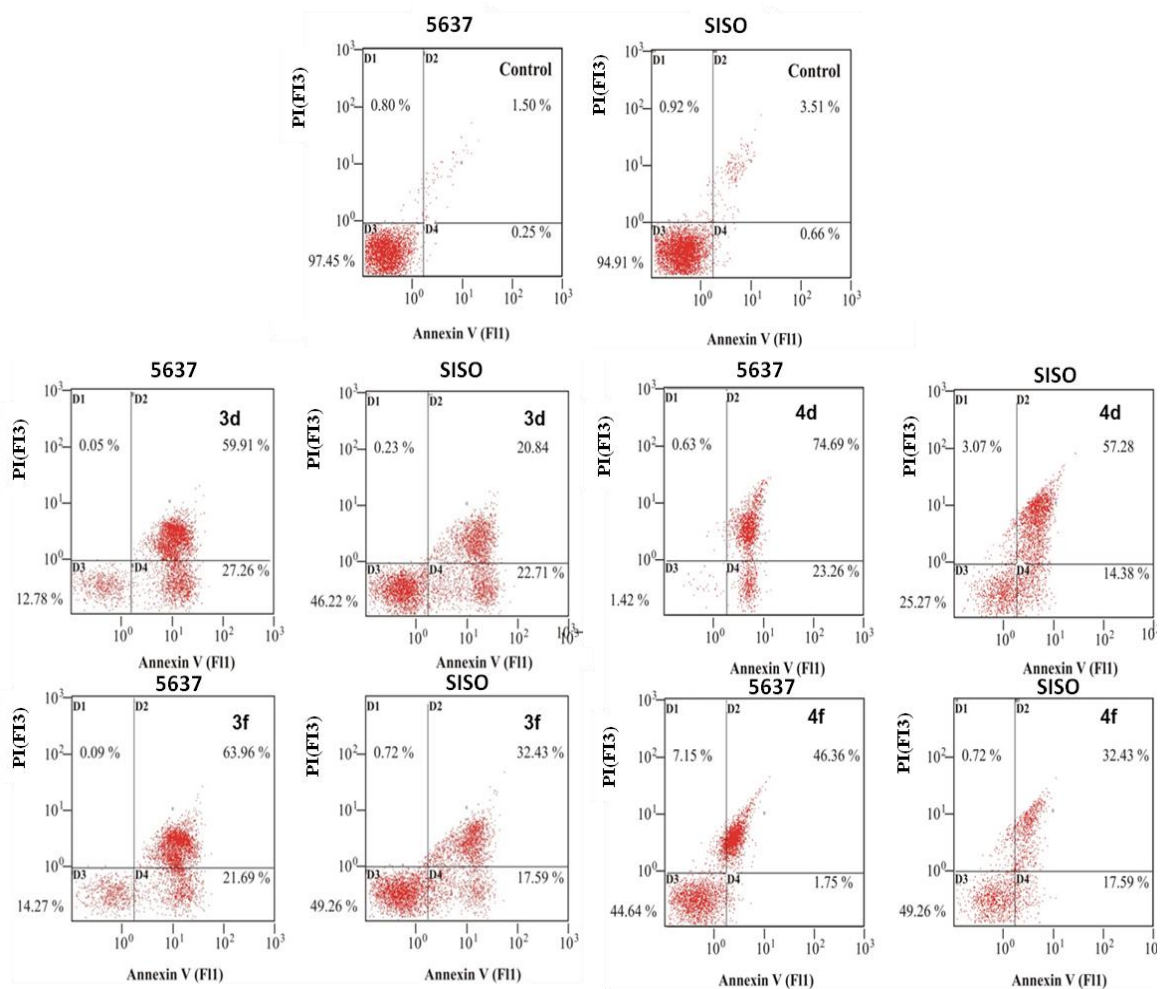


Figura 5B.5. Análisis de citometría de flujo de células tumorales 5637 y SISO después del tratamiento con **3d**, **3f**, **4d** y **4f** detectado por anexina V / PI: gráficos de densidad para las células no tratadas (control) y para las células tratadas con 5 μ M (24 h) de **3d**, **3f**, **4d** y **4f**. Los experimentos se realizaron por triplicado.

5B.2.6. Activación de caspasa 3

Las caspasas (ver apdo. 1.3.3.1) son una familia de cisteín-proteasas que desempeñan papeles esenciales en la apoptosis, necrosis e inflamación.³⁰ Se pueden usar métodos colorimétricos (ver apdo. 2.10) para medir su activación cuando la secuencia DEVD está marcada con p-NA (apdo. 2.10).³¹ Como se muestra en la Figura 5B.6, los complejos **3a, d** y **4a, d** aumentaron la actividad de caspasa-3 en células A2780 (monitorizadas espectrofotométricamente usando el sustrato DEVD-pNA).

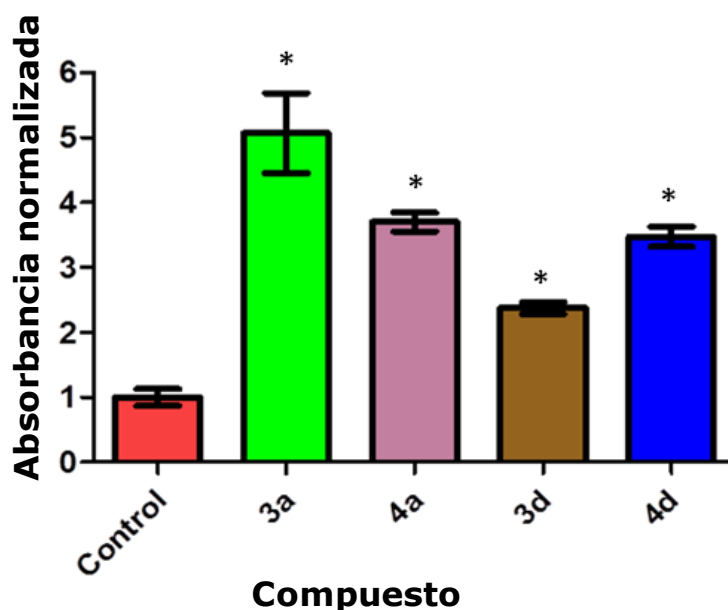


Figura 5B.6. Activación de la caspasa-3 en células de cáncer de ovario A2780 causada por exposición de 24 h a los complejos **3a, d** y **4a, d** a 37 °C. Los resultados se expresan como absorbancia a 410 nm (detección de p-nitroanilina después de la escisión del sustrato marcado DEVD-pNA). Las concentraciones de los complejos fueron de 2 μ M. Control: células de control no tratadas. * $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo.

5B.2.7. Detención del ciclo celular

Para comprender el modo de actuación de los complejos **3d** y **3f** se examinó su efecto sobre el ciclo celular mediante análisis por citometría de flujo (FACS) en las células tumorales 5637 y SISO (concentración de complejo 1 μ M durante 24 h, Figura 5B.7). Los comportamientos de los compuestos fueron distintos, tanto dentro de la misma línea como para las diferentes líneas celulares. El compuesto **3d** detiene el ciclo en la fase G₂/M en ambas líneas celulares. Sin embargo, el complejo **3f** lo detiene en la fase G₀/G₁ de las células 5637 pero en la fase G₂/M en la línea celular SISO.

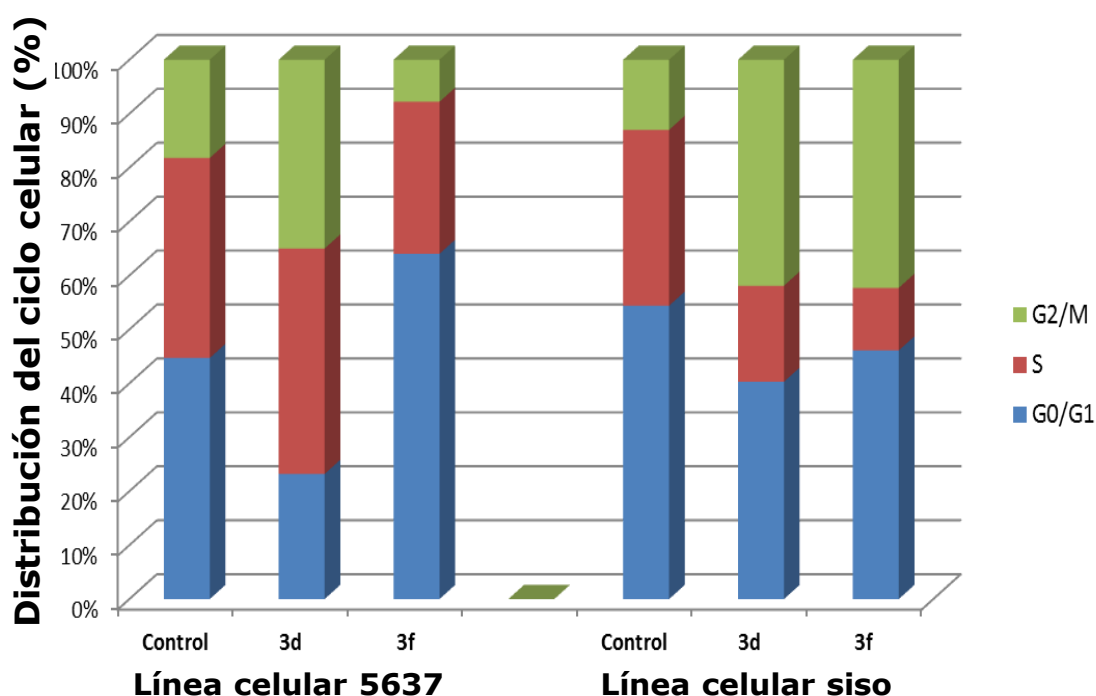


Figura 5B.7. Análisis del ciclo celular de las células cancerosas 5637 y SISO después de 24 h de tratamiento con $1 \mu\text{M}$ de compuestos **3d** y **3f** a $37 \text{ }^\circ\text{C}$.

5B.2.8. Determinación de especies reactivas de oxígeno

Para determinar la producción de ROS de los compuestos **3g** y **4g** sobre las células A2780 se utilizó diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (DCFH-DA) (ver apdo. 2.11). A efectos comparativos también se realizó el mismo ensayo con cisplatino. El método DCFH-DA está diseñado para proporcionar una evaluación altamente sensible, cuantificable y en tiempo real de la producción de ROS.^{29,32,33} Las células A2780 no tratadas, tratadas con $1 \mu\text{M}$ y $2 \mu\text{M}$ de **3g**, **4g** o cisplatino se incubaron con DCFH-DA a una concentración de $25 \mu\text{M}$ durante 30 minutos en oscuridad. Una vez en el interior celular la DCFH-DA se desacetila por la acción esterasas para formar el compuesto no fluorescente 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (DCFH). Seguidamente, DCFH se convierte en DCF a través de la acción de peroxidasas en presencia de ROS. Después de la incubación, se midió la fluorescencia resultante y se representaron los datos en la Figura 5B.8. El tratamiento de las células A2780 con **4g** a $2 \mu\text{M}$ dio como resultado un aumento de la fluorescencia, indicando la producción de ROS.

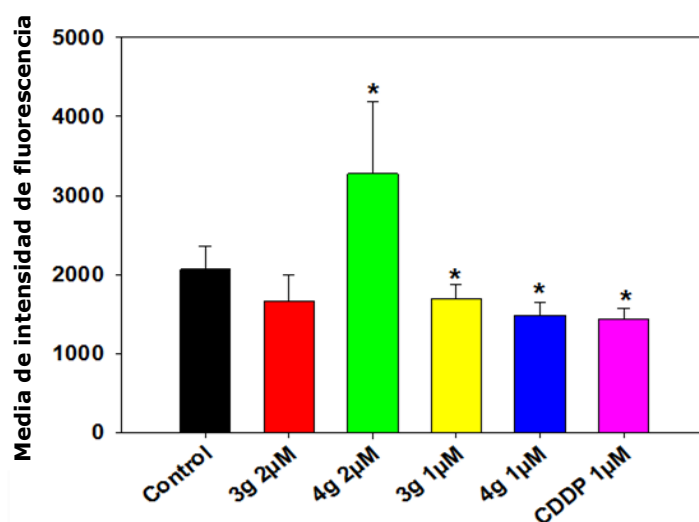


Figura 5B.8. Generación de ROS en células A2780 inducidas por diversas concentraciones de **3g**, **4g** (1 μM y 2 μM) o cisplatino (1 μM). * $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo. Los experimentos se hicieron por triplicado.

5B.2.9. Inhibición de la formación de tubos vasculares

La angiogénesis se evalúa principalmente por la capacidad de las células endoteliales para brotar, migrar y formar tubos vasculares *in vitro* en una matriz de Matrigel, una mezcla de proteínas gelatinosa secretada por células de sarcoma de ratón Engelbreth-Holm-Swarm (EHS).^{34,35}

La angiogénesis *in vitro* se midió 16 h después de incubar células EA.hy926 con los compuestos **3a-3g** y **4a-4g** a concentraciones de 0,5 μM (Figura 5B.9A). La concentración baja se utilizó para trabajar a su concentración subcitotóxica para las células endoteliales EA.hy926 (Tabla 5B.1). La formación o inhibición resultante de estructuras de tipo tubular se cuantificó (Figura 5B.9B) utilizando una combinación de los tres parámetros más representativos (ver apdo. 2.8.1): longitud total (μm), número de mallas (red o estructuras poligonales) y área total de mallas (área ocupada por las mallas, μm^2). Sólo aquellos compuestos que dieron diferencias significativas en todos los parámetros estudiados se consideraron antiangiogénicos.³⁴ A una concentración de 0,5 μM todos los complejos inhiben la formación de tubos vasculares. Los compuestos **3d** y **3g** son los inhibidores angiogénicos más activos en las células EA.hy926 a concentraciones subcitotóxicas, y al mismo tiempo también son fuertemente citotóxicos en las líneas celulares de cáncer ensayadas (Tabla 5B.1). Así, concluimos que **3d** y **3g** son compuestos con capacidad dual como citotóxicos y antiangiogénicos.

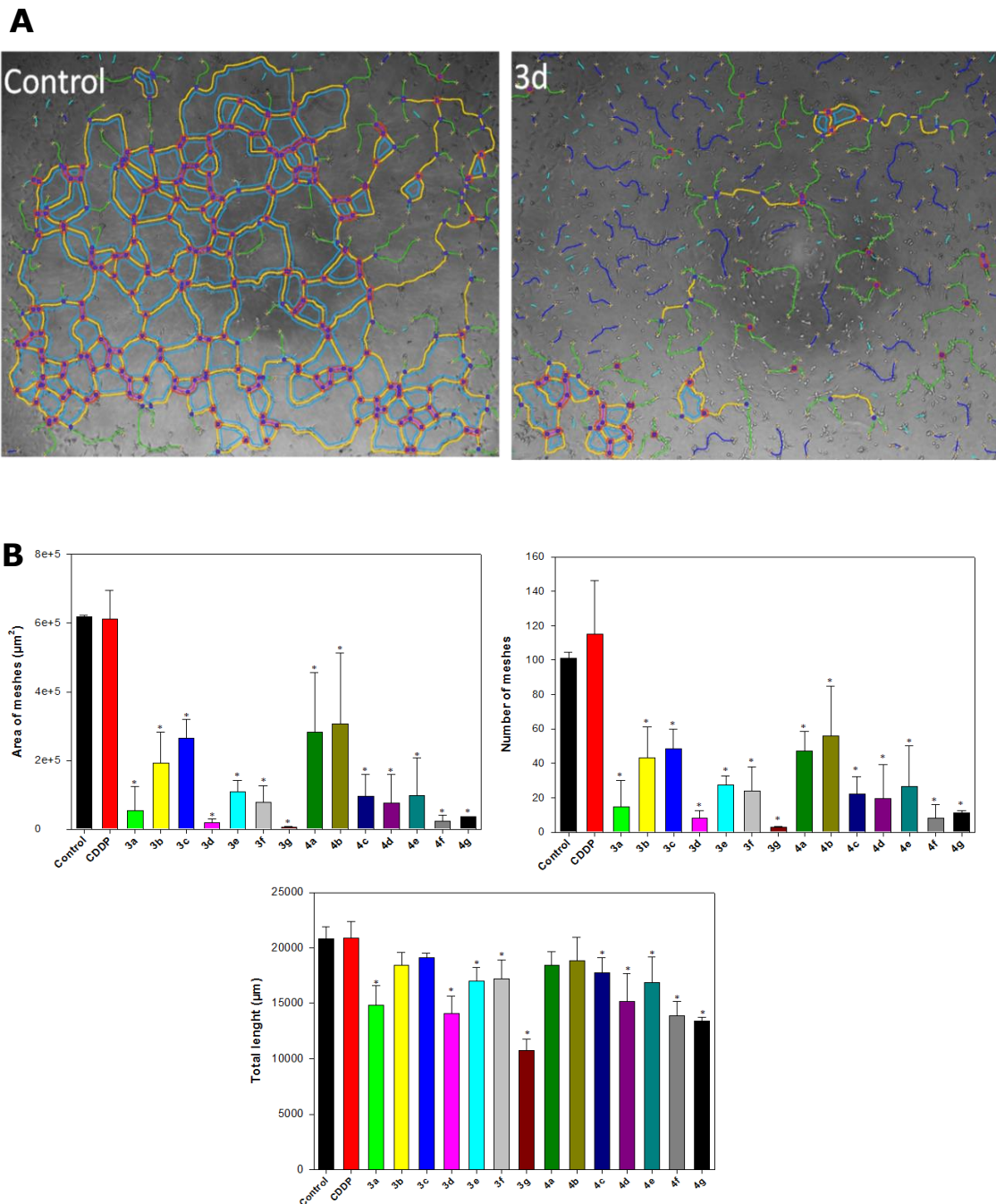


Figura 5B.9. Efecto de los complejos de metal con benzimidazol en el ensayo de formación de tubos de células endoteliales. (A) Imágenes típicas después de un proceso con el programa ImageJ (apdo. 8.1 de Materiales y Métodos) de células EA.hy926 añadidas a placas de 96 pocillos previamente preparadas con Matrigel durante 16 h: para medio de cultivo como control y con **3d**, 0,5 µM. La formación de tubos por las células EA.hy926 se fotografió bajo un microscopio de contraste de fase invertido. (B) Cuantificación después del proceso con el software ImageJ del número de redes, área de redes totales y longitud total de la estructura tubular de células EA.hy926 a 0,5 µM de los compuestos **3a-3g** y **4a-4g** y CDDP durante 16 h. Las barras de error representan la desviación estándar de tres experimentos independientes. * $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo.

5B.3. Conclusiones

Se ha estudiado la actividad biológica de los nuevos complejos C^N-ciclometalados de Ru(II) e Ir(III) con ligandos 2-arilbenzimidazol de los tipos [$(\eta^6\text{-}p\text{-cymeno})\text{RuCl}(\kappa^2\text{-}N, \text{C-L})$] y [$(\eta^5\text{-C}_5\text{Me}_5)\text{IrCl}(\kappa^2\text{-}N, \text{C-L})$] (HL = 2-arilbenzimidazol modificado) con diversos sustituyentes (H, Me, F, CF₃, MeO, NO₂ y Ph) en la posición R₄ del anillo de fenilo del ligando quelato 2-fenilbenzimidazol de los complejos de rutenio (**3a-3g**) y de iridio (**4a-4g**). Así, se ha evaluado la actividad citotóxica de los nuevos compuestos de Ru(II) e Ir(III) en un panel de líneas celulares de cáncer humano (A2780, A427, 5637, LCLC, SISO y HT-29) para establecer una relación estructura-actividad en estas familias de compuestos. La mayoría de los nuevos compuestos son más activos que el CDDP en las líneas celulares A427 y HT-29. La sustitución por el grupo fenilo muestra una potencia inhibidora incrementada en los complejos Ru e Ir (**3g** y **4g**, respectivamente) en comparación con sus compuestos predecesores en todas las líneas celulares. En general, los complejos de rutenio son más activos que los correspondientes complejos de iridio. Los nuevos compuestos de rutenio e iridio aumentaron la actividad de caspasa-3 en células A2780, como se muestra para **3a, d** y **4a, d**. Además, todos los nuevos compuestos son capaces de superar la resistencia al cisplatino en células A2780cis. El compuesto **4g** es capaz de aumentar la producción de ROS en células A2780 a 2 μM . Se encontró que el contenido de metal del ADN nuclear extraído de las células A2780 tratadas con **3g** y **4g** era bajo. Además, algunos de los complejos metálicos inhiben eficazmente la angiogénesis en la línea celular endotelial de vena umbilical humana EA.hy926 a 0,5 μM , siendo los derivados de rutenio **3g** (Ph) y **3d** (CF₃) los mejores inhibidores. También se ha observado la formación de tubos en EA.hy926, cuantificada con el software ImageJ. Estos nuevos compuestos organometálicos de Ru(II) e Ir(III) poseen una variedad de interesantes efectos biológicos que los hacen atractivos como potenciales fármacos contra el cáncer.

5B.4. Bibliografía

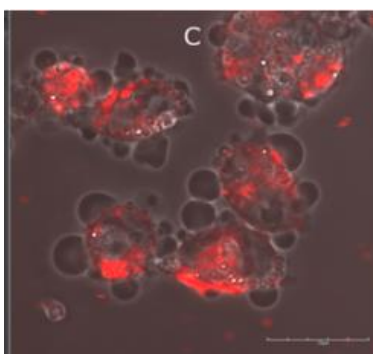
1. Rosenberg, B.; VanCamp, L.; Trosko, J. E.; Mansour, V. H. "Platinum compounds: a new class of potent antitumour agents", **1969**, *Nature*, (222), 385-386.
2. Kelland, L. "The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy", **2007**, *Nat Rev Cancer*, (7), 573-584.
3. Medici, S.; Peana, M.; Nurchi, V. M.; Lachowicz, J. I.; Crisponi, G.; Zoroddu, M. A. "Noble metals in medicine: Latest advances", **2015**, *Coord Chem Rev*, (284), 329-350.
4. Barry, N. P.; Sadler, P. J. "Exploration of the medical periodic table: towards new targets", **2013**, *Chem Commun*, (49), 5106-5131.
5. Hartinger, C. G.; Dyson, P. J. "Bioorganometallic chemistry--from teaching paradigms to medicinal applications", **2009**, *Chem Soc Rev*, (38), 391-401.

6. Kandioller, W.; Hartinger, C. G.; Nazarov, A. A.; Bartel, C.; Skocic, M.; Jakupec, M. A.; Arion, V. B.; Keppler, B. K. "*Maltol-derived ruthenium-cymene complexes with tumor inhibiting properties: the impact of ligand-metal bond stability on anticancer activity in vitro*", **2009**, *Chemistry*, (15), 12283-12291.
7. Ma, J.; Waxman, D. J. "*Combination of antiangiogenesis with chemotherapy for more effective cancer treatment*", **2008**, *Mol Cancer Ther*, (7), 3670-3684.
8. Teoh, D. G.; Secord, A. A. "*Antiangiogenic therapies in epithelial ovarian cancer*", **2011**, *Canc Cont*, (18), 31-43.
9. Rademaker-Lakhai, J. M.; van den Bongard, D.; Pluim, D.; Beijnen, J. H.; Schellens, J. H. "*A Phase I and pharmacological study with imidazolium-trans-DMSO-imidazole-tetrachlororuthenate, a novel ruthenium anticancer agent*", **2004**, *Clin Cancer Res*, (10), 3717-3727.
10. Yang, L.; Zhang, J.; Wang, C.; Qin, X.; Yu, Q.; Zhou, Y.; Liu, J. "*Interaction between 8-hydroxyquinoline ruthenium(II) complexes and basic fibroblast growth factors (bFGF): inhibiting angiogenesis and tumor growth through ERK and AKT signaling pathways*", **2014**, *Metallomics*, (6), 518-531.
11. Nowak-Sliwinska, P.; van Beijnum, J. R.; Casini, A.; Nazarov, A. A.; Wagnieres, G.; van den Bergh, H.; Dyson, P. J.; Griffioen, A. W. "*Organometallic ruthenium(II) arene compounds with antiangiogenic activity*", **2011**, *J Med Chem*, (54), 3895-3902.
12. Clavel, C. M.; Paunescu, E.; Nowak-Sliwinska, P.; Griffioen, A. W.; Scopelliti, R.; Dyson, P. J. "*Modulating the Anticancer Activity of Ruthenium(II)-Arene Complexes*", **2015**, *J Med Chem*, (58), 3356-3365.
13. Wilbuer, A.; Vlecken, D. H.; Schmitz, D. J.; Kraling, K.; Harms, K.; Bagowski, C. P.; Meggers, E. "*Iridium complex with antiangiogenic properties*", **2010**, *Angew Chem Int Ed Engl*, (49), 3839-3842.
14. Zamora, A.; Perez, S. A.; Rodriguez, V.; Janiak, C.; Yellol, G. S.; Ruiz, J. "*Dual antitumor and antiangiogenic activity of organoplatinum(II) complexes*", **2015**, *J Med Chem*, (58), 1320-1336.
15. Yellol, G. S.; Donaire, A.; Yellol, J. G.; Vasylyeva, V.; Janiak, C.; Ruiz, J. "*On the antitumor properties of novel cyclometalated benzimidazole Ru(II), Ir(III) and Rh(III) complexes*", **2013**, *Chem Commun*, (49), 11533-11535.
16. Wang, F. et al. "*Controlling ligand substitution reactions of organometallic complexes: Tuning cancer cell cytotoxicity*", **2005**, *Proc Natl Acad Sci U S A*, (102), 18269-18274.
17. Mariana, B.; Mercedes, G. "*Imidazole and Benzimidazole Derivatives as Chemotherapeutic Agents*", **2005**, *Mini-Rev Med Chem*, (5), 409-424.
18. Bansal, Y.; Silakari, O. "*The therapeutic journey of benzimidazoles: a review*", **2012**, *Bioorg Med Chem*, (20), 6208-6236.
19. Dam, C. S.; Perez Henarejos, S. A.; Tsolakou, T.; Alexander Segato, C.; Gammelgaard, B.; Yellol, G. S.; Ruiz, J.; Lambert, I. H.; Sturup, S. "*In vitro characterization of a novel C,N-cyclometalated benzimidazole Ru(II) arene complex: stability, intracellular distribution and binding, effects on organic osmolyte homeostasis and induction of apoptosis*", **2015**, *Metallomics*, (7), 885-895.
20. Martinez-Alonso, M.; Busto, N.; Jalon, F. A.; Manzano, B. R.; Leal, J. M.; Rodriguez, A. M.; Garcia, B.; Espino, G. "*Derivation of structure-activity relationships from the anticancer properties of ruthenium(II) arene complexes with 2-aryldiazole ligands*", **2014**, *Inorg Chem*, (53), 11274-11288.
21. Yellol, G. S.; Yellol, J. G.; Kenche, V. B.; Liu, X. M.; Barnham, K. J.; Donaire, A.; Janiak, C.; Ruiz, J. "*Synthesis of 2-pyridyl-benzimidazole iridium(III), ruthenium(II), and platinum(II) complexes. study of the activity as inhibitors of amyloid-beta aggregation and neurotoxicity evaluation*", **2015**, *Inorg Chem*, (54), 470-475.

22. Bhaumik, C.; Saha, D.; Das, S.; Baitalik, S. "Synthesis, structural characterization, photophysical, electrochemical, and anion-sensing studies of luminescent homo- and heteroleptic ruthenium(II) and osmium(II) complexes based on terpyridyl-imidazole ligand", **2011**, *Inorg Chem*, (50), 12586-12600.
23. Maity, D.; Das, S.; Mardanya, S.; Baitalik, S. "Synthesis, structural characterization, and photophysical, spectroelectrochemical, and anion-sensing studies of heteroleptic ruthenium(II) complexes derived from 4'-polyaromatic-substituted terpyridine derivatives and 2,6-bis(benzimidazol-2-yl)pyridine", **2013**, *Inorg Chem*, (52), 6820-6838.
24. Chow, M. J.; Licon, C.; Yuan Qiang Wong, D.; Pastorin, G.; Gaiddon, C.; Ang, W. H. "Discovery and investigation of anticancer ruthenium-arene Schiff-base complexes via water-promoted combinatorial three-component assembly", **2014**, *J Med Chem*, (57), 6043-6059.
25. Sersen, S.; Kljun, J.; Kryeziu, K.; Panchuk, R.; Alte, B.; Korner, W.; Heffeter, P.; Berger, W.; Turel, I. "Structure-Related Mode-of-Action Differences of Anticancer Organoruthenium Complexes with beta-Diketonates", **2015**, *J Med Chem*, (58), 3984-3996.
26. Bracht, K.; Boubakari; Grunert, R.; Bednarski, P. J. "Correlations between the activities of 19 anti-tumor agents and the intracellular glutathione concentrations in a panel of 14 human cancer cell lines: comparisons with the National Cancer Institute data", **2006**, *Anticancer Drugs*, (17), 41-51.
27. Wang, D.; Lippard, S. J. "Cellular processing of platinum anticancer drugs", **2005**, *Nat Rev Drug Discov*, (4), 307-320.
28. Kelland, L. R.; Barnard, C. F.; Mellish, K. J.; Jones, M.; Goddard, P. M.; Valenti, M.; Bryant, A.; Murrer, B. A.; Harrap, K. R. "A novel trans-platinum coordination complex possessing in vitro and in vivo antitumor activity", **1994**, *Cancer Res*, (54), 5618-5622.
29. Novohradsky, V.; Zerzankova, L.; Stepankova, J.; Kisova, A.; Kosthunova, H.; Liu, Z.; Sadler, P. J.; Kasparkova, J.; Brabec, V. "A dual-targeting, apoptosis-inducing organometallic half-sandwich iridium anticancer complex", **2014**, *Metallomics*, (6), 1491-1501.
30. Salvesen, G. S.; Riedl, S. J. "Caspase mechanisms", **2008**, *Adv Exp Med Biol*, (615), 13-23.
31. Gurtu, V.; Kain, S. R.; Zhang, G. "Fluorometric and colorimetric detection of caspase activity associated with apoptosis", **1997**, *Anal Biochem*, (251), 98-102.
32. Robinson, J. P.; Bruner, L. H.; Bassoe, C. F.; Hudson, J. L.; Ward, P. A.; Phan, S. H. "Measurement of intracellular fluorescence of human monocytes relative to oxidative metabolism", **1988**, *J Leukoc Biol*, (43), 304-310.
33. Kalyanaraman, B. et al. "Measuring reactive oxygen and nitrogen species with fluorescent probes: challenges and limitations", **2012**, *Free Radic Biol Med*, (52), 1-6.
34. Aranda, E.; Owen, G. I. "A semi-quantitative assay to screen for angiogenic compounds and compounds with angiogenic potential using the EA.hy926 endothelial cell line", **2009**, *Biol Res*, (42), 377-389.
35. Khoo, C. P.; Micklem, K.; Watt, S. M. "A comparison of methods for quantifying angiogenesis in the Matrigel assay in vitro", **2011**, *Tissue Eng Part C Methods*, (17), 895-906.

Sección 5C

Actividad teranóstica de derivados heterolépticos de iridio(III)



Los resultados de esta Sección se han publicado en:

Yellol, J.; Perez, S. A.; Yellol, G.; Zajac, J.; Donaire, A.; Viguera, G.; Novohradsky, V.; Janiak, C. *"Highly potent extranuclear-targeted luminescent iridium(III) antitumor agents containing benzimidazole-based ligands with a handle for functionalization"*, **2016**, *Chem Commun* (52), 14165-14168.

5C.1. Introducción

Los fármacos basados en platino tales como cisplatino (CDDP), carboplatino y oxaliplatino se usan ampliamente y de manera habitual contra diversos tumores sólidos.¹ Estos complejos ejercen su actividad anticancerígena principalmente a través de un extenso aducto con el ADN, que desencadena la muerte celular por apoptosis. Sin embargo, se sigue discutiendo su eficacia debido a problemas clínicos, incluyendo resistencia adquirida o intrínseca,² un limitado espectro de actividad y su alta toxicidad, que produce efectos secundarios.³ Otros metales de la serie de transición, como el rutenio y el iridio, atraen cada vez más atención como agentes terapéuticos,⁴⁻¹¹ y como sondas biomoleculares y celulares.^{12,13} Por otro lado, el benzimidazol es un farmacóforo ampliamente utilizado.¹⁴ El modo de acción como agentes antiangiogénicos de algunos compuestos de iridio(III) semi-sándwich con benzimidazol ya se ha discutido en la presente Tesis (Sección 5B). Algunos compuestos análogos actúan también como inhibidores de la agregación amiloide en la enfermedad de Alzheimer.¹⁰ Dentro del desarrollo de nuevos metalofármacos, en este capítulo se describen una serie de agentes antitumorales luminiscentes de iridio(III) del tipo $[\text{Ir}(\text{C}^{\wedge}\text{N})_2(\text{N}^{\wedge}\text{N})][\text{PF}_6]$ (Figura 5C.1) que contienen un ligando $\text{N}^{\wedge}\text{N}$ de benzimidazol (**a** y **b** en la Figura 5C.1) con un grupo éster como herramienta útil para una funcionalización adicional. Asimismo, estos ligandos constan de un butilo como un grupo sustituyente al N, elegido inicialmente para modular las propiedades lipófilas del complejo final, junto con diversos ligandos tipo $\text{C}^{\wedge}\text{N}$ basados en 2-fenilbenzimidazol (**HL**¹ y **HL**² en la Figura 5C.1B) y 1-fenilpirazol (**HL**³). También se han estudiado, a efectos comparativos, los complejos de iridio **1c**, **2c** y **3c**, que contienen el ligando $\text{N}^{\wedge}\text{N}$ no sustituido 2-(2-piridil)-benzimidazol.

5C.2. Resultados y discusión

5C.2.1. Estudios de citotoxicidad

La citotoxicidad de los nuevos complejos **1a-c**, **2a-c** y **3a-c** se evaluó frente a un panel de líneas celulares de cáncer humano tales como A2780 (células de cáncer de ovario humano), A2780cis (resistencia adquirida a CDDP) y líneas tumorales de mama MCF-7 (ER+) y MDA-MB-231 (triple negativo). Debido a la baja solubilidad acuosa de los complejos, los compuestos ensayados se disolvieron primero en DMSO y luego se diluyeron en serie en medio de cultivo completo de tal manera que el contenido eficaz de DMSO no excediera de 0,4%. Se usó CDDP, diluido en agua, como control positivo.

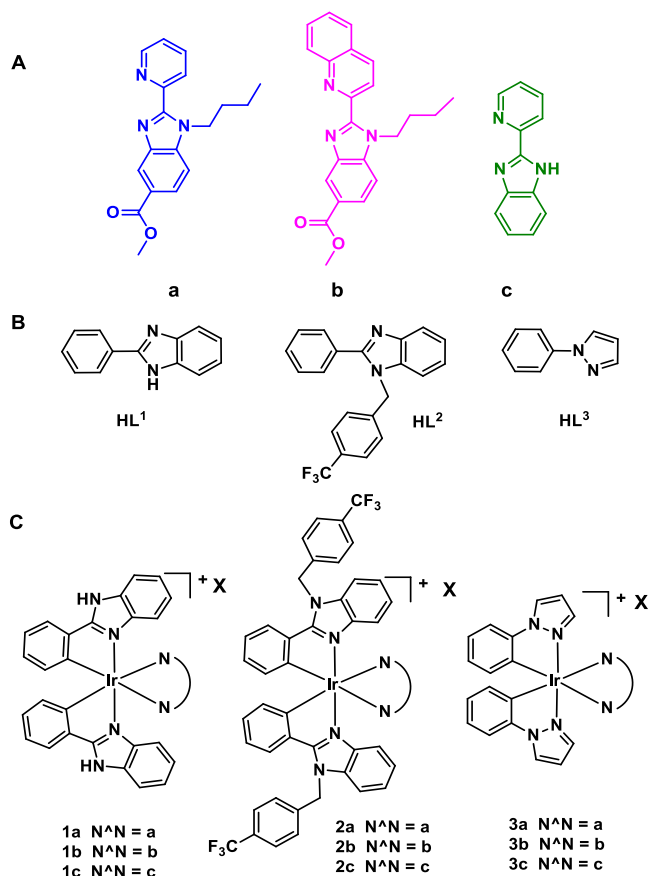


Figura 5C.1. Esquema de los compuestos de Ir(III) estudiados en esta Sección.

Como se muestra en la Tabla 5C.1, los 6 compuestos de iridio que contienen un grupo butilo unido al ligando N[^]N de benzimidazol y un grupo de anclaje del complejo para la funcionalización son altamente citotóxicos en células cancerosas A2780 (**2a** y **3b** siete veces más citotóxicas que CDDP). De hecho, son aproximadamente 100 veces más citotóxicas que CDDP en células MDA-MB-231 en la mayoría de los casos. Los ligandos **a**, **b**, **HL¹** y **HL²** no son citotóxicos, con valores de IC₅₀ superiores a 10 μM para todas las líneas celulares de cáncer estudiadas. Los derivados de iridio menos activos fueron **1c**, **2c** y **3c**, es decir, aquellos complejos que contienen el ligando **c**, 2-(2-piridil)-benzimidazol, menos lipófilo como un ligando N[^]N neutro. Además, la mayoría de los complejos superan la resistencia adquirida al CDDP en la línea celular A2780cis (Tabla 5C.1) y sus factores de resistencia (RFs) son mucho más bajos que los del CDDP. Por otro lado, la selectividad diferencial de un fármaco anticancerígeno frente a las células cancerosas y a las células sanas aumenta la probabilidad de citotoxicidad específica del tumor, reduciendo los efectos secundarios en los pacientes. Por lo tanto, la actividad antiproliferativa de compuestos de iridio y CDDP también se evaluó en una línea de células sanas de riñón BGM (riñón de mono verde africano, Tabla 5C.1). Se encontró que todos los complejos (excepto **1b**) eran

menos tóxicos que CDDP en esta línea celular de riñón. Eso puede contribuir a superar la nefrotoxicidad, que es uno de los efectos secundarios más agresivos de la quimioterapia.

Tabla 5C.1. IC₅₀ (μM) para CDDP y los compuestos **1a-c**, **2a-c**, y **3a-c** a 48 h.

Comp.	A2780	A2780cis	MCF-7	MDA-MB-231	BGM
1a	2,490±0,194	1,940±0,100	3,950±0,120	1,330±0,036	> 20
1b	0,352±0,008	0,562±0,010	0,182±0,071	0,374±0,022	0,430±0,080
1c	>10	>10	>10	>10	>20
2a	0,197±0,037	0,261±0,011	0,459±0,047	0,305±0,016	>20
2b	0,329±0,007	0,319±0,008	0,562±0,052	0,283±0,021	10,280±0,370
2c	>10	>10	>10	>10	>20
3a	0,322±0,005	0,518±0,009	0,331±0,005	0,724±0,027	>20
3b	0,184±0,008	0,077±0,015	>10	0,248±0,026	6,030±0,210
3c	>10	>10	>10	>10	>20
CDDP	1,410±0,050	34,120±6,810	7,150±0,100	24,310±4,170	5,450±0,150

5C.2.2. Estudios de microscopía confocal

Se realizaron estudios de microscopía confocal con células de carcinoma de ovario humano A2780 tratadas con el compuesto de iridio fosforescente **2a** durante 3 h. Para este tiempo tan corto se espera que el IC₅₀ sea considerablemente mayor que el valor mostrado para **2a** a 48 h, Tabla 5C.1).

La luminiscencia estable y brillante de **2a** nos permitió evaluar su localización después del tratamiento de las células. Se realizó una exposición a las células en microscopio confocal excitando a 405 nm. Esta longitud de onda no proporciona el mejor rendimiento cuántico de luminiscencia de acuerdo con los parámetros espectrales del compuesto de iridio **2a**, pero sigue siendo la longitud de onda más cercana a los máximos de absorción de este compuesto. Como se muestra en la Figura 5C.2, la acumulación predominante de compuesto **2a** se produce en el citoplasma de las células. Es interesante remarcar que los complejos de iridio se localizan principalmente en la corteza de actina (Figura 5C.2A), capa especializada de proteína citoplásmica en la cara interna de la membrana plasmática de la periferia celular.^{15,16} Esta corteza de actina funciona como un modulador del comportamiento de la membrana plasmática y de las propiedades de la superficie celular. Además, la hipótesis de que los complejos de iridio se localizan

principalmente en la corteza de actina se apoya en el origen de las vesículas celulares observadas después del tratamiento (Figuras 5C.2B, 5C.2C).^{16,17}

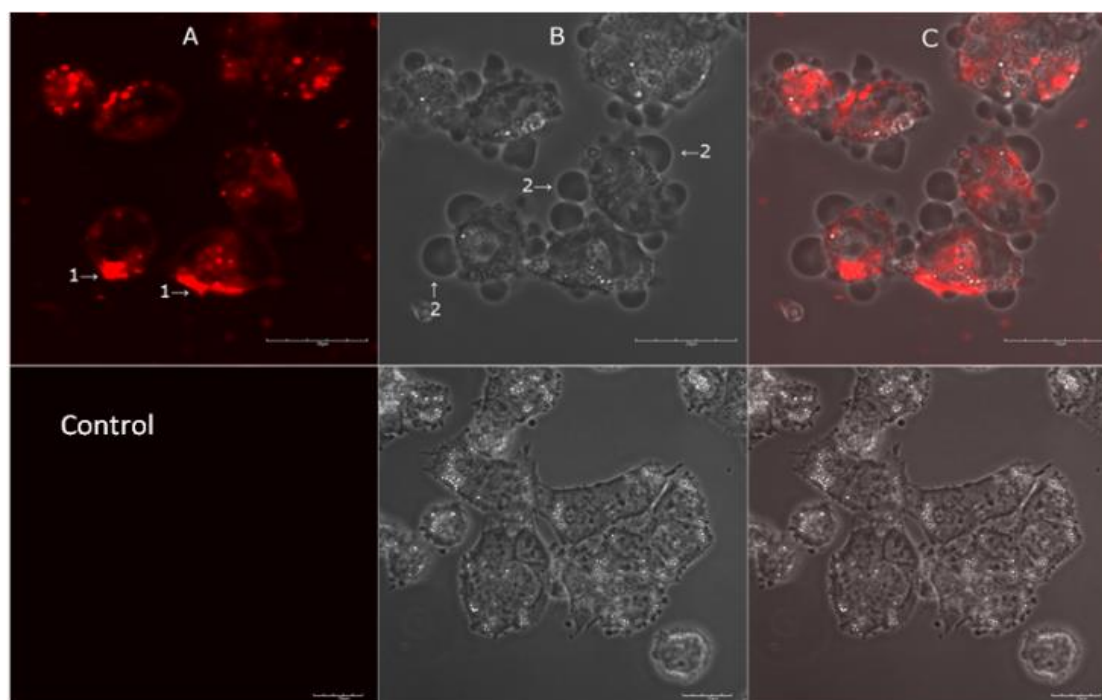


Figura 5C.2. Estudios de microscopía confocal de células A2780 tratadas con **2a**. Las células se expusieron al complejo de Iridio ($5 \mu\text{M}$) durante 3 h (fila superior). 1) En la foto A designa la acumulación en la corteza de actina; 2) En la foto B designa protrusiones de membrana (ampollas). Los controles (fila inferior) se trataron con la cantidad correspondiente de DMSO (sólo se muestra una figura representativa). A (columna izquierda), luminiscencia; B (columna central) contraste de fases; C (derecha), superposición de ambos canales.

5C.2.3. Estudios de detención del ciclo celular

El análisis mediante citometría de flujo (FACS) y marcaje con ioduro de propidio (IP) al ADN sirvió para estudiar el efecto de los complejos **2a** y **3a** sobre el crecimiento celular en A2780. Una vez obtenidos los histogramas, después del tratamiento de la línea celular con $0,5 \mu\text{M}$ de **2a** y **3a** durante 24 h (Figura 5C.3), se encontraron que ambos compuestos detienen el crecimiento celular en la fase G_0/G_1 de una forma muy significativa, ya que en el control el porcentaje de células en esta fase es de 48,3 % y pasa a 70,4 % en **2a** y 68,9 % en **3a**, respectivamente, en detrimento tanto de la fase S como de la fase G_2 . Estos resultados avalarían la localización intracelular del compuesto **2a** en la corteza de actina, modificando o impidiendo la movilidad celular, por lo que las células tumorales no podrían ni replicarse ni dividirse.

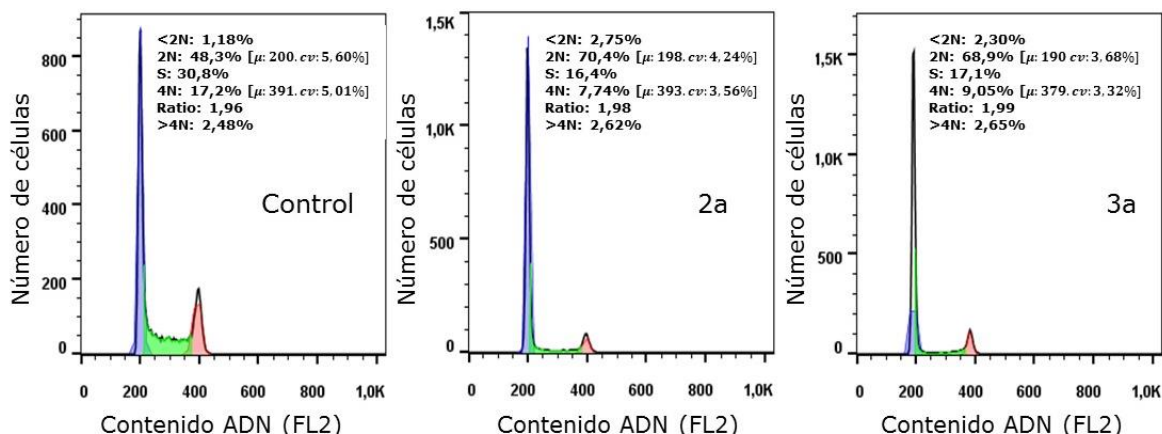


Figura 5C.3. Histogramas de detención del ciclo celular para los compuestos **2a**, **3a** y CDDP.

5C.2.4. Estudios de apoptosis y caspasa-3

Se estudiaron simultáneamente la acción de los complejos **2a** y **3a** en la línea de cáncer de ovario A2780 a una concentración de 0,5 μM para la inducción de apoptosis y producción de caspasa-3 por citometría de flujo y se compararon los resultados con células sin tratar (control). Los resultados de producción de caspasa-3 no mostraron cambio ninguno cuando se exponían las células a los complejos frente al control (Figura 5C.4). Por otro lado, se observó una baja translocación de la fosfatidilserina a la cara externa de la membrana celular, frente a un incremento significativo en la emisión del yoduro de propidio, llegando a desplazar a toda la población al cuadrante Q1 (necrosis) en el caso de **2a**, y cuadrantes Q1 y Q2 para el complejo **3a** (necrosis, apoptosis tardía). Estos resultados, junto con la localización celular obtenida por microscopia confocal y la detención del ciclo celular, llevan a pensar que los complejos **2a** y **3a** provocan una alteración de funcionalidad a nivel de membrana, la cual haría imposible translocar la fosfatidilserina, perdería funcionalidad haciéndose permeable y no selectiva para el yoduro de propidio. Si realmente estuviéramos frente a una muerte celular dependiente de caspasas habría cambios en la producción de caspasa-3 o se mostrarían otros diagramas típicos de apoptosis o necrosis.

5C.2.5. Estudios de acumulación celular

Se investigó la acumulación celular total de los complejos de Ir(III) **2a** y **3a** y CDDP en las líneas celulares de cáncer MCF-7 con el fin de intentar encontrar una posible relación entre la captación celular y la citotoxicidad. Las concentraciones celulares se determinaron mediante ICP-MS después de 24 h de exposición a **2a**, **3a** o CDDP a una concentración de 0,5 μM . Como se muestra en la Tabla 5C.2, la acumulación celular total de iridio de **2a** o **3a** en células MCF-7 fue aproximadamente 8 veces mayor que la del platino de CDDP. Por lo tanto, la actividad de células cancerosas en MCF-7 (Tabla 5C.1) y la acumulación celular

de los metales de los complejos metálicos (Tabla 5C.2) se correlacionan significativamente. Además, los niveles de metal en el ADN nuclear y el ARN celular total se determinaron después de la exposición de las células MCF-7 a **2a**, **3a**, o CDDP a 0,5 μ M durante 24 h. Los datos de la Tabla 5C.2 muestran que la cantidad de iridio de **2a** y **3a** asociada con el ADN nuclear era considerablemente más baja (5-10 veces) que la del platino de CDDP. La cantidad de iridio de **2a** y **3a** y platino de CDDP asociada con el ARN celular total fue similar dentro del error. Por lo tanto, la toxicidad de **2a**, **3a** y CDDP en MCF-7 (Tabla 5C.1) no se correlaciona con la cantidad de metales asociados con ADN o ARN (Tabla 5C.2).

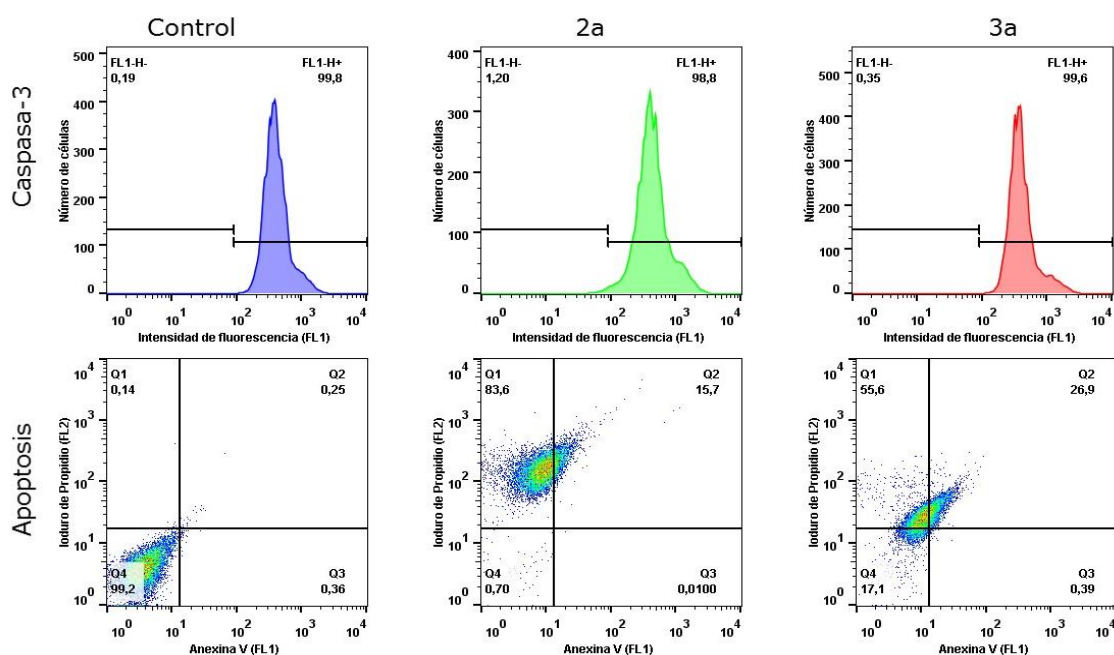


Figura 5C.4. Histogramas de caspasa-3 para los compuestos **2a** y **3a**, y control (fila superior). Diagrama de los ensayos de apoptosis para los compuestos **2a** y **3a**, y control (fila inferior)

Tabla 5C.2. Acumulación de **2a**, **3a** y CDDP en células tumorales MCF-7 durante 24 h.

Compuesto ^a	pmol/10 ⁶ células	pg/ μ g AND	pg/ μ g ARN
2a (0,5 μ M)	165 \pm 6	1,9 \pm 0,5	1,8 \pm 0,1
3a (0,5 μ M)	190 \pm 8	1,0 \pm 0,4	1,2 \pm 0,1
CDDP (0,5 μ M)	22 \pm 4	10 \pm 2	2,3 \pm 1,0

^a entre paréntesis la concentración de compuesto administrada a las células.

5C.3. Conclusiones

Se estudiaron las propiedades biológicas de una serie de agentes antitumorales bis-C^N-ciclometalados de iridio(III) y luminiscentes del tipo [Ir(C^N)₂(N^N)] [PF₆] que contienen un grupo de anclaje para la funcionalización en el benzimidazol N^N. Los compuestos muestran una citotoxicidad muy alta en células A2780 (**2a** y **3b** que son aproximadamente 7 veces más citotóxicas que CDDP) y, curiosamente, también son muy activas hacia las líneas celulares de tumor de mama MDA-MB-231 (aproximadamente 100 veces mayor que el CDDP en muchos casos) y MCF-7, mientras que la mayoría de ellos muestran baja toxicidad en las células no tumorigénicas BGM. De acuerdo con la luminiscencia emitida por **2a**, este compuesto se localizó predominantemente en la corteza de actina. La cuantificación por ICP-MS de los niveles de metal en el ADN nuclear y en el ARN celular total en células MCF-7 sugiere que **2a** y **3a** ejercen sus efectos tóxicos en líneas celulares tumorales mediante un mecanismo que no implica coordinación a ácidos nucleicos. Estos resultados preliminares tienen el potencial de abrir la puerta a una nueva gran familia de fármacos bioconjugados y agentes terapéuticos.

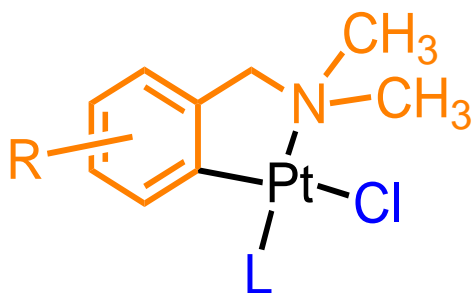
5C.4. Bibliografía

1. Kelland, L. "The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy", **2007**, Nat Rev Cancer, (7), 573-584.
2. Kelland, L. R. "Preclinical perspectives on platinum resistance", **2000**, Drugs, (59 Suppl 4), 1-8; discussion 37-38.
3. Dasari, S.; Tchounwou, P. B. "Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action", **2014**, Eur J Pharmacol, (0), 364-378.
4. Bergamo, A.; Sava, G. "Linking the future of anticancer metal-complexes to the therapy of tumour metastases", **2015**, Chem Soc Rev, (44), 8818-8835.
5. Cutillas, N.; Yellol, G. S.; de Haro, C.; Vicente, C.; Rodríguez, V.; Ruiz, J. "Anticancer cyclometalated complexes of platinum group metals and gold", **2013**, Coord Chem Rev, (257), 2784-2797.
6. Medici, S.; Peana, M.; Nurchi, V. M.; Lachowicz, J. I.; Crisponi, G.; Zoroddu, M. A. "Noble metals in medicine: Latest advances", **2015**, Coord Chem Rev, (284), 329-350.
7. Berndsen, R. H.; Weiss, A.; Abdul, U. K.; Wong, T. J.; Meraldi, P.; Griffioen, A. W.; Dyson, P. J.; Nowak-Sliwinska, P. "Combination of ruthenium(II)-arene complex [Ru(η⁶-p-cymene)Cl₂(pta)] (RAPTA-C) and the epidermal growth factor receptor inhibitor erlotinib results in efficient angiostatic and antitumor activity", **2017**, Sci Rep, (7), 43005.
8. Wachter, E.; Zamora, A.; Heidary, D. K.; Ruiz, J.; Glazer, E. C. "Geometry matters: inverse cytotoxic relationship for cis/trans-Ru(II) polypyridyl complexes from cis/trans-[PtCl₂(NH₃)₂]", **2016**, Chem Commun, (52), 10121-10124.
9. Yellol, G. S.; Donaire, A.; Yellol, J. G.; Vasylyeva, V.; Janiak, C.; Ruiz, J. "On the antitumor properties of novel cyclometalated benzimidazole Ru(II), Ir(III) and Rh(III) complexes", **2013**, Chem Commun, (49), 11533-11535.

10. Yellol, G. S.; Yellol, J. G.; Kenche, V. B.; Liu, X. M.; Barnham, K. J.; Donaire, A.; Janiak, C.; Ruiz, J. "Synthesis of 2-pyridyl-benzimidazole iridium(III), ruthenium(II), and platinum(II) complexes. study of the activity as inhibitors of amyloid-beta aggregation and neurotoxicity evaluation", **2015**, Inorg Chem, (54), 470-475.
11. Ruiz, J.; Vicente, C.; de Haro, C.; Bautista, D. "Novel bis-C,N-cyclometalated iridium(III) thiosemicarbazide antitumor complexes: interactions with human serum albumin and DNA, and inhibition of cathepsin B", **2013**, Inorg Chem, (52), 974-982.
12. Zhao, Q.; Huang, C.; Li, F. "Phosphorescent heavy-metal complexes for bioimaging", **2011**, Chem Soc Rev, (40), 2508-2524.
13. Lin, S.; He, B.; Yang, C.; Leung, C. H.; Mergny, J. L.; Ma, D. L. "Luminescence switch-on assay of interferon-gamma using a G-quadruplex-selective iridium(III) complex", **2015**, Chem Commun, (51), 16033-16036.
14. Mariana, B.; Mercedes, G. "Imidazole and Benzimidazole Derivatives as Chemotherapeutic Agents", **2005**, Mini-Rev Med Chem, (5), 409-424.
15. GM, C. "The Cell: A Molecular Approach. Structure and Organization of Actin Filaments.", **2000**, 2nd edition ed.
16. Salbreux, G.; Charras, G.; Paluch, E. "Actin cortex mechanics and cellular morphogenesis", **2012**, Trends Cell Biol, (22), 536-545.
17. Charras, G. T.; Yarrow, J. C.; Horton, M. A.; Mahadevan, L.; Mitchison, T. J. "Non-equilibration of hydrostatic pressure in blebbing cells", **2005**, Nature, (435), 365-369.

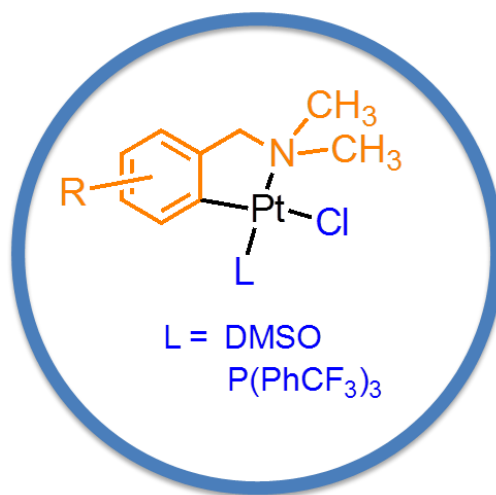
CAPÍTULO 6

Actividad biológica de organoderivados de platino(II)



Sección 6A

Actividad antiangiogénica y antitumoral de compuestos C^N cicloplatinados



Los resultados de esta Sección se han publicado en:

Zamora, A.; Perez, S. A.; Rodriguez, V.; Janiak, C.; Yellol, G. S.; Ruiz, J. "Dual antitumor and antiangiogenic activity of organoplatinum(II) complexes", **2015**, J Med Chem, (58), 1320-1336.

6A.1. Introducción

El carcinoma epitelial ovárico representa la quinta causa de muerte por cáncer en las mujeres, más que cualquier otro cáncer del sistema reproductivo femenino.¹ Los fármacos de platino (Figura 6A.1) han dominado la terapia contra las neoplasias ováricas y otras ginecológicas durante las últimas tres décadas y aún ahora el oxaliplatino y carboplatino se utilizan en los diferentes tratamientos adyuvantes.³ Sin embargo, más del 90% de las pacientes recaen con un problema de quimiorresistencia, la principal limitación del concepto terapéutico actual, lo que ha motivado un gran interés para mejorar los resultados de los pacientes. En 1970, Folkman⁹ propuso que el desarrollo del tumor y la metástasis son dependientes de angiogénesis y, por lo tanto, que el bloqueo de la angiogénesis podría impedir el crecimiento tumoral. Sin embargo, los limitados beneficios de supervivencia de los fármacos antiangiogénicos estimulaban el interés en la combinación de fármacos antiangiogénicos con las quimioterapias establecidas.¹¹

El cisplatino (CDDP) y sus análogos tienden a inducir efectos biológicos similares, mientras que los compuestos de platino estructuralmente diferentes pueden conducir a una actividad biológica diferente o complementaria al concepto de interacción clásico con el ADN.¹² De este modo, los compuestos de coordinación han dado paso a los compuestos organometálicos como líderes en el campo de la química médica inorgánica.^{10,13} La estabilidad de los complejos de metal de transición mejora frente a la reducción y reacciones de intercambio de ligandos en presencia de un fuerte enlace M-C. En la actualidad, se han diseñado específicamente complejos ciclometalados $C^{\wedge}N$ y $C^{\wedge}N^{\wedge}N$ de Pt(II) con la capacidad de unirse no covalentemente al ADN,¹⁴ dirigiéndose al G-cuadruplex del telómero¹⁴⁻¹⁶ o a proteínas clave.¹⁷

Por otra parte, dado que el compuesto de rutenio NAMI-A demostró actividad antimetastásica *in vivo*,¹⁸ se han publicado estudios de otros complejos no citotóxicos de Ru(II),^{19,20} Rh(III)² e Ir(III)^{21,22} como inhibidores de la angiogénesis (Figura 6A.1). Además, algunos compuestos metálicos bioactivos tienen una doble actividad como citotóxicos y antiangiogénicos.^{5,23,24} Sin embargo, ninguno de los compuestos de platino que se han publicado hasta el día de la fecha, poseen un efecto similar. En consecuencia, el desarrollo de nuevos compuestos de platino no convencionales con doble actividad podría contribuir a reducir la resistencia a los fármacos adquiridos y las toxicidades sistemáticas generadas como consecuencia del uso exclusivo de un agente citotóxico o de un agente antiangiogénico.

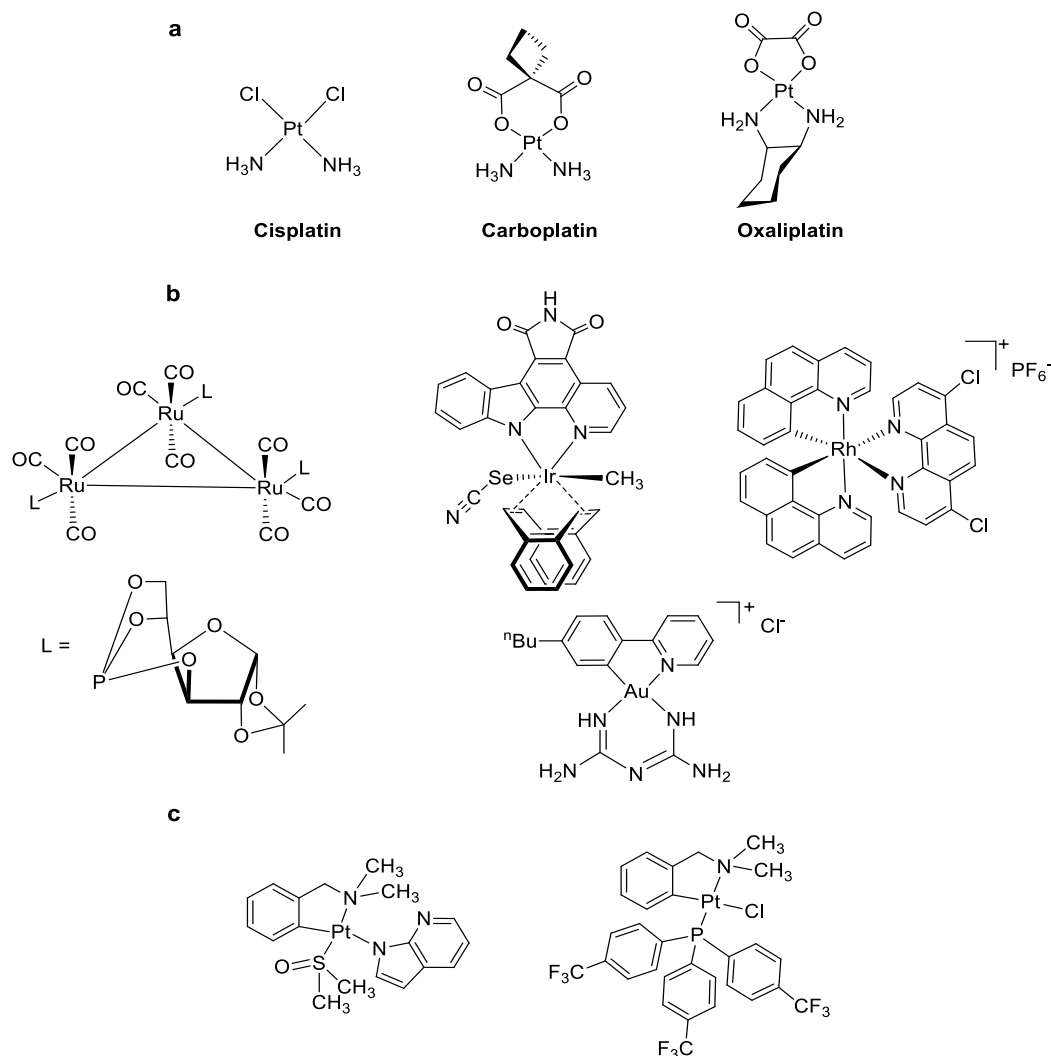


Figura 6A.1. (a) Medicamentos de platino aprobados en todo el mundo. (b) Algunos complejos metálicos antiangiogénicos recientes. (c) Algunos complejos de platino previamente preparados por nuestro grupo. El complejo de rodio es un inhibidor de la producción de óxido nítrico, NO, inducida por lipopolisacáridos (LPS) en macrófagos RAW264.7.² El complejo de iridio basado en estaurospina inhibe la proteína quinasa VEGFR3⁴. El grupo de rutenio y el complejo de oro tienen una doble actividad citotóxica y antiangiogénica.^{5,6} El complejo 7-azaindolatoplatino(II) mostró una potente actividad anticancerígena contra el cáncer de ovario.^{7,8} El complejo de fluorofosfinaplatino(II) resultó ser más activo que su análogo de trifenilfosfina y presentó valores de RF bajos.¹⁰

Sobre la base de resultados prometedores (Figura 6A.1C),^{7,8,10,25} se ha desarrollado un estudio sistemático de complejos antitumorales organometálicos de Pt(II) del tipo [Pt(R-dmba)LCI]. Se usaron como ligandos auxiliares dimetilsulfóxido (DMSO) y tris-(4-(trifluorometil)fenil)fosfina [P(C₆H₄CF₃-p)₃]. También se ha tratado de dilucidar cualquier diferencia en su modo de acción mediante el estudio de la detención del ciclo celular, la apoptosis y la acumulación en la línea tumoral de carcinoma ovárico A2780 y su variante

cisplatino-resistente A2780cis. Además, la localización intracelular y los cambios morfológicos inducidos por los nuevos compuestos seleccionados se han estudiado mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM). También se ha estudiado la actividad antiangiogénica de los complejos de DMSO y la migración de células EA.hy926 (mediante el ensayo de cierre de heridas). A lo largo del análisis hemos encontrado candidatos adecuados para una posterior biofuncionalización o encapsulación.

6A.2. Resultados y discusión

6A.2.1. Ensayos de citotoxicidad

Se evaluó la citotoxicidad de los complejos de Pt(II) **1a-13a** y **1b-13b** (Figura 6A.2 y Tabla 6A.1) respecto a células de cáncer de ovario A2780 humanas y A2780cis (resistencia adquirida a CDDP). Debido a su baja solubilidad acuosa, los compuestos ensayados se disolvieron primero en DMSO y después se diluyeron en serie en medio de cultivo completo de manera que el contenido de DMSO efectivo no excediera de 0,4%. Se usó CDDP, diluido en agua, como control positivo.

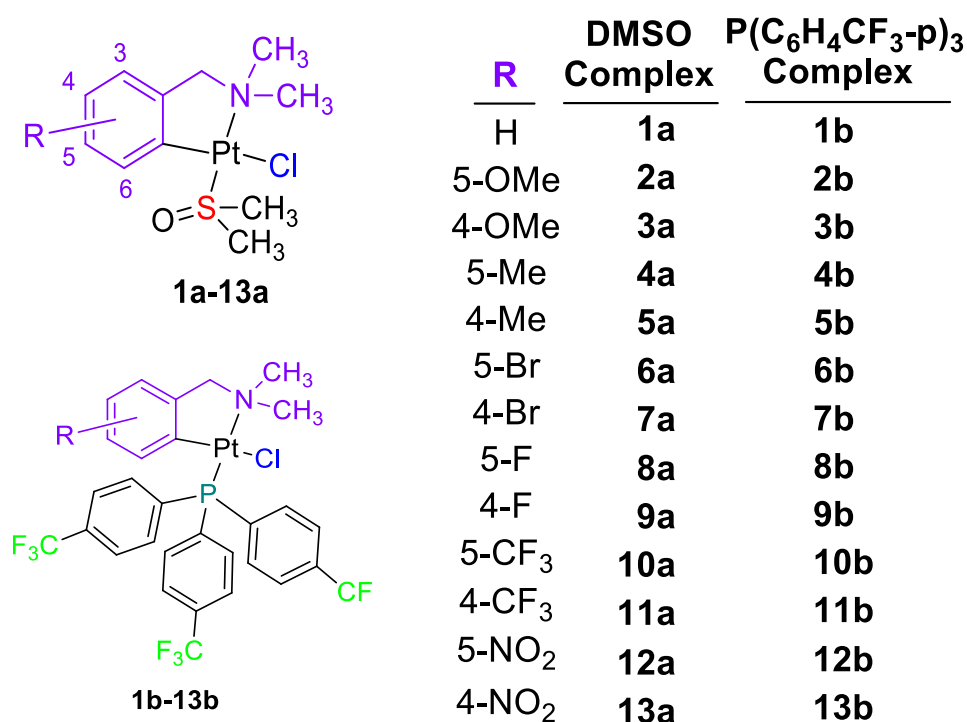


Figura 6A.2. Estructura de complejos de Pt(II) de nueva síntesis.

Tabla 6A.1. IC₅₀ (μM) para los compuestos **1a-13b** y CDDP a las 48 h de incubación.

Comp.	A2780	A2780cis	R	Comp.	A2780	A2780cis
1a	0,98 ± 0,07	2,12 ± 0,14	H	1b	3,36 ± 0,07	4,54 ± 0,86
2a	1,36 ± 0,05	2,22 ± 0,42	5-OCH ₃	2b	3,51 ± 0,08	4,44 ± 0,53
3a	1,08 ± 0,01	1,65 ± 0,20	4-OCH ₃	3b	4,01 ± 0,04	4,56 ± 0,22
4a	0,63 ± 0,18	1,97 ± 0,44	5-CH ₃	4b	4,67 ± 0,07	6,71 ± 0,61
5a	0,69 ± 0,01	1,54 ± 0,15	4-CH ₃	5b	4,89 ± 0,10	6,76 ± 0,13
6a	0,81 ± 0,08	1,48 ± 0,05	5-Br	6b	4,72 ± 0,06	7,40 ± 1,07
7a	0,96 ± 0,04	1,99 ± 0,45	4-Br	7b	5,99 ± 0,43	7,90 ± 0,32
8a	0,75 ± 0,19	2,24 ± 0,43	5-F	8b	4,52 ± 0,14	6,35 ± 0,57
9a	0,73 ± 0,10	1,49 ± 0,09	4-F	9b	4,17 ± 0,08	6,03 ± 0,87
10a	0,87 ± 0,14	1,13 ± 0,17	5-CF ₃	10b	4,06 ± 0,09	6,86 ± 0,08
11a	1,17 ± 0,20	2,40 ± 0,66	4-CF ₃	11b	9,96 ± 0,25	9,27 ± 2,19
12a	0,78 ± 0,05	2,29 ± 0,75	5-NO ₂	12b	6,16 ± 0,12	7,18 ± 0,62
13a	1,25 ± 0,34	3,65 ± 0,34	4-NO ₂	13b	5,58 ± 0,08	8,88 ± 0,57
CDDP	1,90 ± 0,20	19,57 ± 1,82				

Se investigó el efecto sobre la citotoxicidad de los sustituyentes MeO, Me, H, Br, F, CF₃ y NO₂ en la posición R₅ y R₄ del anillo fenilo del ligando quelante N, N-dimetilbencilamina de los complejos de platino (Figura 6A.1). Su potencia citotóxica varió entre 0,63 μM a 6,16 μM en la línea celular A2780, mientras que la actividad en A2780cis oscilaba entre 1,13 μM y 9,27 μM (Tabla 6A.1). Se observaron las siguientes tendencias:

- Los complejos de DMSO son más activos que sus equivalentes de fosfina y cisplatino. La relación entre el IC₅₀ es superior a 3 en todos los casos (Figura 6A.3a).
- No existe una relación estructura-actividad clara después de la introducción del sustituyente R en complejos de DMSO. Estos sustituyentes no modifican drásticamente la actividad anticancerígena del compuesto parental, **1a**, de modo que se puede aprovechar con el fin de una posterior biofuncionalización.
- La introducción del sustituyente R en los complejos P(C₆H₄CF₃-p)₃ provoca una reducción en la actividad de **1b**.
- Comparando las parejas isoméricas (R₅ frente a R₄) **2/3**, **4/5**, **6/7**, **8/9**, **10/11** y **12/13** hubo una ligera preferencia por análogos de R₅. Los sustituyentes en R₄ sólo se prefieren en los casos de **2/3** para el ligando DMSO, y **8/9**, **12/13** para el ligando P(C₆H₄CF₃-p)₃ (complejos **3a**, **9b** y **13b**, respectivamente, Figura 6A.3b).

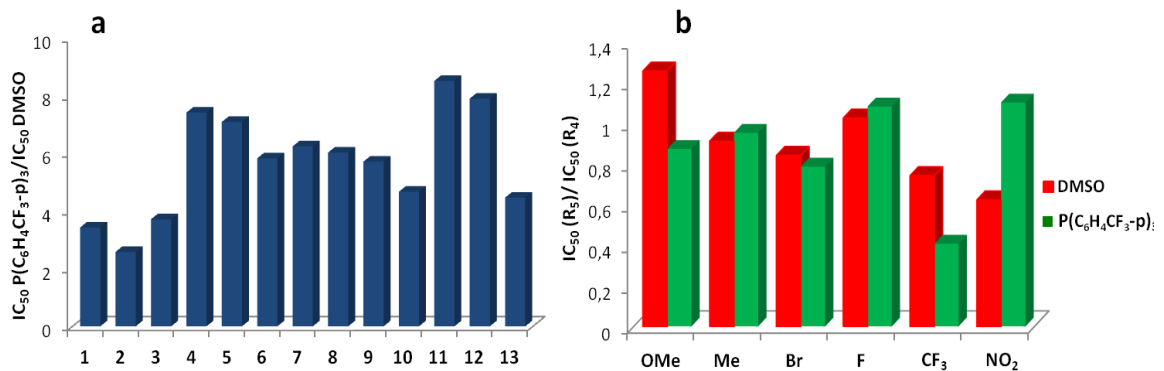


Figura 6A.3. (a) Comparación del efecto de ligando auxiliar. El gráfico muestra la relación entre el IC_{50} para los ligandos fosfina y DMSO. (b) Efecto de posición del sustituyente. El gráfico muestra la relación entre R_5/R_4 , rojo para complejos de DMSO y verde para análogos de $P(C_6H_4CF_3-p)_3$.

6A.2.2. Resistencia adquirida

A2780cis contiene todos los mecanismos principales conocidos de resistencia a cisplatino:²³ limitación en la entrada o bombeo hacia el exterior celular de los niveles de fármaco, mejor reparación al ADN dañado, menor daño celular y aumento de su tolerancia al fármaco, más concentración de tiol celular (GSH) y evasión de las vías de muerte celular. En general, todos los compuestos aquí estudiados son capaces de superar la resistencia al cisplatino, y aunque algunos complejos de DMSO muestran valores de RF superiores a 2, mucho más bajos en comparación con CDDP (Figura 6A.4).

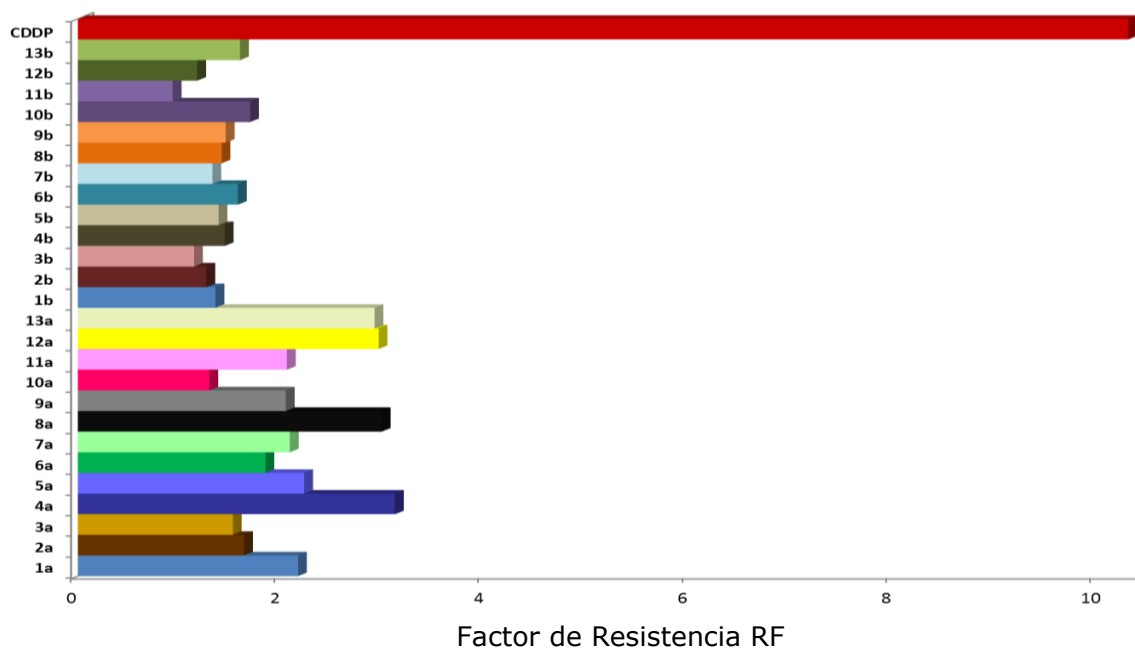


Figura 6A.4. Factores de resistencia, RF, para CDDP y todos los complejos estudiados hacia células A2780 humanas de cáncer de ovario resistentes a CDDP, A2780cis.

6A.2.3. Selectividad de los complejos con DMSO

La selectividad de un fármaco anticancerígeno hacia células cancerosas frente a células normales aumenta la probabilidad de la citotoxicidad específica hacia el tumor, reduciendo los efectos secundarios en pacientes. Por lo tanto, la actividad antiproliferativa *in vitro* de los compuestos de DMSO y CDDP también se evaluó en una línea de células sanas de riñón, BGM (riñón de mono verde africano, Tabla 6A.2). Se encontró que todos los complejos eran menos tóxicos que el cisplatino en la línea celular de riñón. Más importante aún, los valores del factor de selectividad (SF es el valor resultante de dividir IC_{50} del compuesto en células normales de riñón por el IC_{50} del mismo compuesto en las células malignas de ovario) indican una citotoxicidad preferencial de los complejos organometálicos de Pt(II) hacia células neoplásicas. Los factores de selectividad celular para **1a-13a** son mayores (hasta SF = 17,25 para **4a**) que los de CDDP (SF = 2,24, Figura 6A.5). Este hecho puede contribuir a superar la nefrotoxicidad, que es uno de los efectos secundarios más agresivos de la quimioterapia.

Por otro lado, también se calcularon los valores de IC_{50} para **1a-13a** en la línea celular EA.hy926 (Tabla 6A.2) con el objetivo de verificar que el efecto antiangiogénico no era debido a un efecto citotóxico a su potencial antiangiogénico.

Tabla 6A.2. IC_{50} (μ M) para CDDP y compuestos **1a-13a** a las 48 h.

Complejo	BGM	EA.hy926
1a	6,55 \pm 0,20	6,32 \pm 0,12
2a	11,27 \pm 0,32	9,67 \pm 0,13
3a	7,34 \pm 0,32	6,88 \pm 0,10
4a	10,87 \pm 0,65	6,20 \pm 0,11
5a	8,44 \pm 0,32	5,72 \pm 0,23
6a	7,44 \pm 0,36	5,24 \pm 0,09
7a	7,97 \pm 0,30	4,97 \pm 0,18
8a	6,46 \pm 0,41	6,09 \pm 0,11
9a	9,07 \pm 1,71	6,30 \pm 0,11
10a	6,31 \pm 0,11	4,50 \pm 0,08
11a	9,33 \pm 1,31	7,55 \pm 0,27
12a	9,61 \pm 0,78	6,90 \pm 0,14
13a	15,49 \pm 2,55	10,51 \pm 0,29
CDDP	4,25 \pm 0,37	9,86 \pm 0,64

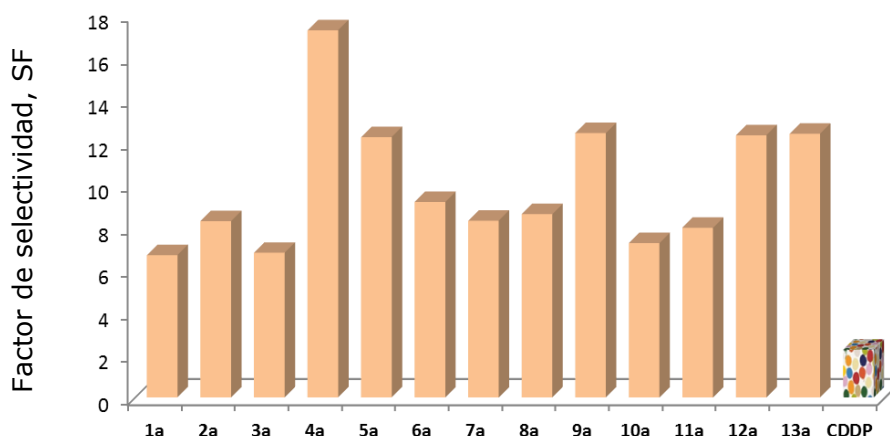


Figura 6A.5. Factor de selectividad, SF, para los complejos DMSO y CDDP.

6A.2.4. Distribución del platino intracelular

Mediante el uso de TEM, podemos observar los derivados de platino en el contraste de las secciones de las células cancerosas tratadas con los complejos de Pt(II) estudiados, si su deposición está suficientemente localizada en los organelos celulares. Las células A2780 se expusieron a 1 μM de **1a** (compuesto original), **8a** (un derivado de DMSO muy activo) y **2b** (un compuesto de fosfina muy activo) durante 24 h a 37 °C. Las células tratadas y de control se fijaron e incorporaron a una resina epóxica (ver apdo. 2.7.2). Secciones ultrafinas se observaron bajo el TEM (Figura 6A.6). En ningún caso se usó acetato de uranilo ni OsO_4 para contrastar tanto las células control como las células tratadas. Cualquier contraste adicional observado entre las células de control y las tratadas se debe a la captación celular de los complejos de platino. Las secciones de células tratadas con **1a**, **8a** y **2b** muestran más contraste en comparación con las de control, en particular en el nucleolo y la membrana nuclear interna (Figuras 6A.6b, 6A.6c y 6A.6d). Los resultados sugieren que estos compuestos interactúan con los ácidos nucleicos del núcleo. Varias células mostraron los cambios morfológicos asociados con la apoptosis,²³ como la membrana celular intacta, incluso en la fase de desintegración celular, la fragmentación nuclear (Figura 6A.6d), organelos citoplásmicos desorganizados (flecha blanca) y grandes vacuolas claras (flechas verdes).

Durante la condensación de la cromatina en la fase de apoptosis temprana el material nuclear denso de electrones se agrega de forma característica periféricamente bajo la membrana nuclear interna (Figura 6A.6c), mientras que las células se fragmentan en cuerpos apoptóticos con membranas celulares intactas en la fase tardía de apoptosis (Figura 6A.6d).

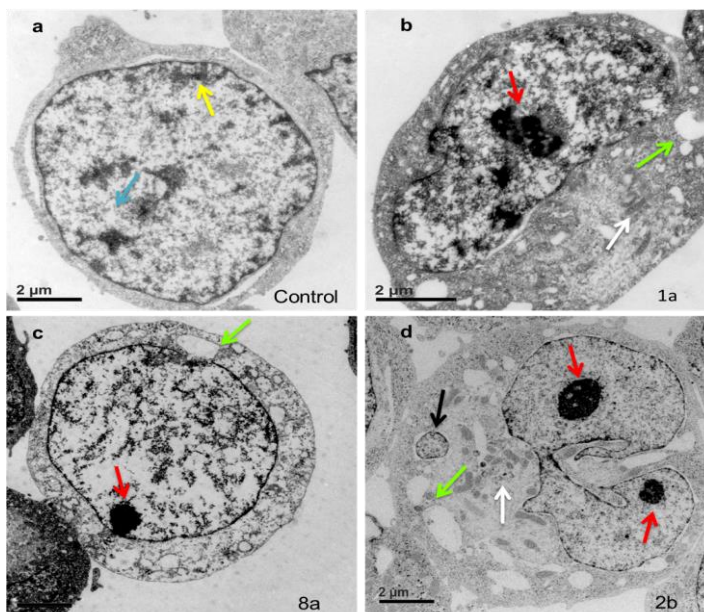


Figura 6A.6. Microscopía electrónica de transmisión de: células A2780 no tratadas (a) y células A2780 después 24 h de exposición a **1a** (b) y **8a** (c) 1 μ M y **2b** 4 μ M (d). Las flechas amarillas y azules indican la heterocromatina y la eucromatina en el control, respectivamente. Las flechas rojas, verdes y blancas señalan, respectivamente, los nucléolos, las vacuolas y las mitocondrias en las células tratadas con los compuestos. La flecha negra en (d) muestra parte del núcleo incrustado en una vacuola.

6A.2.5. Estudios de acumulación

La resistencia adquirida se conoce como la principal desventaja del tratamiento con CDDP. Entre los factores que pueden explicar la resistencia del CDDP, la disminución de la acumulación celular del fármaco parece ser un mecanismo importante. Se estudió la acumulación celular de los complejos Pt(II) en las líneas celulares de cáncer de ovario A2780 y A2780cis para investigar la posible relación entre la captación celular, la citotoxicidad y la resistencia. Las concentraciones celulares se determinaron mediante ICP-MS después de 24 h de exposición al compuesto **4a**, el más activo, su análogo de fosfina **4b** y CDDP a concentraciones 1 μ M, 4 μ M y 2 μ M, respectivamente. Los resultados se resumen en la Figura 6A.7.

Como resultado general, la acumulación celular de los complejos aumenta en las células A2780 respecto a A2780cis. De hecho, el complejo **4a** se acumula más eficazmente que **4b** y CDDP, lo que se correlaciona con sus valores de IC_{50} . También es interesante observar que la relación de los niveles de Pt de A2780cis/A2780 aumenta siguiendo la tendencia **4b** > **4a** > CDDP, dando como resultado los mayores valores de RF para CDDP > **4a** > **4b**.

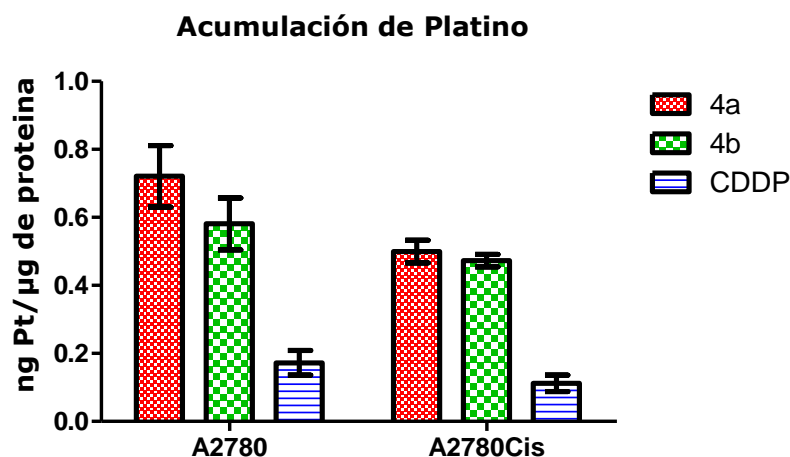


Figura 6A.7. Acumulación intracelular de platino en células A2780 y A2780cis a las 24 h de incubación con los complejos **4a**, **4b** y CDDP.

6A.2.6. Detención del ciclo celular

Para comprender el efecto de los derivados de Pt(II) en el crecimiento celular se examinó el efecto de algunos complejos DMSO y dos derivados de fosfina sobre el ciclo celular mediante el análisis de citometría de flujo (FACS, Fluorescence Activated Cell Sorter). Después del tratamiento de las líneas celulares A2780 con 1 μM de **1a**, **2a**, **4a**, **8a** y CDDP o 4 μM de **1b** y **2b** (aproximadamente el valor de IC_{50} para los derivados de platino con respecto a las células A2780) durante 24 h (Figura 6A.8), encontramos dos comportamientos diferentes. Mientras que los compuestos **2a**, **4a**, **1b** y **2b** detienen el ciclo en fase G_0/G_1 , **1a** y **8a** conducen a la aparición de una población tetraploide y detienen el ciclo en fase S/G_2 . Ambos casos difieren de la acción causada por el CDDP, que detiene el ciclo en la fase S, según muestra el incremento de población respecto al control.

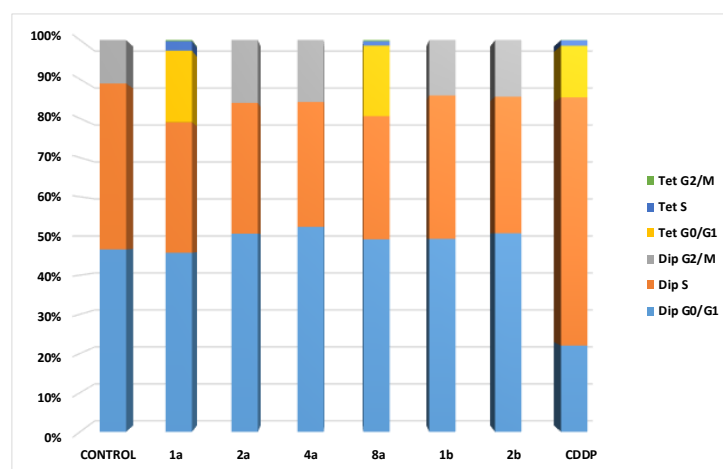


Figura 6A.8. Análisis del ciclo celular de células de cáncer de ovario humano A2780 después de 24 h de tratamiento a una concentración de IC_{50} para los derivados de platino.

La detención del ciclo celular para los mismos compuestos en A2780cis se muestra en la Figura 6A.9. Los nuevos complejos organometálicos causan un ligero incremento en la población de las fases G₀/G₁ (derivados de fosfina) y S/G₂ (DMSO), de nuevo, en contraste con la generada por CDDP, detenidos fundamentalmente en fase S.

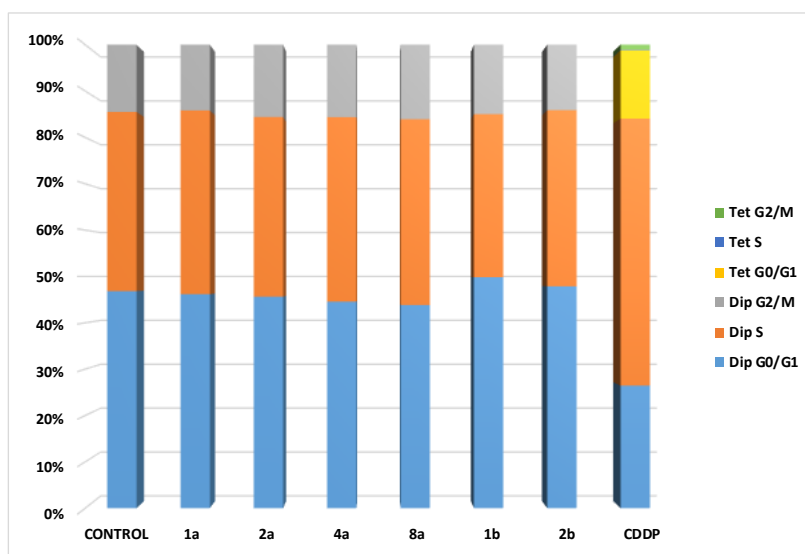


Figura 6A.9. Análisis del ciclo celular de células de cáncer de ovario humano A2780cis después de 24 h de tratamiento a una concentración de IC₅₀ para los derivados de platino.

6A.2.7. Estudios de apoptosis

También se llevaron a cabo estudios apoptóticos con la línea celular A2780. Los resultados se muestran en la Figura 6A.10. Como se puede ver claramente **4a**, **8a** y **1b** inducen una alta incidencia de apoptosis (35%, 31% y 48%, respectivamente) en células A2780 a las 24 h, sin aumentar la población necrótica. El mismo estudio para **4a** a las 48 h mostró un aumento de las células apoptóticas (86%), demostrando que la inducción de apoptosis del complejo **4a** es dependiente del tiempo.

Parece que el daño del ADN, causado antes de la fase S (punto de control G₁, Figura 1.4) y después (punto de control G₂), no pudo ser reparado impidiendo que la célula llegara a la fase siguiente, de modo que la célula moriría por apoptosis. Se ha confirmado que el daño del ADN es compatible con la muerte celular, que se produce a través del proceso de apoptosis. El encogimiento celular y la morfología mostrada en la Figura 6A.7 también fueron consistentes con este tipo de muerte celular.

Los experimentos de apoptosis en A2780cis (Figura 6A.11) después de 24 h de incubación con derivados de DMSO indican una disminución del porcentaje de células apoptóticas, en contraste con el incremento causado por los derivados de fosfina. De nuevo, este es otro signo de cómo los derivados de la fosfina superan la resistencia al cisplatino.

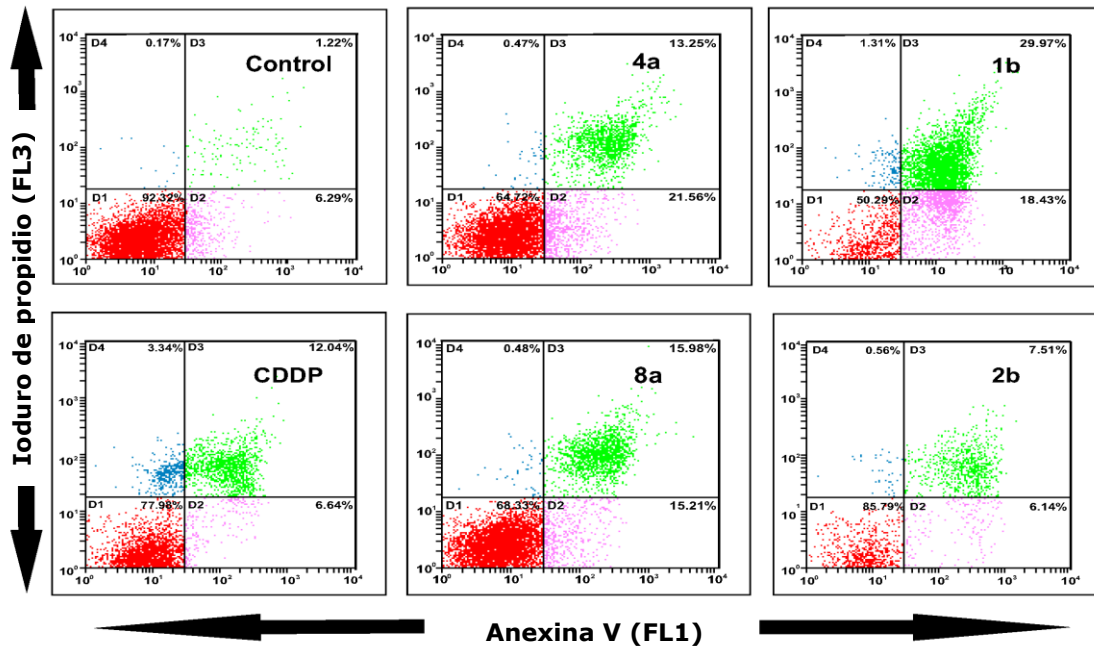


Figura 6A.10. Análisis de citometría de flujo de células de cáncer de ovario humano A2780 después del tratamiento con **4a**, **8a**, **1b** y **2b** detectadas por anexina V y PI. Los gráficos de densidad para células no tratadas (control) y para células tratadas con 2 μ M (24 h) de **4a**, **8a** y CDDP y células tratadas con 8 μ M (24 h) de **1b** y **2b**. Los experimentos se realizaron por triplicado.

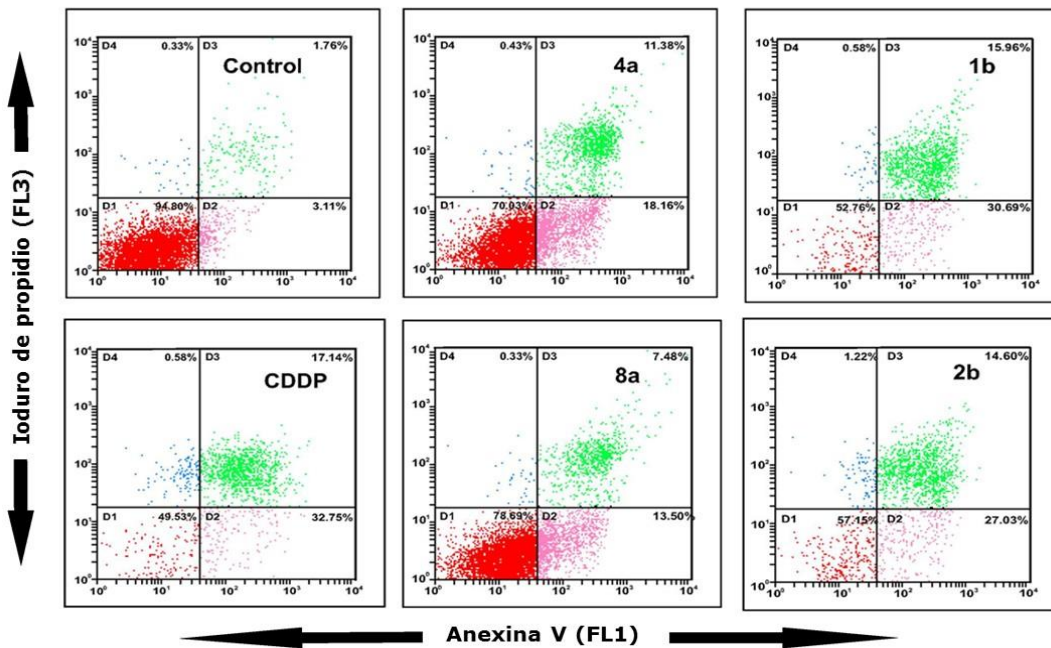


Figura 6A.11. Análisis de citometría de flujo de células de cáncer de ovario humano A2780cis después del tratamiento con **4a**, **8a**, **1b** y **2b** detectadas por anexina V y PI. Los gráficos de densidad para células no tratadas (control) y para células tratadas con 2 μ M (24 h) de **4a**, **8a** y CDDP y células tratadas con 8 μ M (24 h) de **1b** y **2b**. Los experimentos se realizaron por triplicado.

6A.2.8. Inhibición de angiogénesis

La angiogénesis *in vitro* se midió 12 h después de incubar células EA.hy926 con compuestos **1-13a** de DMSO a concentraciones de 5 μM , 3 μM y 1 μM (Figura 6A.12 y Figura 6A.13b). La reducción de la concentración se llevó a cabo con el fin de trabajar a su concentración subcitotóxica (Tabla 6A.2). La formación o inhibición resultante de estructuras de tipo capilar se cuantificó sólo para 1 μM (Figura 6A.13a) utilizando una combinación de los tres parámetros más representativos: longitud total (μm), número de redes (red o estructuras poligonales) y área total de redes (área ocupada por las redes, μm^2).

Sólo aquellos compuestos que presentaron diferencias significativas en todos los parámetros estudiados se consideraron antiangiogénicos. Por lo tanto, además del CDDP, sólo hay cuatro compuestos (**3a**, **5a**, **10a** y **12a**) que no muestran actividad antiangiogénica a 1 μM . El resto de ellos inhiben la formación de tubos vasculares no sólo a concentraciones subtotóxicas (3 μM) sino también a una muy cercana a su IC_{50} en células A2780. Este hecho los convierte en compuestos con una doble acción citotóxica y antiangiogénica.

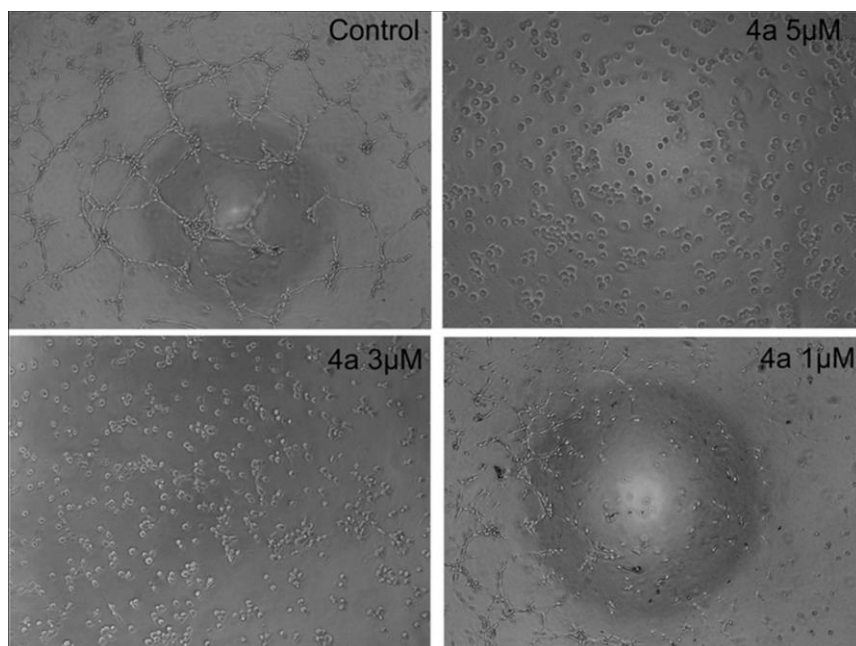


Figura 6A.12. Inhibición de la angiogénesis por el complejo **4a** al cabo de 12 h a 5 μM , 3 μM y 1 μM .

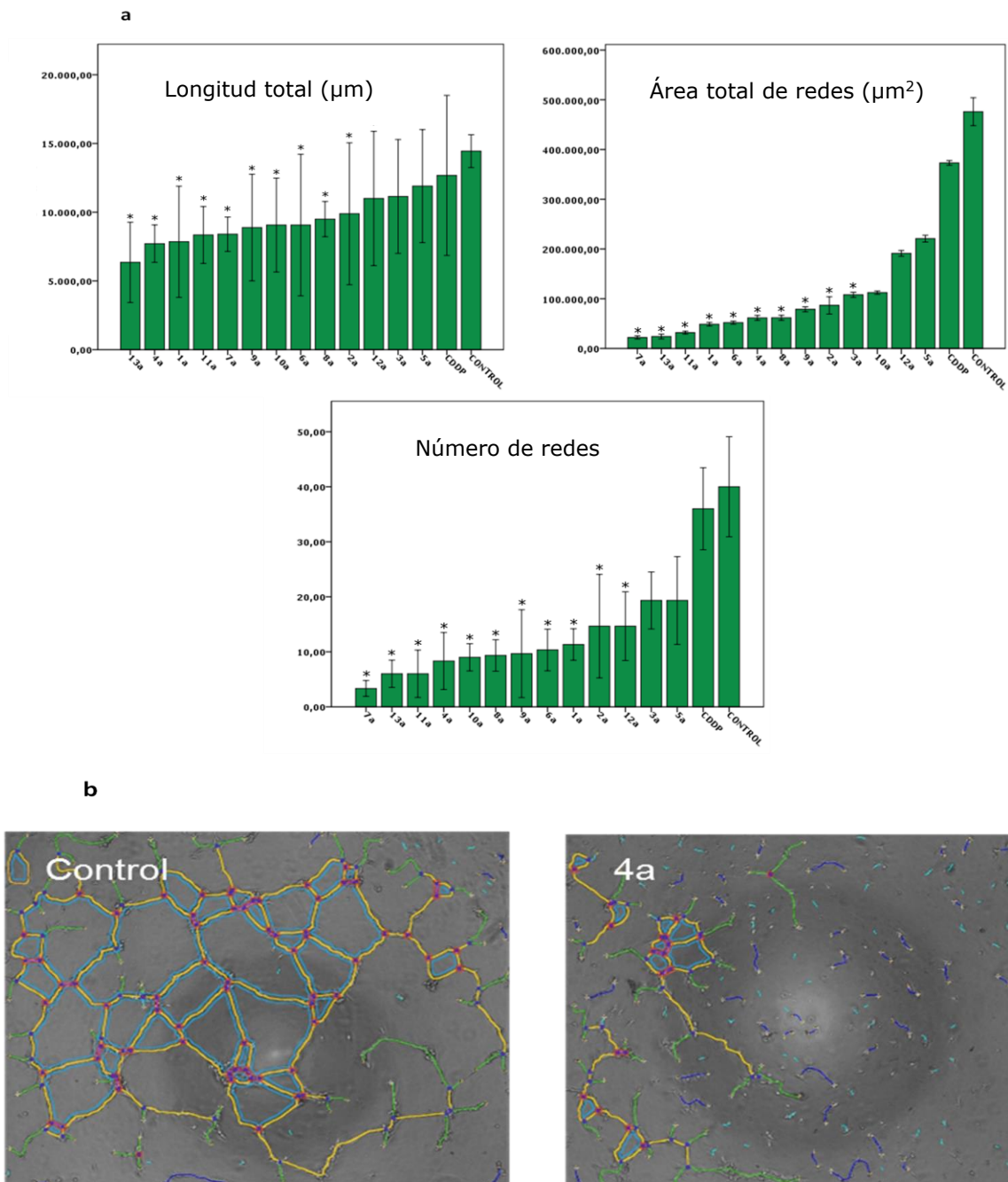


Figura 6A.13. Efecto de los complejos de DMSO en el ensayo de formación de tubos en células endoteliales. (a) Cuantificación con ImageJ después del proceso del número de mallas, el área de mallas totales y la longitud total de estructura tubular de células EA.hy926 en 1 µM de compuestos **1a-13a** y CDDP durante 12 h. Las barras de error representan la desviación estándar de tres experimentos independientes. * $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo. (b) Imágenes analizadas con ImageJ después de la exposición de células EA.hy926 en placas de 96 pocillos previamente recubiertas con Matrigel durante 12 h: medio de cultivo como un control y con **4a**, 1 µM. La formación de tubos de células EA.hy926 se fotografió bajo un microscopio de contraste de fase invertido.

6A.2.9 Migración de células EA.hy926

Como segunda prueba de la actividad de los compuestos **1a-13a** sobre la función de las células endoteliales, se realizó un estudio de migración. Se basa en el separar las células confluentes mediante el rascado con una punta de pipeta o "herida" y medir su capacidad para cerrarlo después de 8 h con o sin la adición de los compuestos (apdo. 2.8.2). La Figura 6A.14 muestra claramente cómo el compuesto **4a** disminuyó la movilidad de las células EA.hy926 respecto al control, que estaba casi completamente repoblado.

Dado que las células EA.hy926 no se vieron afectadas por la exposición a los compuestos a 1 μM en ese corto período de tiempo, es probable que la inhibición de la migración sea resultado de la actividad antiangiogénica.

La Figura 6A.15 resume los resultados para los complejos de DMSO **1a-13a** y CDDP como el porcentaje de área libre de células después de 8 h. El tratamiento de estos datos está indicado en el apdo. 8.2 de Materiales y Métodos.

Los compuestos **2a**, **3a**, **8a** y **9a** no inhibieron la migración a la concentración ensayada. De este modo y teniendo en cuenta tanto el experimento en células endoteliales, los compuestos **1a**, **4a**, **6a**, **7a**, **11a** y **13a** muestran una propiedad antiangiogénica prominente a una concentración subcitotóxica en células A2780.

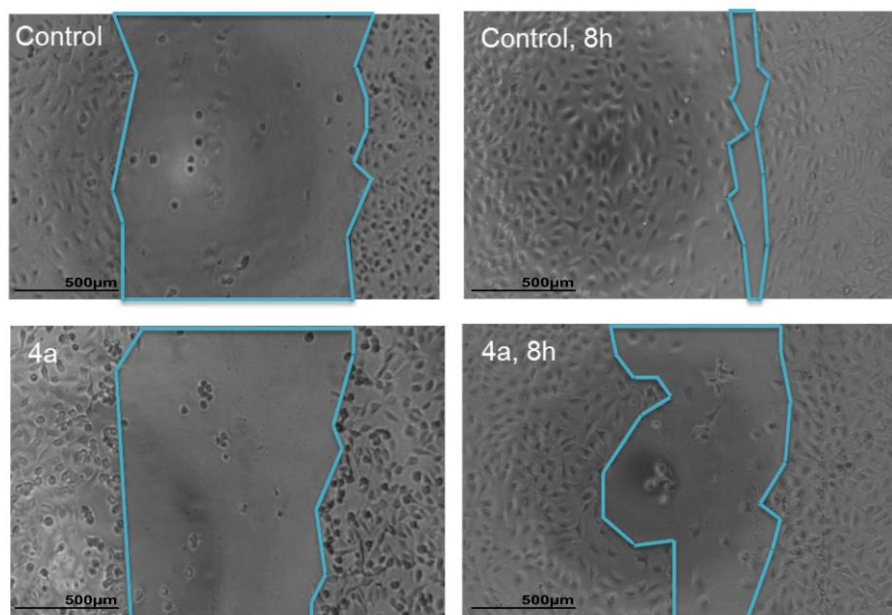


Figura 6A.14. Efecto del compuesto **4a** sobre la migración de las células EA.hy926 por ensayo de cicatrización de heridas. Imágenes típicas de la herida al comienzo del experimento y después de 8 h para medio de cultivo como control y con **4a**, 1 μM . La migración de células EA.hy926 se fotografió bajo un microscopio de luz (barra de escala, 500 μm).

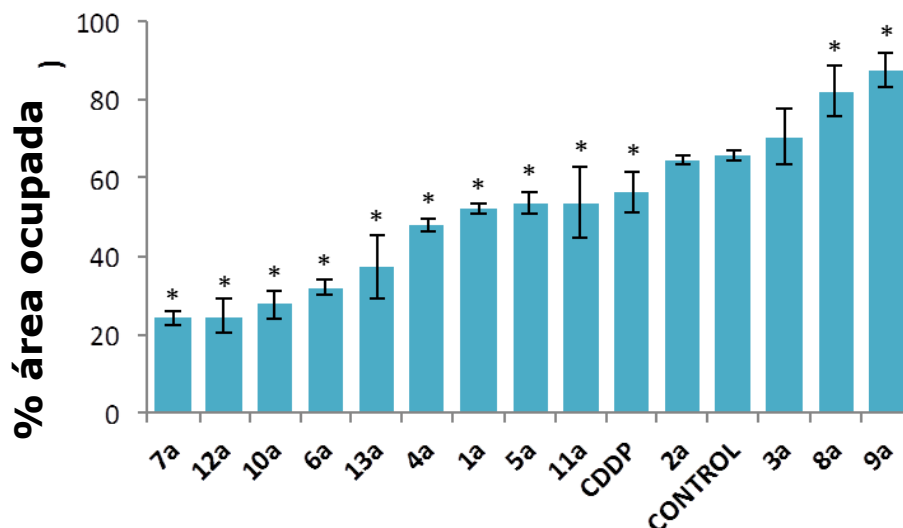


Figura 6A.15. Efecto de los compuestos **1a-13a** y CDDP sobre la migración de células EA.hy926 por ensayo de cicatrización de heridas. Las células EA.hy926 se trataron con 1 μ M de compuestos 1a-13a y CDDP durante 8 h. * $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo.

6A.3. Conclusiones

Se ha estudiado la actividad biológica de una biblioteca de más de 20 compuestos del tipo $[[Pt(N^C)LCI]$ ($N^C = C,N$ -dimetilbenzilamina como ligando; $L = DMSO$ y $P(C_6H_4CF_3-p)_3$). Todos ellos son activos en las células resistentes a cisplatino A2780cis y han mostrado fuerte carácter inductor de apoptosis *in vitro*. Los complejos de platino DMSO desencadenan fuertes efectos citotóxicos (en valores de IC_{50} submicromolares en A2780), siendo más activos que sus homólogos de fosfina y CDDP. La toxicidad hacia las células no tumorigénicas BGM de los nuevos compuestos es inferior que la mostrada por CDDP. Los factores de selectividad celular, SF, para **1a-13a** son mayores (hasta SF de 17,25 para **4a**) que la de CDDP (SF de 2,24). Comparando las parejas isoméricas (R_5 frente a R_4) **2/3**, **4/5**, **6/7**, **8/9**, **10/11** y **12/13** hubo sólo en el caso de **2/3** una clara preferencia por el análogo R_4 **3a**.

Las imágenes TEM mostraron una alta densidad de electrones tanto en la heterocromatina como en el nucléolo de células A2780 incubadas con compuestos seleccionados. Además, algunos de los complejos de platino DMSO inhibieron eficazmente la angiogénesis en la línea de células endoteliales de la vena umbilical humana EA.hy926 a 1 μ M. La formación de tubos de EA.hy926 se ha cuantificado con el software ImageJ y también se ha llevado a cabo el estudio del efecto de los complejos de DMSO sobre la migración de células EA.hy926 mediante el ensayo de cicatrización de heridas. Los complejos **1a**, **4a**, **6a**, **7a**, **11a** y **13a** son los primeros complejos de platino(II) descritos capaces de inhibir la angiogénesis a una concentración cercana a IC_{50} en la línea celular A2780. Por lo tanto, estos son agentes potentes con una doble actividad antiangiogénica y citotóxicas.

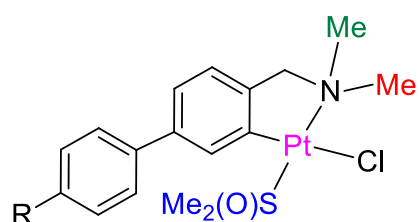
6A.4. Bibliografía

1. Society, A. C.; Atlanta: Amer Canc Soc **2013**, Ed. 2013, p 1-60.
2. Liu, L.-J.; Lin, S.; Chan, D. S.-H.; Vong, C. T.; Hoi, P. M.; Wong, C.-Y.; Ma, D.-L.; Leung, C.-H. "A rhodium(III) complex inhibits LPS-induced nitric oxide production and angiogenic activity in cellulo", **2014**, J Inorg Biochem, (140), 23-28.
3. Muggia, F. "Platinum compounds 30 years after the introduction of cisplatin: implications for the treatment of ovarian cancer", **2009**, Gynecol Oncol, (112), 275-281.
4. Kastl, A.; Wilbuer, A.; Merkel, A. L.; Feng, L.; Di Fazio, P.; Ocker, M.; Meggers, E. "Dual anticancer activity in a single compound: visible-light-induced apoptosis by an antiangiogenic iridium complex", **2012**, Chem Comm, (48), 1863-1865.
5. Nazarov, A. A. et al. "Synthesis and characterization of a new class of anti-angiogenic agents based on ruthenium clusters", **2013**, Sci Rep, (3), 1485,1-7.
6. Zhang, J.-J.; Sun, R. W.-Y.; Che, C.-M. "A dual cytotoxic and anti-angiogenic water-soluble gold(III) complex induces endoplasmic reticulum damage in HeLa cells", **2012**, Chem Comm, (48), 3388-3390.
7. Samper, K. et al. "Understanding the interaction of an antitumoral platinum(II) 7-azaindolate complex with proteins and DNA", **2014**, BioMetals, 1-19.
8. Ruiz, J.; Rodriguez, V.; de Haro, C.; Espinosa, A.; Perez, J.; Janiak, C. "New 7-azaindole palladium and platinum complexes: crystal structures and theoretical calculations. In vitro anticancer activity of the platinum compounds", **2010**, Dalton Trans, (39), 3290-3301.
9. Folkman, J. "Tumor angiogenesis: therapeutic implications", **1971**, N Engl J Med, (285), 1182-1186.
10. Cutillas, N.; Martínez, A.; Yellol, G. S.; Rodríguez, V.; Zamora, A.; Pedreño, M.; Donaire, A.; Janiak, C.; Ruiz, J. "Anticancer C,N-Cycloplatinated(II) Complexes Containing Fluorinated Phosphine Ligands: Synthesis, Structural Characterization, and Biological Activity", **2013**, Inorg Chem, (52), 13529-13535.
11. Ma, J.; Waxman, D. J. "Combination of antiangiogenesis with chemotherapy for more effective cancer treatment", **2008**, Mol Cancer Ther, (7), 3670-3684.
12. Barry, N. P.; Sadler, P. J. "Exploration of the medical periodic table: towards new targets", **2013**, Chem Commun, (49), 5106-5131.
13. Liu, W.; Gust, R. "Metal N-heterocyclic carbene complexes as potential antitumor metallodrugs", **2013**, Chem Soc Rev, (42), 755-773.
14. Ma, D. L.; He, H. Z.; Leung, K. H.; Chan, D. S.; Leung, C. H. "Bioactive luminescent transition-metal complexes for biomedical applications", **2013**, Angew Chem Int Ed Engl, (52), 7666-7682.
15. Suntharalingam, K.; Łęczkowska, A.; Furrer, M. A.; Wu, Y.; Kuimova, M. K.; Therrien, B.; White, A. J. P.; Vilar, R. "A Cyclometallated Platinum Complex as a Selective Optical Switch for Quadruplex DNA", **2012**, Chem Eur J, (18), 16277-16282.
16. Ma, D.-L.; Che, C.-M.; Yan, S.-C. "Platinum(II) Complexes with Dipyridophenazine Ligands as Human Telomerase Inhibitors and Luminescent Probes for G-Quadruplex DNA", **2009**, J Amer Chem Soc, (131), 1835-1846.
17. Wai-Yin Sun, R.; Lok-Fung Chow, A.; Li, X.-H.; Yan, J. J.; Sin-Yin Chui, S.; Che, C.-M. "Luminescent cyclometalated platinum(II) complexes containing N-heterocyclic carbene ligands with potent in vitro and in vivo anti-cancer properties accumulate in cytoplasmic structures of cancer cells", **2011**, Chem Sci, (2), 728-736.

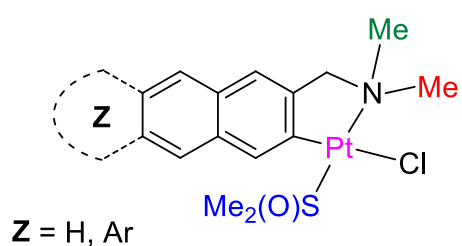
18. Rademaker-Lakhai, J. M.; van den Bongard, D.; Pluim, D.; Beijnen, J. H.; Schellens, J. H. "A Phase I and pharmacological study with imidazolium-trans-DMSO-imidazole-tetrachlororuthenate, a novel ruthenium anticancer agent", **2004**, Clin Cancer Res, (10), 3717-3727.
19. Yang, L.; Zhang, J.; Wang, C.; Qin, X.; Yu, Q.; Zhou, Y.; Liu, J. "Interaction between 8-hydroxyquinoline ruthenium(II) complexes and basic fibroblast growth factors (bFGF): inhibiting angiogenesis and tumor growth through ERK and AKT signaling pathways", **2014**, Metallomics, (6), 518-531.
20. Nowak-Sliwinska, P.; van Beijnum, J. R.; Casini, A.; Nazarov, A. A.; Wagnieres, G.; van den Bergh, H.; Dyson, P. J.; Griffioen, A. W. "Organometallic ruthenium(II) arene compounds with antiangiogenic activity", **2011**, J Med Chem, (54), 3895-3902.
21. Wilbuer, A.; Vlecken, D. H.; Schmitz, D. J.; Kraling, K.; Harms, K.; Bagowski, C. P.; Meggers, E. "Iridium complex with antiangiogenic properties", **2010**, Angew Chem Int Ed Engl, (49), 3839-3842.
22. Feng, L. et al. "Structurally Sophisticated Octahedral Metal Complexes as Highly Selective Protein Kinase Inhibitors", **2011**, J Amer Chem Soc, (133), 5976-5986.
23. Clavel, C. M.; Paunescu, E.; Nowak-Sliwinska, P.; Griffioen, A. W.; Scopelliti, R.; Dyson, P. J. "Discovery of a highly tumor-selective organometallic ruthenium(II)-arene complex", **2014**, J Med Chem, (57), 3546-3558.
24. Sun, R. W.; Ng, M. F.; Wong, E. L.; Zhang, J.; Chui, S. S.; Shek, L.; Lau, T. C.; Che, C. M. "Dual anti-angiogenic and cytotoxic properties of ruthenium(III) complexes containing pyrazolato and/or pyrazole ligands", **2009**, Dalton Trans, 10712-10716.
25. Ruiz, J.; Rodriguez, V.; Cutillas, N.; Espinosa, A.; Hannon, M. J. "Novel C,N-chelate platinum(II) antitumor complexes bearing a lipophilic ethisterone pendant", **2011**, J Inorg Biochem, (105), 525-531.

Sección 6B

Influencia de la aromaticidad en el efecto anticancerígeno y antiangiogénico de compuestos de organoplatino(II)



R = H, Ph



Z = H, Ar

Los resultados de esta Sección se han publicado en:

Zamora, A.; Perez, S. A.; Rothmund, M.; Rodriguez, V.; Schobert, R.; Janiak, C. "Exploring the Influence of the Aromaticity on the Anticancer and Antivascular Activities of Organoplatinum(II) Complexes", **2017**, *Chem. Eur. J.* 23, 5614-5625.

6B.1. Introducción

El cisplatino (CDDP) y las siguientes generaciones de fármacos basados en este metal se han convertido en agentes quimioterápicos bien establecidos con la finalidad de tratar diversos tipos de cáncer en los últimos 40 años.¹ Sin embargo, su eficacia sigue estando discutida por los problemas clínicos que generan. Entre estos destacan un limitado espectro de actividad y su alta toxicidad, que conduce a efectos secundarios tales como nefrotoxicidad, ototoxicidad y neurotoxicidad.² De hecho, su falta de actividad suele estar relacionada con el desarrollo de resistencia adquirida o intrínseca,³ cuyos mecanismos están relacionados con sus propiedades de absorción, distribución, metabolismo, excreción y toxicidad.^{4,5}

La quimioterapia de platino se emplea principalmente en el tratamiento de tumores avanzados. Sin embargo, rara vez son activos frente a las metástasis tumorales, por lo que los protocolos clínicos se basan generalmente en una combinación de compuestos de platino con fármacos antiangiogénicos, como los taxanos.⁶ Cabe destacar cómo la reducción de las vías de metástasis fortalece la actividad de carboplatino contra el cáncer de ovario.^{7,8}

De esta manera, los nuevos enfoques se basan en el desarrollo de compuestos organometálicos que implican propiedades anticancerosas y antiangiogénicas.⁹ La ventaja de estas múltiples actividades anticancerosas es que los riesgos de toxicidad sistémica causados por la administración de más de un fármaco anticancerígeno serían fuertemente disminuidos.¹⁰ Aunque para la mayoría de los ejemplos citados el mecanismo por el cual estos fármacos inhiben la angiogénesis sigue estando sin clarificar, las proteínas tales como los factores de crecimiento,^{11,12} la tubulina^{13,14} o la enzima cathepsina B,¹⁵ parecen estar implicados en todos los casos. Aunque las proteínas se consideran como dianas no tradicionales para los complejos metálicos, algunas reseñas destacan la importancia de la interacción metalodroga-proteína.¹⁶ Estas interacciones comienzan considerarse de tal manera que incluso el enfoque de la proteómica química se ha desarrollado para identificar blancos potenciales de la proteína para los quimioterápicos tipo RAPTA (Figura 1.12 de Introducción). Las interacciones hidrofóbicas con la proteína se pueden promover aumentando la hidrofobicidad de las metalodrogas, cuya consecuencia probable es un aumento en la acumulación de la droga en las células.¹⁷ Por lo tanto, las propiedades fisicoquímicas tales como la lipofilidad deben ser optimizadas a través de modificaciones estructurales con el fin de mejorar la acción de la droga.¹⁸ El ajuste de este parámetro farmacológico es un asunto de gran interés y se ha estudiado su correlación con la actividad antiproliferativa de metalodrogas de Pt(IV), Ru(II), Ir(III) y Os(II). Algunas de las estrategias más utilizadas incluyen la variación de la aromaticidad del ligando areno en los complejos "taburete de piano",¹⁹ controlando la naturaleza de los ligandos axiales en los

complejos octaédricos de Pt(IV)²⁰ o la longitud espaciadora en los complejos dinucleares de Ru(II).²¹ De hecho, el ligando C^N, cinéticamente inerte, también ofrece una mayor estabilidad que la mayoría de los otros ligandos bidentados, con lo que se han modificado para este propósito introduciendo diversos grupos funcionales²² o colgantes lipofílicos, tales como los estrógenos.

En la Sección 6A se ha estudiado una serie de compuestos del tipo [Pt (C^N)Cl(DMSO)] (C^N = C, N-ligando tipo N,N-dimetilbencilamina) con actividades *in vitro* antiangiogénicas y citotóxicas (Figura 6A.1). Dado que la doble actividad no se ve fuertemente afectada por la introducción de sustituyentes R en el ligando C^N, esta nueva estructura ofrece el potencial de afinar la lipofilicidad de la metalodroga. Por lo tanto, hemos estudiado una nueva serie de complejos del tipo N,N-dimetil-1-(2-aryl)metanamina de Pt(II) (Figura 6B.1) para explorar el impacto de la aromaticidad en su actividad anticancerígena frente a una serie de líneas celulares de cáncer de ovario y de cáncer de mama. Su actividad se ha relacionado con la acumulación intracelular y con la unión del Pt al ADN nuclear, así como a una disfunción mitocondrial adicional. Además, hemos estudiado su eficacia para inhibir la angiogénesis *in vitro*, que también se verificó posteriormente *in vivo* con el ensayo de membrana corioalantoidea (CAM).

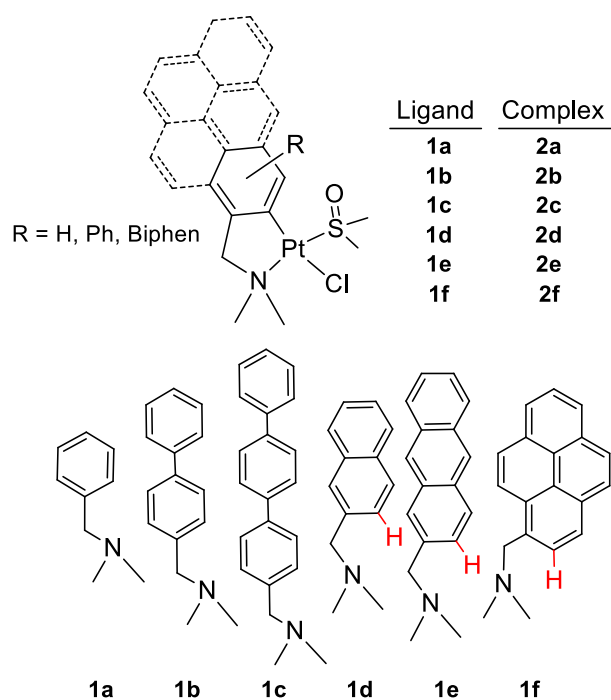


Figura 6B.1. Estructura de los complejos estudiados en la presente Sección.

6B.2. Resultados y discusión

6B.2.1. Actividad citotóxica

Los complejos **2a-2f** se evaluaron *in vitro* para su actividad antiproliferativa usando el ensayo MTT en un panel de líneas celulares de cáncer humano así como no tumorigénico (Tabla 6B.1). Los compuestos se disolvieron en DMSO como se indicó en las secciones anteriores; se utilizó CDDP, disuelto en agua, como control positivo.

Los complejos de platino dimetil-1-(2-aril)metanamina **2a-2f** mostraron una actividad antiproliferativa distinta frente a las líneas celulares de cáncer estudiadas, con valores de IC₅₀ en un entorno de micromolar. Todos ellos mostraron la mayor actividad en la línea celular de ovario epitelial A2780, siendo los que contienen dos anillos aromáticos, bifenilo (**2b**) y naftilo (**2d**), los que mejor se comportan. Además de ser más activos que el CDDP en las células de cáncer ovárico A2780 y A2780cis, todos ellos también son capaces de superar la resistencia adquirida que A2780cis desarrolla frente a CDDP, con un factor de resistencia, RF, por debajo de 2.²³

Por otra parte, se observó una reducción de la actividad anticancerígena hacia las células MCF-7 resistentes a múltiples fármacos y las células de carcinoma de mama triple negativa MDA-MB-231 respecto a las células de cáncer de ovario. Curiosamente, vale la pena señalar que **2a-2f** resultaron marcadamente más citotóxicos que CDDP (> 20 μM) en la línea metastásica MDA-MB-231. Además, esta reducción en la actividad se observó también en células de melanoma 518A2 altamente metastásicas. En particular, **2b** y **2d** son más activos que el resto de la serie, con valores de IC₅₀ del mismo orden de magnitud que el de CDDP.

Asimismo, y con el fin de determinar su selectividad diferencial respecto de células cancerígenas frente a las células normales, también se evaluó la actividad antiproliferativa de los compuestos *in vitro* frente a células BGM renales no tumorigénicas. Todos los complejos resultaron ser menos tóxicos que CDDP y, lo que es más relevante, los valores de factor de selectividad, SF, refrendan una citotoxicidad preferencial de los complejos organometálicos de Pt(II) hacia células neoplásicas, con valores SF encontrados en el intervalo de 1,06-10 veces superiores a los de CDDP (Figura 6B.2). El complejo **2d** es de los más potentes y, a su vez, con los mayores valores de SF en todas las líneas celulares de cáncer probadas. Este resultado podría contribuir a encontrar un conjunto de fármacos que aumenten su especificidad tumoral. Este experimento nos da información sobre la nefrotoxicidad causada por la quimioterapia basada en metales.

Por otra parte, también se calcularon los valores de IC₅₀ para **2a-2f** en la línea celular endotelial inmortalizada EA.hy926 con el objetivo de verificar que el efecto antiangiogénico no se debía a un efecto citotóxico sino a su potencial antiangiogénico.

Tabla 6B.1. Valores de IC₅₀ (μM) para **2a–2f** y CDDP a 48 h.

Comp	A2780	A2780cis	RF	MCF-7	MDAMB231	518A2	BGM	EA.hy926
2a	1,38±0,37	2,05±0,24	1,49	> 20	7,33±2,34	8,30±0,36	7,87±2,22	14,09±4,91
2b	1,18±0,10	1,51±0,34	1,29	10,67±0,06	4,36±0,67	3,73±0,69	3,56±0,54	3,70±0,98
2c	2,08±0,16	2,61±0,39	1,25	10,30±1,04	5,14±1,22	7,07±0,33	5,58±1,20	5,23±0,16
2d	1,29±0,09	1,97±0,24	1,53	13,79±2,38	6,00±1,56	5,41±0,20	7,33±2,64	5,92±1,17
2e	2,10±0,08	2,34±0,39	1,12	16,07±1,68	5,41±0,49	7,06±0,06	6,56±1,91	5,95±0,15
2f	2,04±0,25	2,38±0,18	1,16	9,46±0,55	5,13±2,13	9,21±0,29	4,84±1,99	4,51±1,42
CDDP	1,63±0,35	24,13±2,88	14,80	> 20	> 20	2,72±0,23	3,47±0,65	11,08±2,71

^a Los factores de resistencia se muestran entre paréntesis.

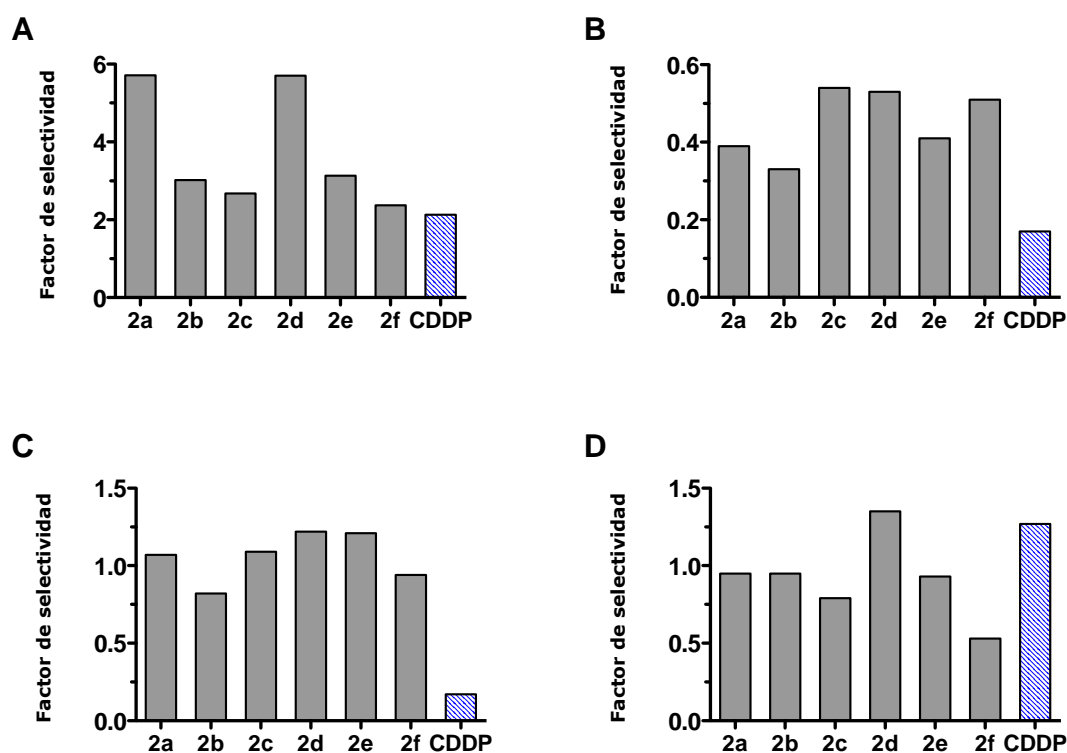


Figura 6B.2. Factores de selectividad de los compuestos **2a–2f** en comparación con CDDP para las líneas celulares A2780 (A), MCF-7 (B), MDA-MB-231 (C) and 518A2 (D).

6B.2.2. Estudios de apoptosis

Para evaluar si los complejos causan muerte celular por apoptosis o necrosis, se realizó el ensayo de tinción dual de anexina V (AV)/yoduro de propidio (PI) en células A2780 después de 48 h de incubación de **2b** y **2d** a 1 μ M.

Los resultados se muestran en la Figura 6B.3. Como se observa, los compuestos **2b** y **2d** inducen una alta incidencia de apoptosis (58,9 % y 76,6 %, respectivamente) en las células A2780 a las 48 h sin aumentar la población necrótica (<1 %). Este resultado es consistente con estudios previos de la Sección anterior, que mostraron un aumento en las células apoptóticas con el tiempo de exposición a los compuestos.

Para aclarar el mecanismo por el cual los complejos inducen la apoptosis, se examinó la actividad de la caspasa-3 usando el kit de detección de caspasa-3 (FITC-DEVD-FMK) en células A2780 después de 24 h de exposición a 1 μ M de **2b** y **2d**. Esta caspasa es uno de las principales ejecutoras de la apoptosis, responsable de la escisión proteolítica de la proteína clave polimerasa poli(ADP-ribosa) (PARP).²⁴ Como se muestra en la Figura 6B.3, no se incrementa la actividad de caspasa-3 después de su exposición a **2b** o **2d** con respecto al control positivo. Por lo tanto, estos complejos pueden promover una muerte celular independiente de caspasa, con las mitocondrias desempeñando un papel primordial (ver más adelante).

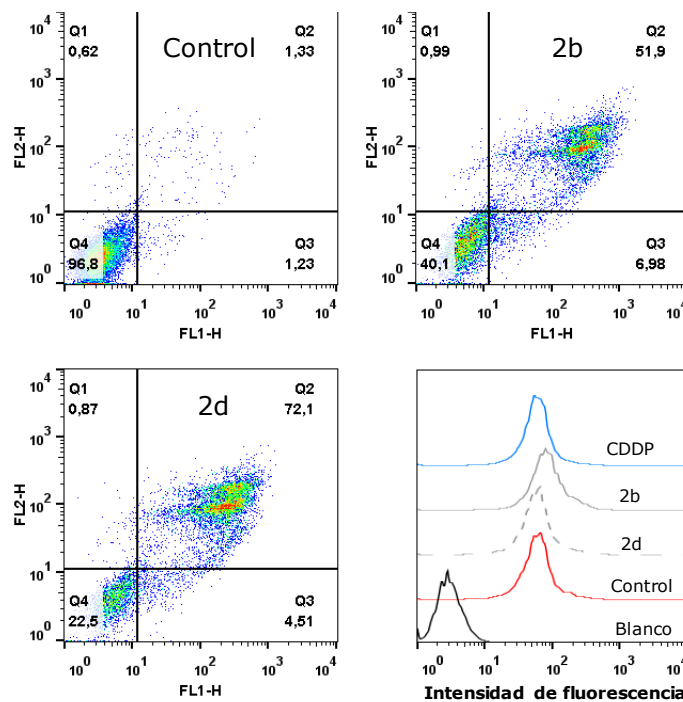


Figura 6B.3. Análisis de citometría de flujo de células A2780 después de 48 h de tratamiento con 1 μ M de **2b** y **2d** detectado por anexina V/PI. Activación de caspasa-3 (inferior derecha) en células A2780 a las 24 h de exposición a 1 μ M de **2b** y **2d**. El blanco son células sin marcador y el control positivo son células tratadas con el marcador de caspasa-3.

6B.2.3. Hidrofobicidad y acumulación celular

El efecto del quelato C^N sobre la lipofilicidad del fármaco se estudió comparando sus tiempos de retención (t_R) en cromatografía RP-HPLC sobre una columna C18. Se trata de un método fiable para estimar las hidrofobicidades relativas, ya que el comportamiento de un compuesto en este tipo de cromatografía depende de sus interacciones hidrófobas con la fase estacionaria no polar: cuanto más hidrofóbico es un compuesto, mayor es su t_R .^{25,26} Como se esperaba, todos los análogos sintetizados de **2a** se encontraron más lipófilos (Tabla 6B.2). En general, la hidrofobicidad desempeña un papel importante en la capacidad de los complejos organometálicos de acumularse en las células y, como resultado, una mayor hidrofobicidad incrementa su actividad antitumoral.^{20,21,27,28} En consecuencia, pasamos a determinar la acumulación de platino celular en células A2780; concretamente, realizamos la determinación de este metal después de 3 horas de exposición de los compuestos **2a-2f** (10 μ M) mediante ICP-MS (Tabla 6B.2).

Tabla 6B.2. Tiempos de retención (t_R) para RP-HPLC, acumulación de platino celular y niveles de este metal en el ADN nuclear en células A2780 tratadas durante 3 h para **2a-2f** (10 μ M) y CDDP.

Complejo	t_R (min)	Acumulación (ng Pt/10 ⁶ cells)	ng Pt/ μ g ADN
2a	7,44 \pm 0,04	7,72 \pm 0,33	10,15 \pm 0,31
2b	9,12 \pm 0,18	12,10 \pm 1,03	16,00 \pm 0,22
2c	10,78 \pm 0,50	1,26 \pm 0,10	3,41 \pm 0,07
2d	8,54 \pm 0,10	10,81 \pm 0,54	14,04 \pm 0,65
2e	10,04 \pm 0,13	2,47 \pm 0,18	4,38 \pm 0,04
2f	9,97 \pm 0,42	2,18 \pm 0,11	0,022 \pm 0,001
CDDP	-	0,49 \pm 0,06	0,107 \pm 0,002

Los resultados muestran una correlación entre la hidrofobicidad y la acumulación de los compuestos más activos **2b** y **2d** con respecto a los **2a** parentales, así como entre su acumulación y actividad anticancerígena. Sin embargo, debe observarse que esta tendencia no es tan precisa cuando la hidrofobicidad es mayor que la del derivado **2b**. Se encontró que el nivel de acumulación de platino para los derivados más lipófilos **2c**, **2e** y **2f** era drásticamente menor que el de **2a**, que se correlaciona con la reducción en la actividad anticancerígena encontrada. Esta reducción tanto de la acumulación como de la

potencia para **2c**, **2e** y **2f** respecto a **2a** puede atribuirse a su alta hidrofobicidad, que parece estar fuera del rango óptimo. De hecho, los altos valores de hidrofobicidad están a menudo relacionados con la falta de perfiles farmacocinéticos adecuados, comprometiendo finalmente su potencia *in vitro*.²⁹⁻³¹

6B.2.4. Localización y distribución celular

Aprovechando la fluorescencia intrínseca del anillo **2f** pirenilo, se investigó su distribución intracelular en células MCF-7 mediante microscopía confocal (Figura 6B.4). Las células se incubaron durante 1 h con **2f** a concentración 1 μM y tanto los núcleos y las mitocondrias se marcaron con Syto (500 nM) y Mitotracker (200 nM) durante 30 min, respectivamente. Se utilizó la microscopía de fluorescencia de imagen multiespectral con el fin de adquirir simultáneamente imágenes de alta resolución.³²

Las imágenes de **2f** no difieren significativamente de las mitocondrias marcadas. A la vez, no se observó acumulación nuclear después de 1 h de incubación. Aunque el resultado era inesperado, **2f** parecía estar localizado principalmente en el citoplasma. Dado que los compuestos se diseñaron para actuar como agentes anticancerígenos monofuncionales³³ y que en la bibliografía existen varios ejemplos de metalodrogas para los que la microscopía ha sugerido una acumulación perinuclear y citosólica mientras que, por el contrario, la cuantificación por ICP-MS claramente evidenciaba mayor captación en el núcleo,³⁴ se determinaron los niveles de metal en el ADN nuclear en células A2780 después de 3 h de exposición a 10 μM de los compuestos. Los datos de la Tabla 6B.2 muestran que la cantidad de platino asociada al ADN nuclear fue mayor para los derivados más activos. De forma similar a los resultados de la acumulación de platino, se observa una reducción para **2c** y **2e**, llegando a ser casi insignificante para **2f**, de acuerdo con el estudio de microscopía confocal en células MCF-7. Por lo tanto, la reducción de la actividad de **2c**, **2e** y **2f** puede explicarse como resultado de su falta de interacción del ADN. De manera similar, la débil señal de fluorescencia en el núcleo puede explicarse asumiendo que un corto período de tiempo, 1-3 h, no era suficiente para que el derivado hidrofóbico **2f** se acumulará en el núcleo.

Para obtener más información sobre una posible actividad desestabilizadora de las mitocondrias de los compuestos, el potencial de membrana mitocondrial y la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) intracelular se estudió mediante citometría de flujo (Figura 6B.5). Para medir el efecto en células A2780 después del tratamiento con **2b** y **2d** (1 μM) durante 24 h, se utilizó rodamina 123 (Rho-123) y diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (DCFH-DA). Como se muestra en la Figura 6B.5, la adición de los compuestos no produce una variación distinguible en la fluorescencia de Rho-123, indicando que no hay cambios en el potencial de la membrana mitocondrial. Por otra parte,

se observó una reducción de fluorescencia del 26,2 % para **2b** y del 41,9 % para **2d** del producto de oxidación DCF, lo que indica una capacidad de ambos complejos para suprimir la generación de ROS mitocondrial. Aunque la mayoría de las metalodrogas que interrumpen la función mitocondrial implican estrés oxidativo,^{28,35,36} se han descrito algunos ejemplos de inhibición de ROS.³⁷ De hecho, un enfoque para mejorar la citotoxicidad celular se basa en la combinación de generadores de ROS con inhibidores de ROS.^{38,39} Esta actividad mitocondrial de los compuestos puede estar relacionada con la muerte de células cancerosas independientemente de la cascada clásica de caspasa. De hecho, la eliminación de la generación de ROS mitocondrial podría estar también vinculada a la inhibición de la angiogénesis.⁴⁰

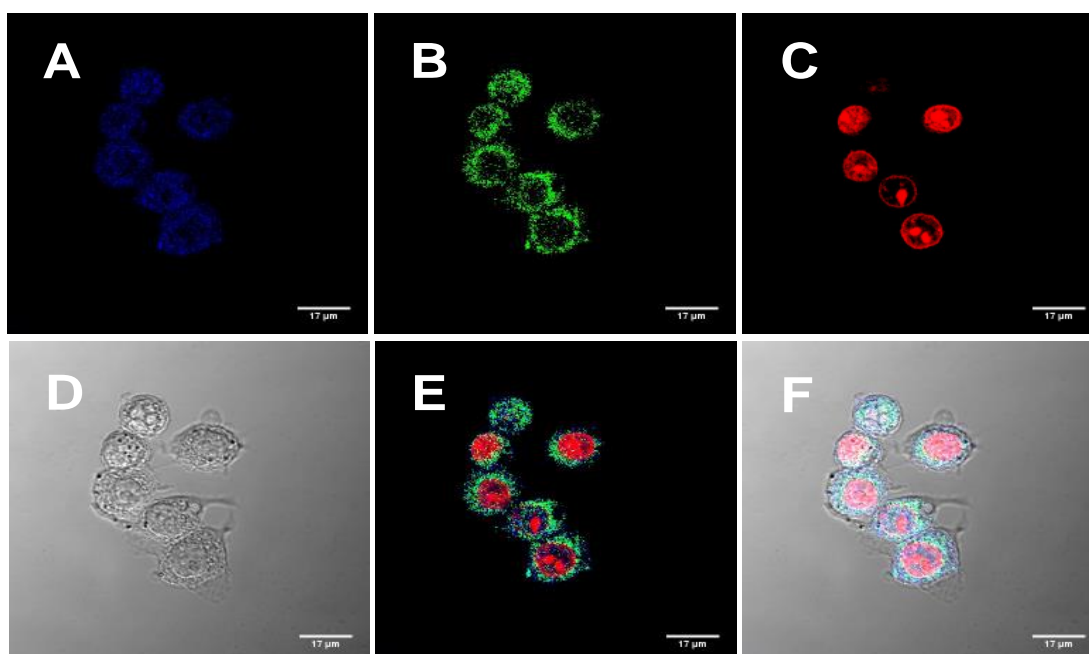


Figura 6B.4. Imágenes confocales de células MCF-7 tratadas con **2f** durante 1 h (A), Mitotracker FM verde (B) y SYTO 59 Rojo (C) durante 30 min. Contraste de fase (D), imagen fusionada A-C (E) e imagen fusionada A-D (F). La fluorescencia azul ($\lambda_{exc} = 458 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 458\text{-}472 \text{ nm}$) representa el compuesto **2f**, la fluorescencia verde ($\lambda_{exc} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 516\text{-}538 \text{ nm}$) representa mitocondrias de células MCF-7 y la fluorescencia roja ($\lambda_{exc} = 633 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 636\text{-}675 \text{ nm}$) representa núcleos de células MCF-7. Barras de escala = 17 μm .

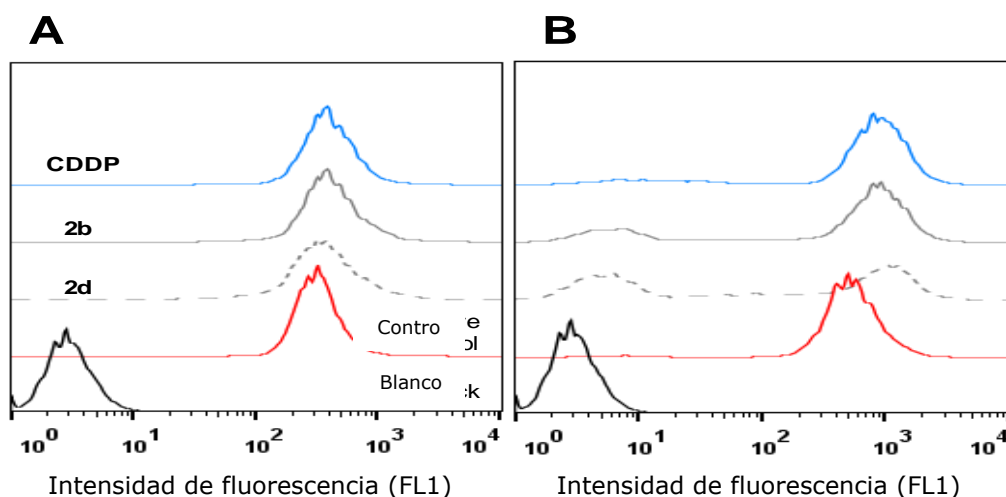


Figura 6B.5. Análisis de citometría de flujo de: (A) potencial de membrana mitocondrial; y (B) generación de ROS en células A2780 después de 24 h de tratamiento con 1 μM de **2b**, **2d** y CDDP. En blanco, células sin tratamiento. Control positivo, células tratadas con el marcador correspondiente.

6B.2.5. Actividad antivascolar *in vitro* e *in vivo*

En el apartado anterior hemos mostrado que la introducción de sustituyentes a los ligandos dimetilbencilamina C,N-quelados con carga negativa afectan ligeramente la actividad doble antitumoral y antiangiogénica de los correspondientes complejos de organoplatino. Ahora estudiamos si la lipofilia de estos complejos podría estar también relacionada con su potencial antiangiogénico.

Dado que la proliferación de células endoteliales es esencial en el proceso de la angiogénesis, el ensayo de formación de tubo vascular *in vitro* se midió 12 h después de incubar células EA.hy926 con **2a-2f** a 1 μM , es decir, a concentraciones subcitotóxicas. Se usó CDDP a concentraciones equimolares para propósitos comparativos. Los resultados del ensayo bidimensional de Matrigel se cuantificó (Figura 6B.6A) calculando la longitud total (μm), el número de redes (red o estructuras poligonales) y el área total de redes (área ocupada por las redes, μm^2). Los complejos **2a-2f** inhiben eficazmente la formación de estructuras de tipo capilar a concentraciones subcitotóxicas, ya que sólo se pueden distinguir túbulos fragmentados y algunos puntos de brotación (Figura 6B.6B). Curiosamente, una mejora de la lipofilidad dio lugar a un mayor efecto inhibitor con respecto a **2a**. Además, **2b** y **2d** destacan por sus actividades antiangiogénicas así como antitumorales.

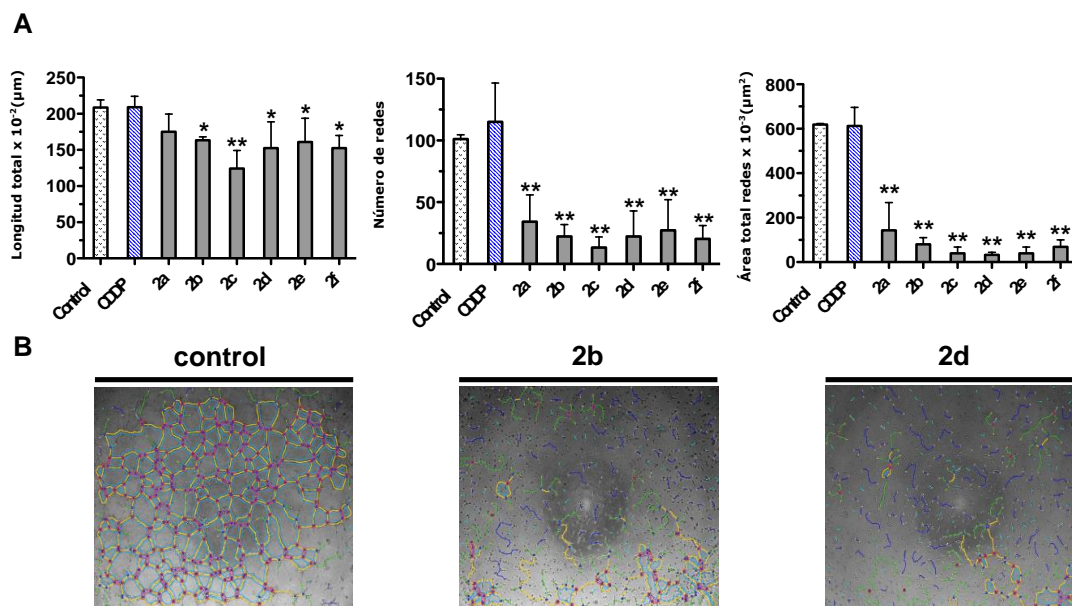


Figura 6B.6. Efecto de los complejos **2a-2f** en el ensayo de formación de tubos de células endoteliales. (A) Cuantificación después del proceso ImageJ de número de mallas, área de mallas totales y longitud total de estructura tubular de células EA.hy926 en 1 μM de los compuestos y CDDP durante 12 h. Las barras de error indican ± desviaciones estándar para dos conjuntos de tres puntos de datos para cada compuesto. * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$ se consideraron estadísticamente significativos. (B) Imágenes típicas después de un proceso ImageJ de células EA.hy926 añadidas a placas de 96 pocillos previamente recubiertas con Matrigel durante 12 h: para medio de cultivo como control y para **2b** y **2d**. La formación de tubos de células EA.hy926 se fotografió bajo un microscopio invertido de contraste de fases.

Por todo lo anterior, se realizaron más estudios para examinar los efectos antivascuales *in vivo* de **2b** y **2d** utilizando el ensayo de membrana corioalantoidea del embrión de pollo (CAM) como sistema modelo.⁴¹ La Figura 6B.7 muestra el efecto de tratamiento durante 6 horas con **2b** y **2d** a concentraciones 5 y 10 nmol comparado con el control (CAM tratado con cantidades equivalentes de DMSO). No se observaron cambios durante la incubación con DMSO; por el contrario, ambos complejos mostraron efectos antivascuales en los vasos sanguíneos en la CAM de huevos de pollo fertilizados. El compuesto **2b** mostró efectos disruptivos vasculares significativos, incluso degradando vasos sanguíneos grandes a 10 nmol, mientras que **2d** mostró un efecto mucho más intenso a 5 nmol que 10 nmol, concentración a la cual casi todos los capilares pequeños desaparecieron y los vasos más grandes empezaron a degradarse.

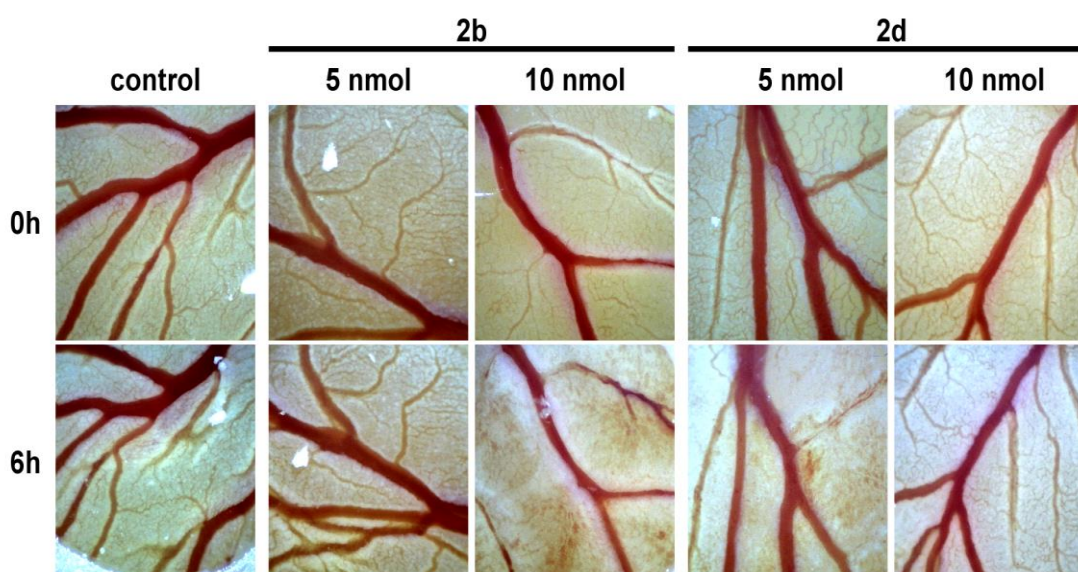


Figura 6B.7. Efectos del tratamiento de **2b** y **2d** (5 o 10 nmol) en la CAM de huevos fertilizados después de 6 h. El control contiene una cantidad igual de DMSO. Imágenes representativas de tres experimentos independientes. Ampliación 60x.

6B.2.6. Estudio de microtúbulos

La formación de vasculatura tumoral se puede regir por agentes inhibidores de la angiogénesis, que tienen como diana el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y su receptor (VEGFR) u otras vías proangiogénicas, así como por agentes perturbadores vasculares que han mostrado o bien poseer un efecto apoptótico o bien que afectan al citoesqueleto.⁴² Dado que los compuestos aquí estudiados han mostrado sinergismo entre el efecto citotóxico y la capacidad antiangiogénica *in vivo*, se investigaron los efectos de **2b** y **2d** sobre la polimerización de tubulina y la organización de microtúbulos.

El ensayo de polimerización de tubulina basado en fluorescencia muestra cómo **2b**, y en menor medida **2d**, inhibieron la polimerización de tubulina a una concentración 20 μM , en comparación con el control y con combretastatina A-4 (CA-4), un inhibidor conocido de la formación de microtúbulos.⁴³

A continuación se estudió el efecto de ambos complejos en la organización del citoesqueleto de microtúbulos en células de melanoma 518A2 (Figura 6B.8). Los inhibidores típicos de la polimerización de tubulina, tales como CA-4, causan la desestabilización del citoesqueleto de esta proteína mediante su interacción directa con la misma, teniendo como consecuencia la desintegración celular. En las células endoteliales este efecto causa la degradación de los vasos sanguíneos formados (tumor).⁴³ Como era de esperar, se observó una distribución normal de microtúbulos a través de las células control (que contenían una cantidad equivalente de DMSO usada para los compuestos). Sin embargo, 24 h de incubación con 2 μM de **2d** muestra una red de tubulina casi

completamente degenerada, no sólo el número de células se redujo, sino también las células tratadas con 2 μM de **2b** se redondeaban en comparación con el control. Por el contrario, el tratamiento de las células de melanoma con 2 μM de **2b** resultó en un débil cambio en la red de tubulina; los microtúbulos mantenían una estructura definida, aunque se observa una degradación inicial de la red de tubulina alrededor de los núcleos.

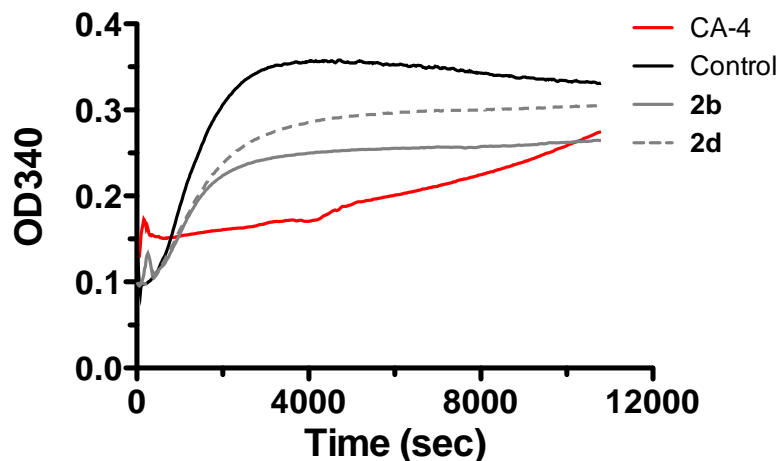


Figura 6B.8: Efecto de los complejos **2d** y **2b** a 20 μM y CA-4 a 5 μM sobre la polimerización de la tubulina. Los datos son representativos de dos experimentos independientes.

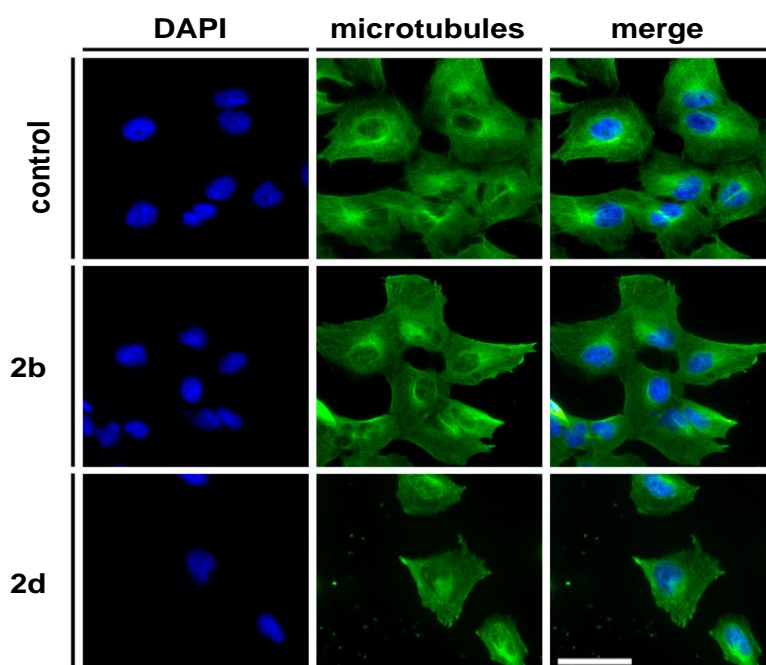


Figura 6B.9. Efecto sobre la organización celular de los microfilamentos. Visualización microscópica por fluorescencia de microtúbulos (anti- α -tubulina) y núcleos (DAPI) en células de melanoma 518A2 después de 24 h de incubación con DMSO (control) o 2 μM de **2b** y **2d**. Aumento: 400 veces. Barra de escala: 50 μm . Imágenes son representativas de dos experimentos independientes.

6B.3. Conclusiones

Se ha explorado la influencia de la aromaticidad en las actividades anticancerígenas y antiavasculares de una serie de nuevos compuestos de Pt(II) [Pt (C^N)Cl(DMSO)] **2a-2f** basados en N,N-dimetil-1-(2-aril)metanaminas como el esqueleto C^N. Los compuestos dieron valores de IC₅₀ en un intervalo micromolar bajo hacia las líneas celulares ováricas, de cáncer de mama y melanoma humanas, resultando ser marcadamente más citotóxicos que CDDP en la línea MDA-MB-231, altamente metastásica. Este estudio muestra cómo el incremento de hidrofobicidad en el sentido **2a** < **2d** < **2b** (según sus tiempos de retención) daba lugar a una mayor acumulación en las células, lo que a su vez explica su mayor actividad anticancerígena. Sin embargo, cuando se realizaron cambios estructurales adicionales desde **2a** para obtener **2c**, **2e** y **2f**, no se encontró correlación entre la hidrofobicidad y la acumulación y, por consiguiente, la actividad anticancerígena de estos compuestos cae por debajo de la del compuesto **2a** parental. Estos datos sugieren que existe un rango óptimo para la extensión de la aromaticidad/lipofilidad en este tipo de compuestos. En los estudios determinados a encontrar el mecanismo de acción, se observó que los compuestos **2b** y **2d** activar cascadas apoptóticas, disminuyen la producción de ROS en células A2780 sin modificar el potencial de membrana mitocondrial e interactuando con el ADN. Además, sus efectos antiangiogénicos, junto con su capacidad para inhibir la polimerización de tubulina y degenerar la red del citoesqueleto proporcionan evidencia de que estos complejos actúan como agentes disruptores vasculares, lo que se pudo verificar *in vivo* en el caso de los compuestos **2b** y **2d** mediante el ensayo de CAM.

6B.4. Bibliografía

1. Kelland, L. "The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy", **2007**, Nat Rev Cancer, (7), 573-584.
2. Wang, D.; Lippard, S. J. "Cellular processing of platinum anticancer drugs", **2005**, Nat Rev Drug Discov, (4), 307-320.
3. Kelland, L. R. "Preclinical perspectives on platinum resistance", **2000**, Drugs, (59 Suppl 4), 1-8; discussion 37-38.
4. Galluzzi, L.; Senovilla, L.; Vitale, I.; Michels, J.; Martins, I.; Kepp, O.; Castedo, M.; Kroemer, G. "Molecular mechanisms of cisplatin resistance", **2012**, Oncogene, (31), 1869-1883.
5. Galluzzi, L.; Vitale, I.; Michels, J.; Brenner, C.; Szabadkai, G.; Harel-Bellan, A.; Castedo, M.; Kroemer, G. "Systems biology of cisplatin resistance: past, present and future", **2014**, Cell Death Dis, (5), e1257.
6. Bergamo, A.; Sava, G. "Linking the future of anticancer metal-complexes to the therapy of tumour metastases", **2015**, Chem Soc Rev, (44), 8818-8835.
7. Teoh, D. G.; Secord, A. A. "Antiangiogenic therapies in epithelial ovarian cancer", **2011**, Cancer Control, (18), 31-43.

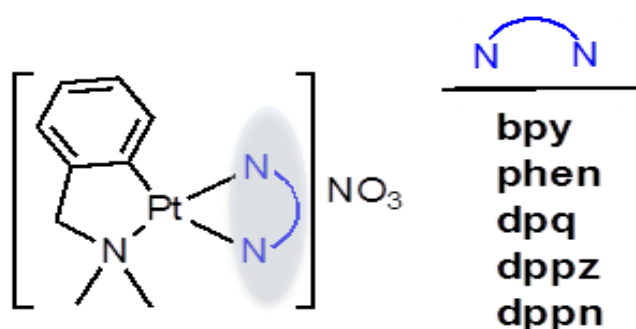
8. de Souza, C. M.; Araujo e Silva, A. C.; de Jesus Ferracioli, C.; Moreira, G. V.; Campos, L. C.; dos Reis, D. C.; Lopes, M. T.; Ferreira, M. A.; Andrade, S. P.; Cassali, G. D. "Combination therapy with carboplatin and thalidomide suppresses tumor growth and metastasis in 4T1 murine breast cancer model", **2014**, *Biomed Pharmacother*, (68), 51-57.
9. Clavel, C. M.; Paunescu, E.; Nowak-Sliwinska, P.; Griffioen, A. W.; Scopelliti, R.; Dyson, P. J. "Modulating the Anticancer Activity of Ruthenium(II)-Arene Complexes", **2015**, *J Med Chem*, (58), 3356-3365.
10. Zhang, J.-J.; Sun, R. W.-Y.; Che, C.-M. "A dual cytotoxic and anti-angiogenic water-soluble gold(III) complex induces endoplasmic reticulum damage in HeLa cells", **2012**, *Chem Comm*, (48), 3388-3390.
11. Fong, T. T.; Lok, C. N.; Chung, C. Y.; Fung, Y. M.; Chow, P. K.; Wan, P. K.; Che, C. M. "Cyclometalated Palladium(II) N-Heterocyclic Carbene Complexes: Anticancer Agents for Potent In Vitro Cytotoxicity and In Vivo Tumor Growth Suppression", **2016**, *Angew Chem Int Ed Engl*, (55), 11935-11939.
12. Karnthaler-Benbakka, C.; Groza, D.; Kryeziu, K.; Pichler, V.; Roller, A.; Berger, W.; Heffeter, P.; Kowol, C. R. "Tumor-targeting of EGFR inhibitors by hypoxia-mediated activation", **2014**, *Angew Chem Int Ed Engl*, (53), 12930-12935.
13. Muenzner, J. K.; Biersack, B.; Kalie, H.; Andronache, I. C.; Kaps, L.; Schuppan, D.; Sasse, F.; Schobert, R. "Gold(I) biscarbene complexes derived from vascular-disrupting combretastatin A-4 address different targets and show antimetastatic potential", **2014**, *ChemMedChem*, (9), 1195-1204.
14. Schobert, R.; Biersack, B.; Dietrich, A.; Knauer, S.; Zoldakova, M.; Fruehauf, A.; Mueller, T. "Pt(II) complexes of a combretastatin A-4 analogous chalcone: effects of conjugation on cytotoxicity, tumor specificity, and long-term tumor growth suppression", **2009**, *J Med Chem*, (52), 241-246.
15. Bincoletto, C.; Tersariol, I. L.; Oliveira, C. R.; Dreher, S.; Fausto, D. M.; Soufen, M. A.; Nascimento, F. D.; Caires, A. C. "Chiral cyclopalladated complexes derived from N,N-dimethyl-1-phenethylamine with bridging bis(diphenylphosphine)ferrocene ligand as inhibitors of the cathepsin B activity and as antitumoral agents", **2005**, *Bioorg Med Chem*, (13), 3047-3055.
16. Pinato, O.; Musetti, C.; Sissi, C. "Pt-based drugs: the spotlight will be on proteins", **2014**, *Metallomics*, (6), 380-395.
17. Di, L.; Kerns, E. H. "Drug-like Properties: Concepts, Structure Design and Methods: from ADME to Toxicity Optimization", **2010**; Elsevier Science.
18. Arnott, J. A.; Planey, S. L. "The influence of lipophilicity in drug discovery and design", **2012**, *Expert Opin Drug Discov*, (7), 863-875.
19. Chen, H.; Parkinson, J. A.; Morris, R. E.; Sadler, P. J. "Highly selective binding of organometallic ruthenium ethylenediamine complexes to nucleic acids: novel recognition mechanisms", **2003**, *J Am Chem Soc*, (125), 173-186.
20. Pichler, V.; Heffeter, P.; Valiahdi, S. M.; Kowol, C. R.; Egger, A.; Berger, W.; Jakupec, M. A.; Galanski, M.; Keppler, B. K. "Unsymmetric Mono- and Dinuclear Platinum(IV) Complexes Featuring an Ethylene Glycol Moiety: Synthesis, Characterization, and Biological Activity", **2012**, *J Med Chem*, (55), 11052-11061.
21. Mendoza-Ferri, M.-G.; Hartinger, C. G.; Eichinger, R. E.; Stolyarova, N.; Severin, K.; Jakupec, M. A.; Nazarov, A. A.; Keppler, B. K. "Influence of the Spacer Length on the in Vitro Anticancer Activity of Dinuclear Ruthenium-Arene Compounds", **2008**, *Organometallics*, (27), 2405-2407.
22. Millett, A. J.; Habtemariam, A.; Romero-Canelon, I.; Clarkson, G. J.; Sadler, P. J. "Contrasting Anticancer Activity of Half-Sandwich Iridium(III) Complexes Bearing Functionally Diverse 2-Phenylpyridine Ligands", **2015**, *Organometallics*, (34), 2683-2694.

23. Bhattacharyya, S. "Reductive alkylation of dimethylamine using titanium(IV) isopropoxide and sodium borohydride: an efficient, safe, and convenient method for the synthesis of N,N-dimethylated tertiary amines", **1995**, *The Journal of Organic Chemistry*, (60), 4928-4929.
24. Khosravi-Far, R. W., E "Programmed cell death in cancer progression and therapy", **2008**; Springer.
25. Pichler, V.; Heffeter, P.; Valiahdi, S. M.; Kowol, C. R.; Egger, A.; Berger, W.; Jakupec, M. A.; Galanski, M.; Keppler, B. K. "Unsymmetric mono- and dinuclear platinum(IV) complexes featuring an ethylene glycol moiety: synthesis, characterization, and biological activity", **2012**, *J Med Chem*, (55), 11052-11061.
26. Valko, K. "Application of high-performance liquid chromatography based measurements of lipophilicity to model biological distribution", **2004**, *J Chromatogr A*, (1037), 299-310.
27. van Rijt, S. H.; Mukherjee, A.; Pizarro, A. M.; Sadler, P. J. "Cytotoxicity, Hydrophobicity, Uptake, and Distribution of Osmium(II) Anticancer Complexes in Ovarian Cancer Cells", **2010**, *J Med Chem*, (53), 840-849.
28. Novohradsky, V.; Liu, Z.; Vojtiskova, M.; Sadler, P. J.; Brabec, V.; Kasparkova, J. "Mechanism of cellular accumulation of an iridium(III) pentamethylcyclopentadienyl anticancer complex containing a C,N-chelating ligand", **2014**, *Metallomics*, (6), 682-690.
29. Arnott, J. A.; Planey, S. L. "The influence of lipophilicity in drug discovery and design", **2012**, *Expert Opinion on Drug Discovery*, (7), 863-875.
30. Oldfield, S. P.; Hall, M. D.; Platts, J. A. "Calculation of lipophilicity of a large, diverse dataset of anticancer platinum complexes and the relation to cellular uptake", **2007**, *J Med Chem*, (50), 5227-5237.
31. Young, R. J.; Green, D. V.; Luscombe, C. N.; Hill, A. P. "Getting physical in drug discovery II: the impact of chromatographic hydrophobicity measurements and aromaticity", **2011**, *Drug Discov Today*, (16), 822-830.
32. Hiraoka, Y.; Shimi, T.; Haraguchi, T. "Multispectral Imaging Fluorescence Microscopy for Living Cells", **2002**, *Cell Structure and Function*, (27), 367-374.
33. Park, G. Y.; Wilson, J. J.; Song, Y.; Lippard, S. J. "Phenanthriplatin, a monofunctional DNA-binding platinum anticancer drug candidate with unusual potency and cellular activity profile", **2012**, *Proc Natl. Acad Sci U S A*, (109), 11987-11992.
34. Imstepf, S.; Pierroz, V.; Raposo, P.; Bauwens, M.; Felber, M.; Fox, T.; Shapiro, A. B.; Freudenberg, R.; Fernandes, C.; Gama, S.; Gasser, G.; Motthagy, F.; Santos, I. R.; Alberto, R. "Nuclear Targeting with an Auger Electron Emitter Potentiates the Action of a Widely Used Antineoplastic Drug", **2015**, *Bioconjugate Chem*, (26), 2397-2407.
35. Pichler, V.; Goschl, S.; Schreiber-Brynzak, E.; Jakupec, M. A.; Galanski, M.; Keppler, B. K. "Influence of reducing agents on the cytotoxic activity of platinum(IV) complexes: induction of G2/M arrest, apoptosis and oxidative stress in A2780 and cisplatin resistant A2780cis cell lines", **2015**, *Metallomics*, (7), 1078-1090.
36. Kandioller, W.; Balsano, E.; Meier, S. M.; Jungwirth, U.; Goschl, S.; Roller, A.; Jakupec, M. A.; Berger, W.; Keppler, B. K.; Hartinger, C. G. "Organometallic anticancer complexes of lapachol: metal centre-dependent formation of reactive oxygen species and correlation with cytotoxicity", **2013**, *Chem Commun*, (49), 3348-3350.
37. Schmidlehner, M.; Flocke, L. S.; Roller, A.; Hejl, M.; Jakupec, M. A.; Kandioller, W.; Keppler, B. K. "Cytotoxicity and preliminary mode of action studies of novel 2-aryl-4-thiopyrone-based organometallics", **2016**, *Dalton Trans*, (45), 724-733.

38. Trachootham, D.; Alexandre, J.; Huang, P. "Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach?", **2009**, *Nat Rev Drug Discov*, (8), 579-591.
39. Wen, S.; Zhu, D.; Huang, P. "Targeting cancer cell mitochondria as a therapeutic approach", **2013**, *Future Med Chem*, (5), 53-67.
40. Kim, K. H.; Park, J. Y.; Jung, H. J.; Kwon, H. J. "Identification and biological activities of a new antiangiogenic small molecule that suppresses mitochondrial reactive oxygen species", **2011**, *Biochem Biophys Res Commun*, (404), 541-545.
41. Deryugina, E. I.; Quigley, J. P. "Chick embryo chorioallantoic membrane model systems to study and visualize human tumor cell metastasis", **2008**, *Histochem cell biol*, (130), 1119-1130.
42. Siemann, D. W. "The unique characteristics of tumor vasculature and preclinical evidence for its selective disruption by Tumor-Vascular Disrupting Agents", **2011**, *Cancer Treat Rev*, (37), 63-74.
43. Tron, G. C.; Pirali, T.; Sorba, G.; Pagliai, F.; Busacca, S.; Genazzani, A. A. "Medicinal Chemistry of Combretastatin A4: Present and Future Directions", **2006**, *J Med Chem*, (49), 3033-3044.

Sección 6C

Actividad teranóstica de derivados polipiridínicos de platino(II)



Los resultados de esta Sección forman parte del siguiente artículo:

Ana Zamora, Erin Wachter, Sergio A. Pérez, Giampaolo Barone, María Vera, David Heidary, Venancio Rodríguez, Vanesa Fernández-Espín, Christoph Janiak, Edith C. Glazer and José Ruiz. "Novel Pseudo-Tetrahedral Antitumor Organoplatinum(II) "Light-Switch" Complexes Selectively Recognize Duplex AT rich DNA Sequences", 2017, manuscrito en preparación.

6C.1. Introducción

Los compuestos intercaladores de ADN han sido ampliamente estudiados debido a su potencial terapéutico¹ y de diagnóstico.² Más interesantes son los agentes "teranósticos", que combinan en una sola modalidad tanto las propiedades terapéuticas como las de diagnóstico por imagen.³ Los intercaladores consisten esencialmente en una molécula aromática plana cargada positivamente que se une de forma reversible mediante el apilado de π - π entre pares de bases, dando como resultado el desplegamiento y desenrollado de la doble hélice. Tales perturbaciones del ADN, conocidas por modificar los procesos asociados al ADN, como la replicación, la transcripción y la reparación, son responsables de la actividad biológica de los compuestos.

Desde que el grupo de Barton⁴ identificó por primera vez el fenómeno del efecto "*light switch*" para el complejo $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{dppz})_2]^{2+}$ (bpy = 2,2'-bipiridina; dppz = dipirido[3,2-*a*:2',3'-*c*]fenazina), el estudio de la interacción entre los complejos polipiridilo y el ADN ha ganado mucha atención. De hecho, se ha realizado un gran esfuerzo en el desarrollo de complejos más selectivos para una amplia variedad de estructuras de ADN.⁵ La modificación de los ligandos auxiliares dppz, bpy y diimina derivó a complejos con propiedades fotofísicas y a afinidades de unión al ADN bastante diferentes. La variación de los coligandos ha dado lugar a una serie de comportamientos de luminiscencia, que van desde los compuestos no emisivos⁶ hasta los emisivos,⁷ e incluso a complejos con un efecto de "*light switch*" dependientes de la temperatura.⁸ Además, los ligandos auxiliares se han diseñado para reconocer selectivamente a la doble cadena frente a una sola cadena de ADN,⁹ mientras que las modificaciones del ligando dppz han dado lugar a una notable selectividad del G-cuádruplex sobre el ADN dúplex.

Estos resultados promovieron el estudio de complejos de tipo dppz de Ru(II) con otros iones metálicos tales como Re(I),¹⁰ Rh(III),¹¹ Pt(II),¹² Os(III)¹³ e Ir(III).¹⁴ Entre ellos, los complejos Pt(II) son un punto culminante debido a su geometría de coordinación cuadrado plana, más adecuada que cualquier otra para un modo de unión intercalante, así como al hecho de que los complejos Pt(II) que interactúan con el ADN presentan típicamente actividad anticancerígena. Sin embargo, la química y la biología de los complejos Pt(II) luminiscentes se ha centrado principalmente en los agentes coordinadores de polipiridilo tridentado,¹⁵⁻¹⁷ mientras que sólo se han descrito algunos ejemplos de complejos tipo Pt-dppz.^{12,18} Este hecho es bastante sorprendente teniendo en cuenta que algunos de estos sistemas actúan como sondas luminiscentes para el G-cuádruplex,¹² mientras que otros presentan potentes actividades antitumorales.^{18,19} La exploración de complejos de platino que son capaces de exhibir interacciones no convencionales con el ADN y, por lo tanto, se desvían tanto en su estructura como en su mecanismo de acción

de aquellos del tipo de cisplatino (CDDP), ampliaría el abanico terapéutico con una mayor efectividad.²⁰

En esta Sección, describimos la actividad biológica de una serie de complejos organometálicos de platino(II) del tipo $\text{Pt}(\text{dmba})(\text{N}^{\wedge}\text{N})\text{NO}_3$ donde el ligando ciclometalado *dmba* (N,N-dimetilbencilamina- κN , κC) permanece, mientras que se modifica el ligando diimina: $\text{N}^{\wedge}\text{N}$ = bpy **1**, phen **2**, dpq **3**, dppz **4** y dppn **5** (phen = 1,10-fenantrolina, dpq = dipirido[3,2-d:2',3'-f]quinoxalina, dppn = benzo[i]dipirido[3,2-a:2',3'-c]fenazina, Figura 6C.1). Esta serie de complejos también inhiben el crecimiento de células cancerosas en cultivo de tejidos 2D y suprimen el crecimiento tumoral en esferoides tumorales 3D.

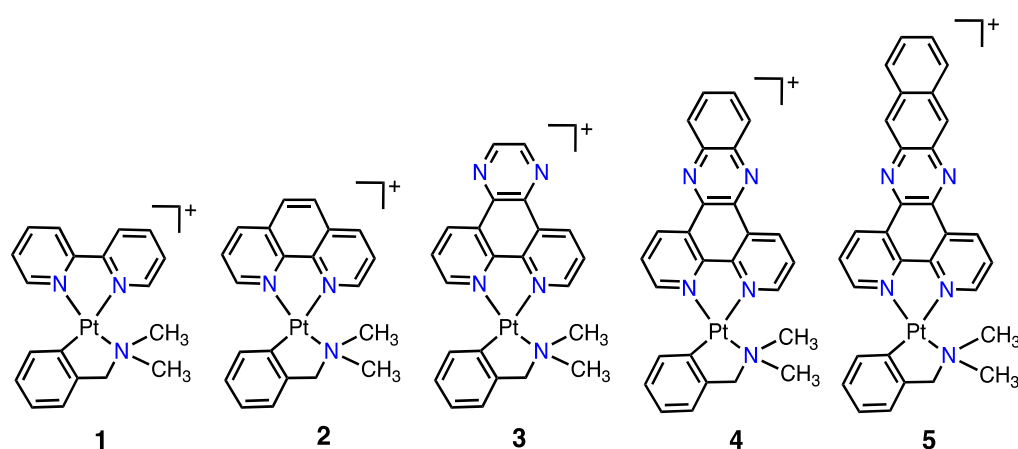


Figura 6C.1. Estructuras de $[\text{Pt}(\text{dmba})(\text{bpy})]^+$ (**1**), $[\text{Pt}(\text{dmba})(\text{phen})]^+$ (**2**), $[\text{Pt}(\text{dmba})(\text{dpq})]^+$ (**3**), $[\text{Pt}(\text{dmba})(\text{dppz})]^+$ (**4**), $[\text{Pt}(\text{dmba})(\text{dppn})]^+$ (**5**).

6C.2. Resultados y discusión

6C.2.1. Estudio de citotoxicidad

La actividad antiproliferativa de **1-5** se evaluó *in vitro* utilizando el ensayo MTT y se comparó con CDDP y el precursor monofuncional $[\text{Pt}(\text{dmba})(\text{DMSO})\text{Cl}]$ frente a un panel de líneas celulares de cáncer humano (Tabla 6C.1). Los complejos **1-5** mostraron distinta actividad antiproliferativa frente a las líneas celulares de cáncer estudiadas, con valores de IC_{50} en el intervalo micromolar. Los compuestos **1** y **2** mostraron una disminución de 6 veces en la actividad con respecto a **5**, el más activo contra la línea celular de cáncer de ovario epitelial A2780. Debe observarse que todos los complejos mostraron una actividad superior que el CDDP frente a la línea celular de cáncer de mama MCF-7 de resistencia múltiple y frente a la línea celular A2780cis resistente a CDDP, con factores de resistencia cercanos a la unidad ($\text{RF} < 2$ superan la resistencia adquirida que A2780cis desarrolla a CDDP).²¹ Además, los complejos **4** y **5** resultaron hasta 6 veces más activos que el

complejo monofuncional [Pt(dmba)(DMSO)Cl] en la línea celular MCF-7, al mismo tiempo que presentan menores valores de RF, demostrando que una interacción no convencional puede ser una alternativa adecuada para eludir los problemas asociados a los fármacos antitumorales clásicos de Pt(II).

Tabla 6C.1. Valores de IC₅₀, RF, SF e índice MCR para los compuestos **1-5** a las 48 h.

Compuesto	A2780	A2780cis	RF	MCF-7	BGM	SF
Pt(dmba)(DMSO)Cl	0,98±0,07	2,12 ±0,14	2,16	6,54±0,25	6,55±0,20	6,68
1	2,62±0,29	3,57 ±0,26	1,36	9,26±0,79	15,10±1,75	5,76
2	2,37±0,44	2,67 ±0,21	1,13	9,96±0,31	13,28±1,42	5,60
3	2,05±0,04	2,51 ±0,26	1,22	3,38±0,21	12,87±0,29	6,28
4	0,66±0,01	0,33 ±0,01	0,79	1,53±0,01	7,99±0,58	12,11
5	0,42±0,01	0,78 ±0,02	1,18	1,09±0,12	4,55±0,02	10,83
CDDP	2,71±0,15	17,46±1,10	6,45	17,96±2,02	7,38±0,75	2,73

Tabla 6C.1 (cont).

Compuesto	A549	A549 esferoide	Índice MCR
Pt(dmba)(DMSO)Cl	n.d. ^a	n.d.	n.d.
1	2,37±0,26	n,d,	n,d,
2	1,53±0,18	n,d	n,d
3	5,45±0,22	74,15±1,12	13,6
4	1,20±0,13	35,08±1,06	29,2
5	1,43±0,04	78,69±1,11	55,0
CDDP	0,96±0,19	34,18±1,13	35,6

^a n.d.: no definido

Además, también se evaluó la actividad antiproliferativa *in vitro* frente a células BGM renales no tumorigénicas, con el fin de determinar su selectividad diferencial del cáncer frente a las células normales. Con la excepción de **5**, se encontró que todos los complejos eran menos tóxicos que CDDP y, lo que es más importante, los valores del factor de

selectividad, SF, atestiguan una citotoxicidad preferencial de los complejos de Pt hacia células neoplásicas. El valor de SF más alto de células en A2780 (12,11 para **4**, 2,13 para [Pt(dmba)(DMSO)Cl] y 2,73 para CDDP) podría contribuir a aumentar la probabilidad de especificidad-tumor de estos fármacos anticancerosos. Este resultado se debe remarcar ya que hay preocupación significativa respecto de la nefrotoxicidad causada por la quimioterapia basada en metales.

El escrutinio inicial de fármacos se realiza habitualmente en cultivos celulares bidimensionales, aunque se acepta que las monocapas no modulan eficazmente las características de tumores *in vivo*.²² Efectivamente, *in vivo* las células tumorales forman sólidos tridimensionales. El crecimiento de esferoides 3D se aproxima más a la complejidad de las condiciones celulares *in vitro* a las reales *in vivo*. Estos esferoides imitan la fisiopatología de tumores, incluyendo regiones hipóxicas/necróticas, cambios en la forma celular, altas proporciones de células quiescentes, alteraciones en los perfiles de expresión génica y disminución de la permeabilidad a los fármacos. Como resultado, los esferoides exhiben el fenómeno denominado de resistencia multicelular (MCR), que se manifiesta en la disminución de la eficacia de los quimioterapéuticos en niveles similares a las actividades *in vivo*.²³ El índice MCR se determina como el cociente entre los valores de IC₅₀ para células formando esferoides y formando monocapas. En la Tabla 6C.1 se indican también los valores de MCR para las células A549. Un valor de MCR alto indica gran resistencia al fármaco cuando las células forman estructuras tridimensionales, es decir, el fármaco probablemente sería menos efectivo *in vivo*, debido a la agregación celular. Así, para caracterizar los compuestos de organoplatino(II) en condiciones más desafiantes y biológicamente relevantes, se evaluó la eficacia en un modelo de tumor 3D con células A549. Se observó una citotoxicidad significativa para **4**, con un valor IC₅₀ en el orden de lo encontrado para CDDP. Los valores de IC₅₀ para **3** y **5** cayeron a 70 μM, mostrando una mayor reducción de actividad en el modelo esferoide en comparación con **4**. Sin embargo, cabe resaltar que los índices de MCR para **3** y **4** sea inferiores al del CDDP, dado que este índice es mucho menor para el CDDP que para muchos otros quimioterapéuticos.²³

6C.2.2. Localización celular

Aunque los complejos **1–5** presentan una débil luminiscencia en medios polares, el entorno hidrofóbico proporcionado por las células ofrece la oportunidad de visualizar la distribución subcelular donde los complejos se vuelven luminiscentes. Las células se incubaron durante 1 h con **5** a 1 μM y los núcleos se tiñeron específicamente con 1 μM de naranja acridina (AO) durante 30 min. AO es capaz de intercalarse con ADN y de interactuar electrostáticamente con ARN, de tal forma que emite verde (525 nm) o rojo (> 630 nm), respectivamente. Por tanto, se utilizó la microscopía de fluorescencia de imagen multiespectral para adquirir simultáneamente imágenes de alta resolución (Figura

6C.2). Las imágenes del compuesto **5** revelaron los ácidos nucleicos como la diana principal, dado que el complejo se acumulaba exclusivamente en el núcleo tan solo después de 1 h de incubación.

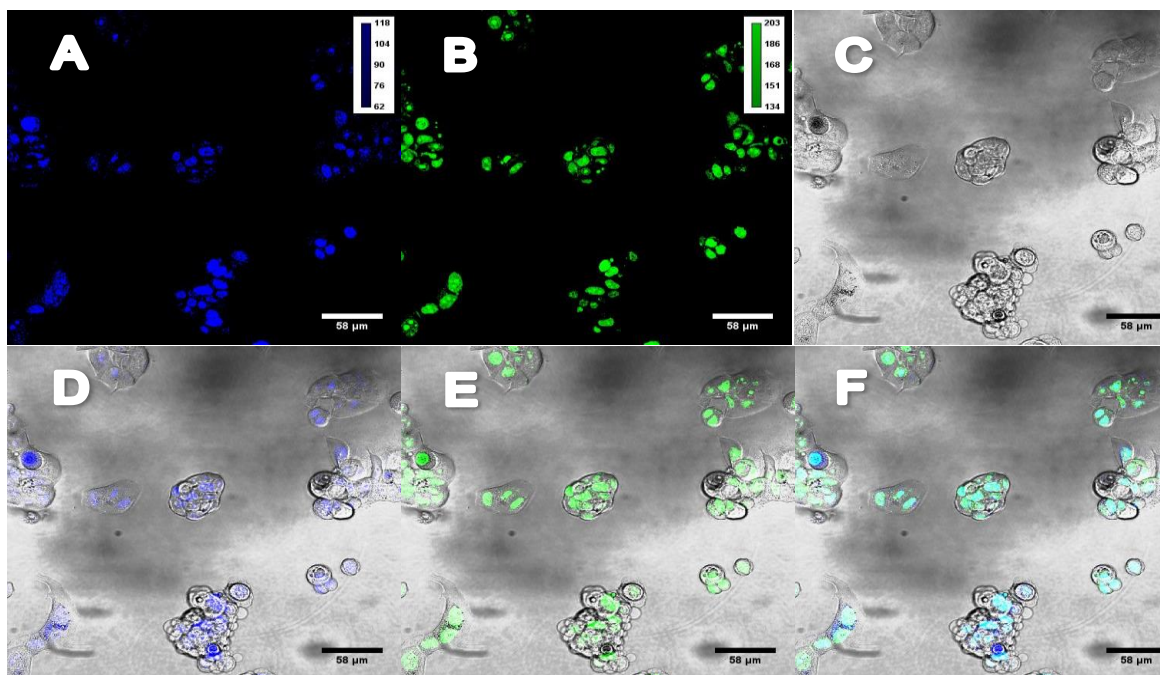


Figura 6C.2. Determinación de la localización intracelular mediante experimentos de microscopía confocal. Las células MCF-7 en cultivo se incubaron durante 1 h con **5** (1 μM) y los núcleos celulares se marcaron usando AO (1 μM). (A) El compuesto **5** se identificó utilizando ($\lambda_{\text{ex}} = 458 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 460\text{-}480 \text{ nm}$). (B) Se utilizó AO para identificar núcleos ($\lambda_{\text{ex}} = 514 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 525 \text{ nm}$). (F) Superposición de **5**, imágenes AO y contraste de fase (C). (D) y (E) son combinaciones de **5** y AO con contraste de fase, respectivamente. Barra de escala: 58 μm .

6C.3. Conclusiones

Se ha estudiado la actividad antitumoral de diferentes complejos organometálicos de Pt(II) del tipo $[\text{Pt}(\text{dmba})(\text{N}^{\wedge}\text{N})]\text{NO}_3$ ($\text{N}^{\wedge}\text{N}$ = ligando diimina). La microscopía confocal de **5** en células vivas MCF-7 indica que el complejo se acumula exclusivamente en el núcleo de ADN por lo que se supone que éste es la diana principal. El modo de acción no convencional de todos los compuestos resultó en una notable actividad antitumoral de los complejos en las cinco células cancerosas, con valores de RF y SF mejores que el de CDDP y el complejo monofuncional $[\text{Pt}(\text{dmba})(\text{DMSO})\text{Cl}]$. Además, **3-5** suprimen el crecimiento tumoral en los esferoides tumorales 3D con índice MCR comparable al de CDDP.

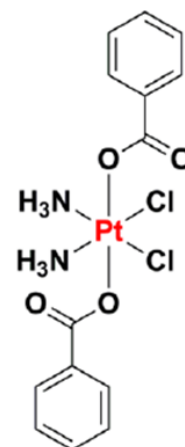
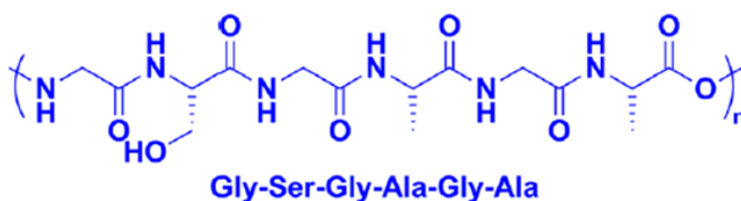
6C.4. Bibliografía

- Hurley, L. H. "DNA and its associated processes as targets for cancer therapy", **2002**, *Nat Rev Cancer*, (2), 188-200.
- Wheate, N. J.; Brodie, C. R.; Collins, J. G.; Kemp, S.; Aldrich-Wright, J. R. "DNA intercalators in cancer therapy: organic and inorganic drugs and their spectroscopic tools of analysis", **2007**, *Mini Rev Med Chem*, (7), 627-648.
- Leung, K.-H.; Lu, L.; Wang, M.; Mak, T.-Y.; Chan, D. S.-H.; Tang, F.-K.; Leung, C.-H.; Kwan, H.-Y.; Yu, Z.; Ma, D.-L. "A Label-Free Luminescent Switch-On Assay for ATP Using a G-Quadruplex-Selective Iridium(III) Complex", **2013**, *PLoS ONE*, (8), e77021.
- Boynton, A. N.; Marcélis, L.; Barton, J. K. "[Ru(Me4phen)2dppz]2+, a Light Switch for DNA Mismatches", **2016**, *J Am Chem Soc*, (138), 5020-5023.
- Sun, L.; Chen, Y.; Kuang, S.; Li, G.; Guan, R.; Liu, J.; Ji, L.; Chao, H. "Iridium(III) Anthraquinone Complexes as Two-Photon Phosphorescence Probes for Mitochondria Imaging and Tracking under Hypoxia", **2016**, *Chemistry*, (22), 8955-8965.
- Nair, R. B.; Yeung, L. K.; Murphy, C. J. "Synthesis and Solvent-Dependent Properties of Ru(acac)2dppz", **1999**, *Inorg Chem*, (38), 2536-2538.
- Schwalbe, M.; Karnahl, M.; Tschierlei, S.; Uhlemann, U.; Schmitt, M.; Dietzek, B.; Popp, J.; Groake, R.; Vos, J. G.; Rau, S. "The switch that wouldn't switch--unexpected luminescence from a ruthenium(II)-dppz-complex in water", **2010**, *Dalton Trans*, (39), 2768-2771.
- Walker, M. G.; Gonzalez, V.; Chekmeneva, E.; Thomas, J. A. "Temperature-switched binding of a RuII (dppz)/DNA light-switch complex", **2012**, *Angew Chem Int Ed Engl*, (51), 12107-12110.
- Shade, C. M.; Kennedy, R. D.; Rouge, J. L.; Rosen, M. S.; Wang, M. X.; Seo, S. E.; Clingerman, D. J.; Mirkin, C. A. "Duplex-selective ruthenium-based DNA intercalators", **2015**, *Chemistry*, (21), 10983-10987.
- Olmon, E. D.; Sontz, P. A.; Blanco-Rodríguez, A. M.; Towrie, M.; Clark, I. P.; Vlček, A.; Barton, J. K. "Charge Photoinjection in Intercalated and Covalently Bound [Re(CO)(3)(dppz)(py)](+)-DNA Constructs Monitored by Time Resolved Visible and Infrared Spectroscopy", **2011**, *J Am Chem Soc*, (133), 13718-13730.
- Menon, E. L.; Perera, R.; Navarro, M.; Kuhn, R. J.; Morrison, H. "Phototoxicity against tumor cells and Sindbis virus by an octahedral rhodium bisbipyridyl complex and evidence for the genome as a target in viral photoinactivation", **2004**, *Inorg Chem*, (43), 5373-5381.
- Ma, D. L.; Che, C. M.; Yan, S. C. "Platinum(II) complexes with dipyrrophenazine ligands as human telomerase inhibitors and luminescent probes for G-quadruplex DNA", **2009**, *J Am Chem Soc*, (131), 1835-1846.
- Wragg, A.; Gill, M. R.; Hill, C. J.; Su, X.; Meijer, A. J.; Smythe, C.; Thomas, J. A. "Dinuclear osmium(II) probes for high-resolution visualisation of cellular DNA structure using electron microscopy", **2014**, *Chem Commun (Camb)*, (50), 14494-14497.
- Stimpson, S.; Jenkinson, D. R.; Sadler, A.; Latham, M.; Wragg, A.; Meijer, A. J.; Thomas, J. A. "Tuning the excited state of water-soluble Ir(III)-based DNA intercalators that are isostructural with [Ru(II)(NN)2(dppz)] light-switch complexes", **2015**, *Angew Chem Int Ed Engl*, (54), 3000-3003.
- McGuire Jr, R.; McGuire, M. C.; McMillin, D. R. "Platinum(II) polypyridines: A tale of two axes", **2010**, *Coord Chem Rev*, (254), 2574-2583.
- Cummings, S. D. "Platinum complexes of terpyridine: Synthesis, structure and reactivity", **2009**, *Coord Chem Rev*, (253), 449-478.

17. Mauro, M.; Aliprandi, A.; Septiadi, D.; Kehr, N. S.; De Cola, L. "When self-assembly meets biology: luminescent platinum complexes for imaging applications", **2014**, Chem Soc Rev, (43), 4144-4166.
18. Pages, B. J.; Li, F.; Wormell, P.; Ang, D. L.; Clegg, J. K.; Kepert, C. J.; Spare, L. K.; Danchaiwijit, S.; Aldrich-Wright, J. R. "Synthesis and analysis of the anticancer activity of platinum(II) complexes incorporating dipyridoquinoxaline variants", **2014**, Dalton Trans, (43), 15566-15575.
19. Krause-Heuer, A. M.; Grünert, R.; Kühne, S.; Buczkowska, M.; Wheate, N. J.; Le Pevelen, D. D.; Boag, L. R.; Fisher, D. M.; Kasparkova, J.; Malina, J.; Bednarski, P. J.; Brabec, V.; Aldrich-Wright, J. R. "Studies of the Mechanism of Action of Platinum(II) Complexes with Potent Cytotoxicity in Human Cancer Cells", **2009**, J Med Chem, (52), 5474-5484.
20. Johnstone, T. C.; Suntharalingam, K.; Lippard, S. J. "The Next Generation of Platinum Drugs: Targeted Pt(II) Agents, Nanoparticle Delivery, and Pt(IV) Prodrugs", **2016**, Chem Rev, (116), 3436-3486.
21. Kelland, L. R.; Barnard, C. F.; Mellish, K. J.; Jones, M.; Goddard, P. M.; Valenti, M.; Bryant, A.; Murrer, B. A.; Harrap, K. R. "A novel trans-platinum coordination complex possessing in vitro and in vivo antitumor activity", **1994**, Cancer Res, (54), 5618-5622.
22. Abbott, A. "Cell culture: Biology's new dimension", **2003**, Nature, (424), 870-872.
23. Desoize, B.; Jardillier, J. "Multicellular resistance: a paradigm for clinical resistance?", **2000**, Crit Rev Oncol Hematol, (36), 193-207.

Capítulo 7

Actividad biológica de nanopartículas de fibroína de seda portadoras de un profármaco de platino(IV)



Los resultados de este Capítulo se han publicado en:

Lozano-Perez, A. A.; Gil, A. L.; Perez, S. A.; Cutillas, N.; Meyer, H.; Pedreno, M.; D. Aznar-Cervantes, S.; Janiak, C.; Cenis, J. L.; Ruiz, J. "Antitumor properties of platinum(IV) prodrug-loaded silk fibroin nanoparticles", **2015**, Dalton Transactions, (44), 13513-13521.

7.1. Introducción

Los fármacos de platino(II) son agentes efectivos contra diferentes tipos de cánceres como el testicular, el de ovario, el de vejiga y, en algunos casos, el de pulmón.¹ En clínica, el cisplatino puede unirse al ADN genómico. No obstante, como la mayoría de las moléculas pequeñas utilizadas como agentes anticancerígenos, su uso clínico está limitado por su alta toxicidad y altos efectos secundarios,^{2,3} en general nefrotoxicidad y neurotoxicidad, así como episodios de resistencia asociada al platino.⁴ El centro hidrofóbico de platino(IV) del complejo PtBz (Figura 7.1) situado en un entorno octaédrico es más inerte respecto de las reacciones de sustitución que los centros del platino(II). Cuando este compuesto se introduce en células tumorales, los diferentes agentes reductores existentes en ellas, tales como el glutatión, las metalotioneínas, cisteínas y el ácido ascórbico, producen la reducción de Pt(IV) a Pt(II), con la consiguiente liberación de los ligandos axiales, generándose la especie hidrofílica CDDP.^{5,6}

En los últimos años las nanopartículas han llamado la atención porque pueden facilitar la cesión de fármacos terapéuticos aprovechando los poros vasculares tumorales de tamaño nano acoplados a la eliminación linfática y al lento retorno venoso en estos tejidos, es decir, el denominado efecto de permeabilización y retención aumentada (EPR).⁷⁻¹⁴ La investigación en nanotransportadores que se basan en la liberación de compuestos de platino representa un área de prioritario interés actual y puede permitir el desarrollo de una nueva generación en la quimioterapia del platino.¹⁵⁻²⁰

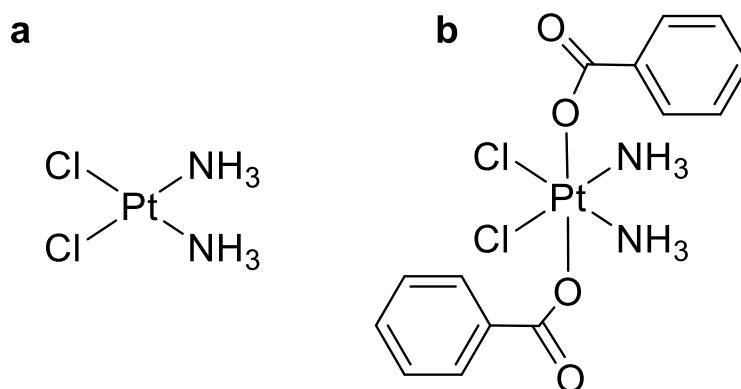


Figura 7.1. (a) Cisplatino. (b) Complejo de platino(IV) PtBz.

Por otro lado, los polímeros naturales tales como proteínas y polisacáridos representan una plataforma biomédica muy prometedora debido a su carácter renovable, no citotóxico, su biocompatibilidad y su biodegradabilidad.²¹⁻²⁴ Una de estas nanopartículas poliméricas es la proteína fibroína de seda,²⁵⁻²⁷ que muestra un bajo grado de inmunogenicidad.²⁸

La proteína fibroína de la seda (SFN), obtenida del gusano de la seda *Bombyx mori*, es una proteína de aproximadamente 5500 aminoácidos que consiste en la repetición del péptido de seis residuos (Gly-Ala-Gly-Ala-Gly-Ser)_n.²⁹ La fibroína de seda se ha usado ampliamente en el andamiaje de vasos sanguíneos, piel, huesos, cartílagos y tejido nervioso.³⁰⁻³² Recientemente se han publicado trabajos de SFNs cargadas con fármacos antitumorales como el paclitaxel,²³ el metotrexato,²⁶ la doxorubicina,^{28,33} y el CDDP.³⁴

Aquí revelamos un nuevo conjugado, Pt(IV)-SFN, que exhibe fuertes efectos citotóxicos frente a las células resistentes al cisplatino A2780cis y frente a un panel de células de cáncer de mama. Hemos estudiado, asimismo, su capacidad apoptótica y para detener el ciclo celular. Hemos elegido el compuesto inerte e hidrofóbico de Pt(IV) PtBz³⁵ (Figura 7.1) para evitar la desactivación del CDDP por su posible interacción covalente con algunos aminoácidos de la fibroína.

7.2. Resultados y discusión

7.2.1. Preparación y caracterización de PtBz-SFNs

Las nanopartículas PtBz-SFN se generaron por suspensión de las SFN liofilizadas, obtenidas del gusano *Bombyx mori*,³⁶ con una disolución de PtBz³⁵ en DMSO y dispersadas mediante sonicación. Las partículas cargadas se recogieron por centrifugación. La cantidad de profármaco atrapado se optimizó para maximizar tanto la carga como la eficiencia. El contenido de platino en PtBz-SFN se medía a partir del sobrenadante mediante espectrometría de absorción atómica (AAS). La determinación de los tamaños en las nanopartículas se realizó mediante dispersión de luz dinámica (DLS). La determinación de la carga del fármaco se realizó en 15 experimentos independientes con diferentes tandas de nanopartículas de seda llegando a un 4,1 % de PtBz de carga y un máximo en la eficiencia de la captación de fármaco de un 23 %. Cuando se usaba una concentración de PtBz de 10 mg/mL (o más) se obtenían partículas de tamaño no nanométrico. La generación de nanopartículas (NPs) cargadas óptimamente se conseguían utilizando PtBz a una concentración de 5 mg/mL. Estas partículas son de tamaño adecuado para explotar el efecto EPR y, por este motivo, son las que se caracterizaron mediante DLS. Las nanopartículas generadas se caracterizaron mediante tres parámetros físicos: la polidispersidad (PDI), el potencial zeta, y la movilidad electroforética. Estos parámetros, para las muestras realizadas, se indican en la Tabla 7.1. El índice PDI es un parámetro relacionado con el tamaño de partícula. Un valor de PDI próximo a cero indica que el volumen de sus partículas es muy homogéneo, mientras que si el valor se acerca a 1, la muestra presenta gran dispersión de tamaños. El potencial zeta (ζ) es la diferencia de

potencial eléctrico existente entre el medio de una suspensión coloidal y la capa iónica de la que se rodea una partícula en esa suspensión. Un potencial ζ alto (superior a 30 mV, en valor absoluto) indica un alto grado de repulsión electrostática entre las nanopartículas y, en consecuencia, esa suspensión no tenderá a precipitar. Por el contrario, cuando el potencial zeta es bajo (inferior a 10 mV) las repulsiones entre las partículas son pequeñas, estas se aglomeran, forman agregados e, incluso, precipitan. La movilidad electroforética representa la facilidad con la que una partícula coloidal cargada en suspensión se desplaza en la dirección de un campo eléctrico externo aplicado.

Tabla 7.1 Valores comparativos del tamaño de partícula, polidispersidad (PDI), potencial ζ y movilidad de SFNs and PtBz-SFNs cargadas a 5 mg/mL de profármaco en agua a 25 °C).

Muestra	Diámetro (nm)	PDI ^a	Potencial $\zeta \pm SD^b$ (mV)	Movilidad ($\mu\text{mcmV}^{-1}\text{s}^{-1}$)
SFNs	133 ± 22	0,117 ± 0,01	-20 ± 11	-1,6 ± 0.9
PtBz-SFNs	173 ± 57	0,361 ± 0,01	-19 ± 8	-1,5 ± 0.6

^a Valor medio. ^b Valor medio de ζ (n = 5) y tiempos de acumulación = 100.

Para la determinación de las distribuciones de los tamaños de SFN y PtBz-SFN las muestras secas se redispersaban a una concentración de 1 mg/mL en 1,5 mL de agua doblemente desionizada mediante ultrasonidos durante 30 minutos. Las dispersiones resultantes se investigaban mediante DLS para determinar un diámetro hidrodinámico de SFN en el rango de 80-400 nm con una media de 133 ± 22 nm (Tabla 7.1). La nanopartícula PtBz-SFN tiene una distribución de diámetro más ancha de 80-800 nm, con una media de 173 nm ± 57 nm (Tabla 7.1). El diámetro hidrodinámico de DLS es considerablemente mayor que el tamaño primario de partícula obtenido a partir de las medidas TEM y de Microscopía Electrónica de Barrido (SEM, ver más adelante). Esto último se debe, aparentemente, a efectos de aglomeración.

Las fotografías TEM (Figura 7.2) de SFN y PtBz-SFN no muestran diferencias obvias: no existen diferencias ni en formas ni en tamaños en el caso de ambas muestras.

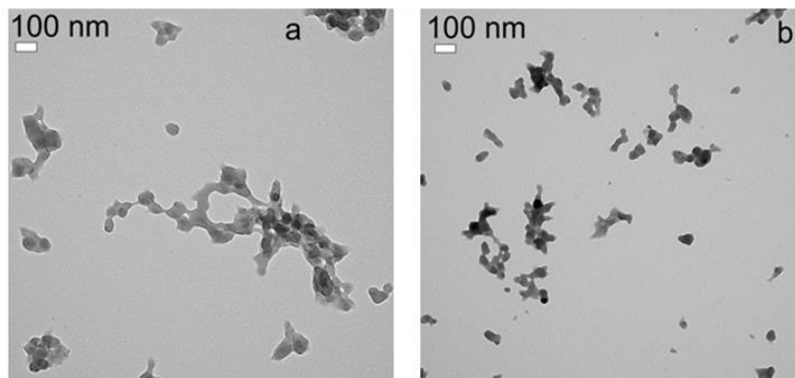


Figura 7.2. Microfotografías de microscopía electrónica de transmisión (TEM) de (a) SFN y (b) PtBz-SFN.

A mayores resoluciones se observan partículas primarias de tamaño de 50 ± 10 nm. Los resultados de los experimentos SEM realizados sobre muestras de SFN y PtBz-SFN (Figura 7.3) coinciden básicamente con las fotografías TEM. El diámetro de las partículas primarias es del orden de 50 nm, lo que está de acuerdo con las medidas TEM. Tampoco aquí se pudieron encontrar diferencias en la forma de las nanopartículas en ambas muestras. No obstante, la apariencia visual macroscópica de las muestras es ligeramente diferente: vistas a ojo o a la luz del microscopio, la muestra de SFNs tiene aspecto de gravilla mientras que PtBz-SFN presenta una morfología fibrilar (Figura 7.4). Estas NPs esféricas mostraban un potencial neto moderadamente negativo de $-19,1 \pm 7,55$ mV (muy cerca de los valores de SFNs, ver Tabla 7.1).

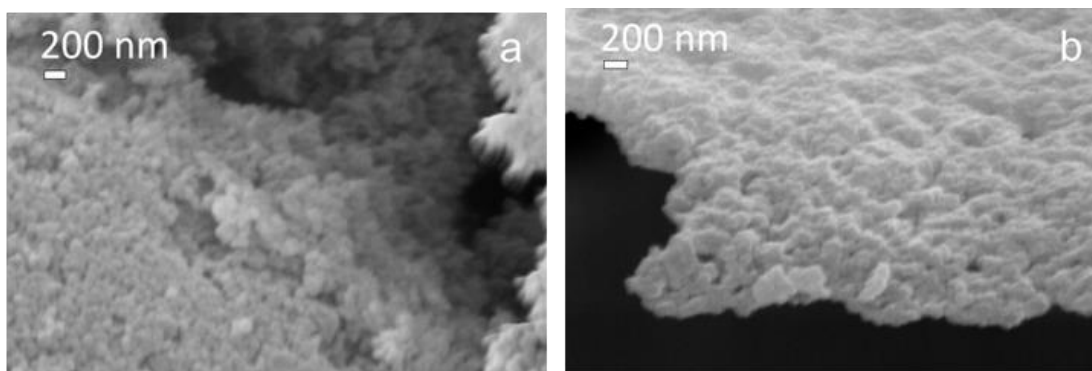


Figura 7.3. Fotos mediante microscopía electrónica de barrido de SFNs (a) y PtBz-SFNs (b).

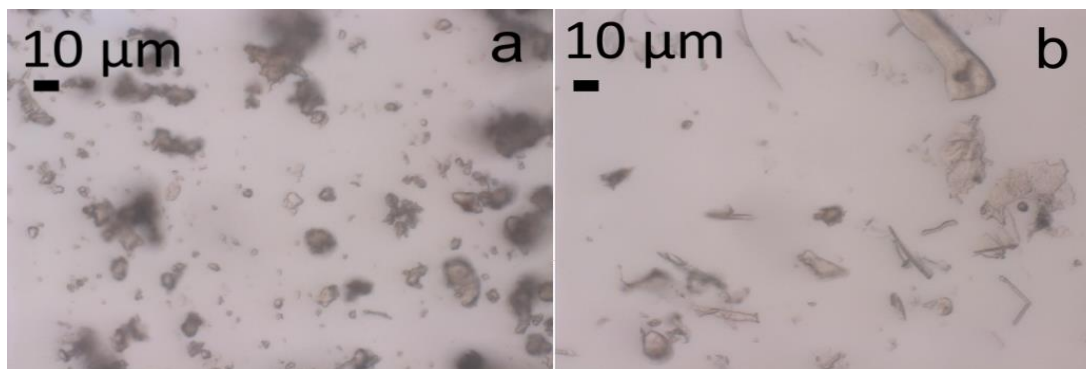


Figura 7.4. Fotografías con microscopio de luz de SFNs (a) y PtBz-SFNs (b) a un aumento de 630 veces.

Para la entrega dirigida, la carga útil del fármaco sólo debe liberarse en el sitio de su objetivo previsto. Con el fin de estudiar las propiedades de liberación de las NPs, se dializaron alícuotas de suspensión de PtBz-SFNs frente a solución salina tamponada con fosfato (PBS) a 37 °C durante 10 días. La liberación de platino durante la diálisis, medida por AAS en este y posteriores experimentos, se presenta en la Figura 7.5 como la fracción de platino atrapado en las NPs que es liberado con el tiempo. Los resultados muestran que sólo el 8,5 % de platino se libera durante las 48 h, manteniendo la carga constante durante el resto del tiempo. Este resultado se encuentra en línea con la pobre solubilidad en agua del fármaco.

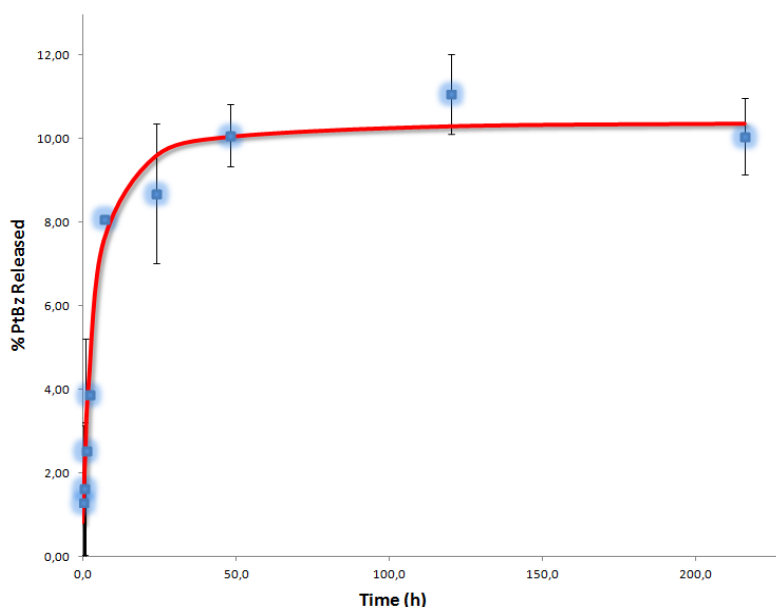


Figura 7.5. Liberación de profármaco PtBz-SNF con respecto al tiempo.

Además, para identificar la naturaleza de los productos de liberación de PtBz-SFNs, se llevó a cabo un estudio mediante HPLC-MS en agua (sin PBS). La única fracción en la que se observaron picos de platino mostró clústers a 543,00 y 420,97 correspondientes a $[\text{PtBz}+\text{H}]^+$ y la pérdida de un grupo benzoato de PtBz^+ , respectivamente (Figura 7.6). En

conjunto, estos hallazgos sugieren que la mayor parte de PtBz podría alcanzar el tejido tumoral, a pesar de su deficiente perfil de solubilidad acuosa.

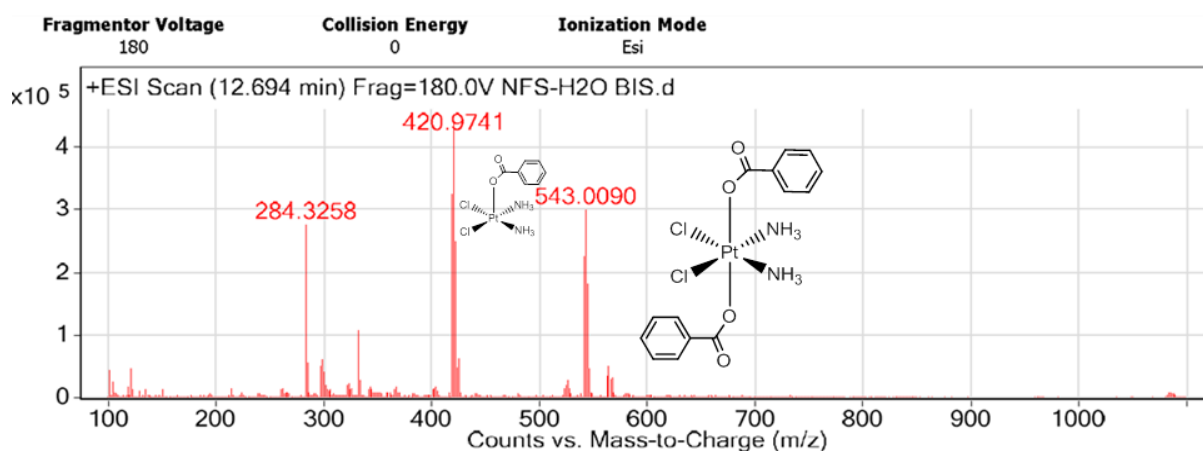


Figura 7.6. Estudio de HPLC-MS de descarga en agua después de 10 días de PtBz-SFNs a 37 °C.

7.2.2 Internalización celular

Como ensayo previo al estudio de citotoxicidad, las células endoteliales humanas EA.hy926 se incubaron durante 3 h mediante SFNs marcados con isotiocianato de fluoresceína (FITC) y posteriormente se estudiaron mediante fluorescencia de microscopía óptica. La penetración celular de las nanopartículas marcadas puede monitorearse fácilmente por su intensa fluorescencia. Estas imágenes (Figura 7.7) mostraron una significativa internalización celular de FITC-SFNs.

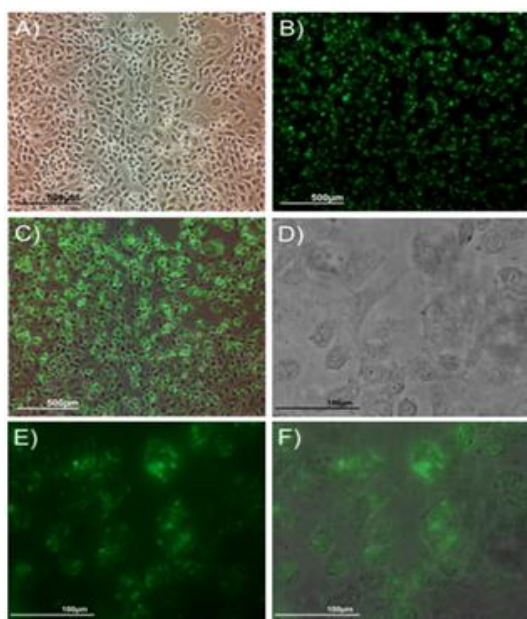


Figura 7.7. Internalización en células endoteliales (EA.hy926) de nanopartículas de seda marcadas con FITC tras una incubación durante 2 h a 37 °C. A) Campo brillante; (B) Fluorescencia y (C) Superposición de A y B; D) Contraste de fase; E) Fluorescencia y F) Composición de D y E. Figuras A, B y C (4x), barra de escala, 500 μm. Figuras D, E y F (40x), barra de escala, 100 μm.

7.2.3. Actividad antitumoral

Se evaluó la citotoxicidad de PtBz-SFNs (Tabla 7.2) frente a un panel de líneas celulares de cáncer humano representativas de las células A2780 y A2780cis del carcinoma epitelial de ovario (resistencia adquirida al cisplatino) y varias células de cáncer de mama: SK-BR-3 (HER2+), MCF-7 (ER+, PR+) y la triple-negativa MDA-MB-231 (ER-, PR, no sobreexpresión HER2), para las que el cisplatino no es muy activo. Las PtBz-SFNs desencadenan fuertes efectos citotóxicos, es decir, los valores de IC₅₀ se encuentran en el rango de nanomolar para todas las líneas de células tumorales ensayadas, siendo mucho más activas que el cisplatino en todas ellas: más de 20 veces en A2780 y más de 70 veces en MCF-7. Los SFN libres de platino no fueron citotóxicos en las líneas A2780 y MCF-7 después de 72 h. Estos resultados sugieren que PtBz-SFNs son capaces de superar los mecanismos de resistencia de ovario y la mayoría de las células de cáncer de mama, incluyendo las células triple negativas MDA-MB-231. Además, la citotoxicidad de PtBz-SFN hacia las células renales no tumorigénicas LLC-PK1 es similar a la del cisplatino y menor que la de PtBz. Los factores de selectividad celular (SF = relación de IC₅₀ para LLC-PK1/IC₅₀ para células A2780) para los PtBz-SFNs (SF = 46,7) son mayores que los de CDDP (SF = 2,0).

Tabla 7.2. Valores de IC₅₀ (μM) después de 72 h de incubación con CDDP, PtBz y PtBz-SFNs preparados usando 5 mg/mL de PtBz.

Línea celular	CDDP	PtBz	PtBz-SFNs
A2780	2,06 ± 0,30	0,031 ± 0,020	0,09 ± 0,01
A2780cis	7,60 ± 0,22	0,34 ± 0,00	0,78 ± 0,24
MCF-7	22,70 ± 1,11	0,86 ± 0,04	0,31 ± 0,02
MDA-MB-231	>25	0,59 ± 0,01	0,39 ± 0,15
SK-BR-3	7,20 ± 0,19	0,17 ± 0,01	0,34 ± 0,03
LLC-PK1	4,12 ± 0,13	1,62 ± 0,03	4,20 ± 0,22

7.2.4. Localización celular

Si la deposición de PtBz-SFNs en células cancerosas se localiza en los organelos celulares, sería probable observar el platino mediante el uso de TEM. Con esta finalidad, las células A2780 se expusieron a 1 μM de SFN o PtBz-SFN durante 24 h, y se trataron en resina epoxi. Se observaron secciones ultrafinas mediante TEM (Figura 7.8). Cualquier contraste adicional observado entre las células de control y las células tratadas se debe a la captación celular de SFNs o de PtBz-SFNs.

Las secciones de las células tratadas con 1 μM de PtBz-SFNs muestran más contraste en comparación con las de las células de control en el nucleolo y en la membrana nuclear interna (Figura 7.8E). Varias células mostraron los cambios morfológicos asociados con apoptosis (Figuras 7.8E y 7.8F).

7.2.5. Detención del ciclo celular

Para entender el efecto de PtBz-SFNs en el crecimiento celular se examinó su efecto sobre el ciclo celular por citometría de flujo. El tratamiento de las líneas celulares A2780 y A2780cis con 0,5 μM de PtBz-SFN (aproximadamente el valor IC_{50} para las NPs respecto a las células A2780) durante 24 h (Figura 7.9) mostró un aumento significativo de estas células en las fases S y G_2 , con una reducción correspondiente en G_0/G_1 , como se observa también con el cisplatino. En este caso, apareció una población de células tetraploides (Figura 7.9B).

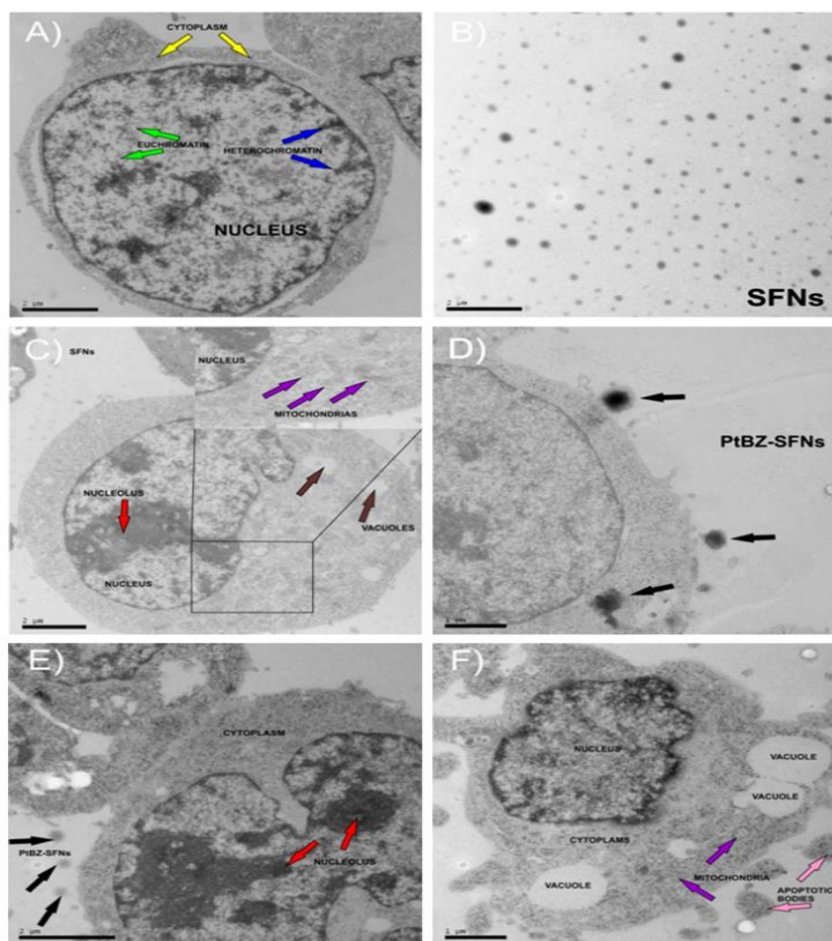


Figura 7.8. Imágenes de células A2780 después de 24 h de exposición a: C) y D) 10 μM de SFNs; E) y F) 10 μM de PtBz-SFNs; En E) se observa una apoptosis temprana; En F) se observa apoptosis tardía; La inserción en (C) muestra ampliaciones. Un control; B) SFNs en el espacio intercelular. Flechas amarillas = citoplasma. Flechas verdes = eucromatina. Flechas azules = heterocromatina. Flechas rojas = nucléolo. Flechas marrones = vacuolas. Flechas negras= Nanopartículas de fibroína de seda. Flechas violetas= mitocondrias.

También se realizó el análisis del ciclo celular de las células cancerosas MCF-7, MDA-MB-231 y SK-BR-3 (Figura 7.10). Además, se realizaron estudios apoptóticos con todas las líneas celulares. La exposición de la fosfatidilserina (PS) fue seguida por un ensayo de citometría de flujo con el kit de detección de apoptosis de anexina V-FLUOS (Roche). Se aplicó yoduro de propidio para la detección de las células necróticas o apoptóticas tardías. La intensidad de fluorescencia se midió para cada célula mediante citometría de flujo. Como puede verse (Figura 7.11) PtBz-SFNs induce apoptosis en en células tumorales de cáncer de mama MCF-7, SK-BR-3 y MDA-MB-231. Se observaron resultados similares en el resto de células ensayadas de cáncer de ovario A2780 y A2780cis (Figura 7.12)

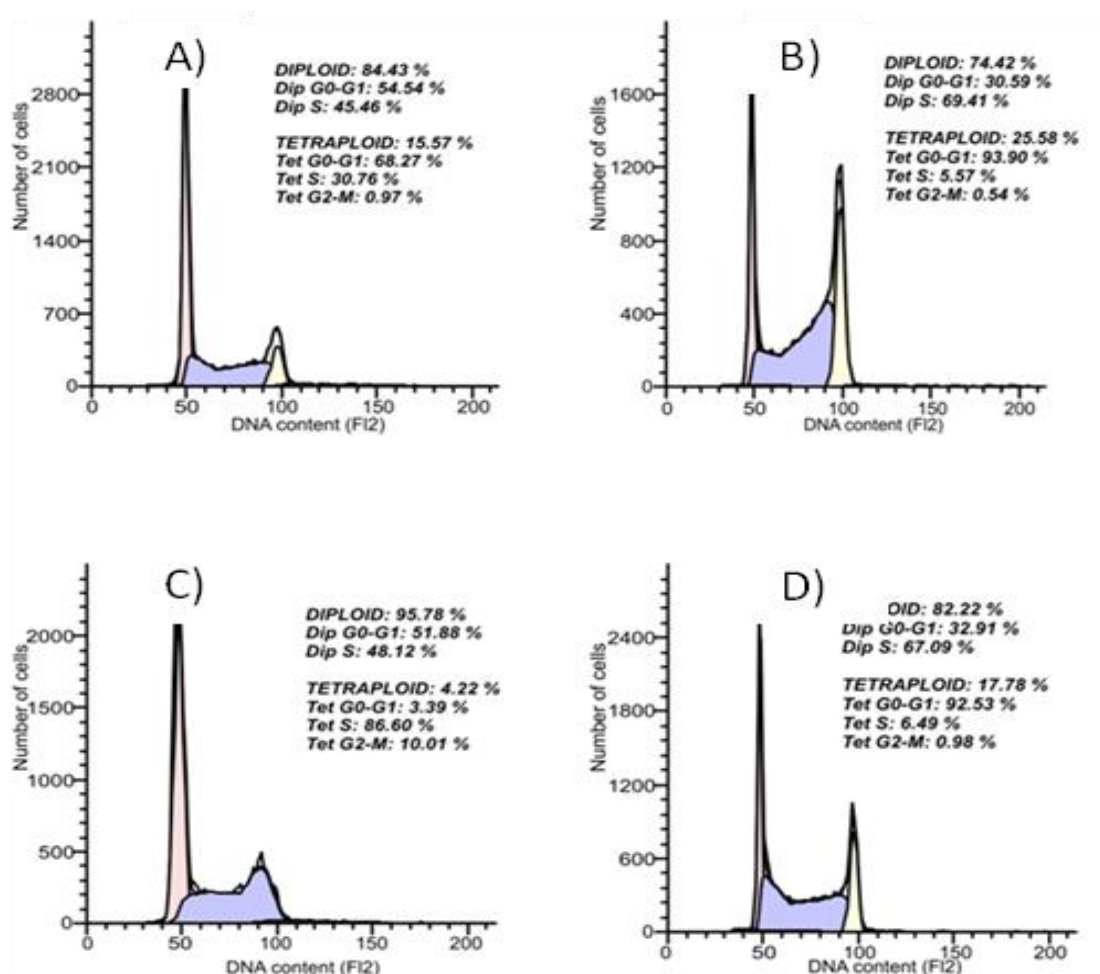


Figura 7.9. Análisis del ciclo celular de células de cáncer de ovario humano A2780 y A2780cis después de 24 h a 37 °C. A) y C) Histogramas correspondientes a los controles negativos: células no tratadas (A2780 y A2780cis, respectivamente). B) y D) Histogramas de las células expuestas a PtBz-SFN, la concentración utilizada fue de 0,5 μ M.

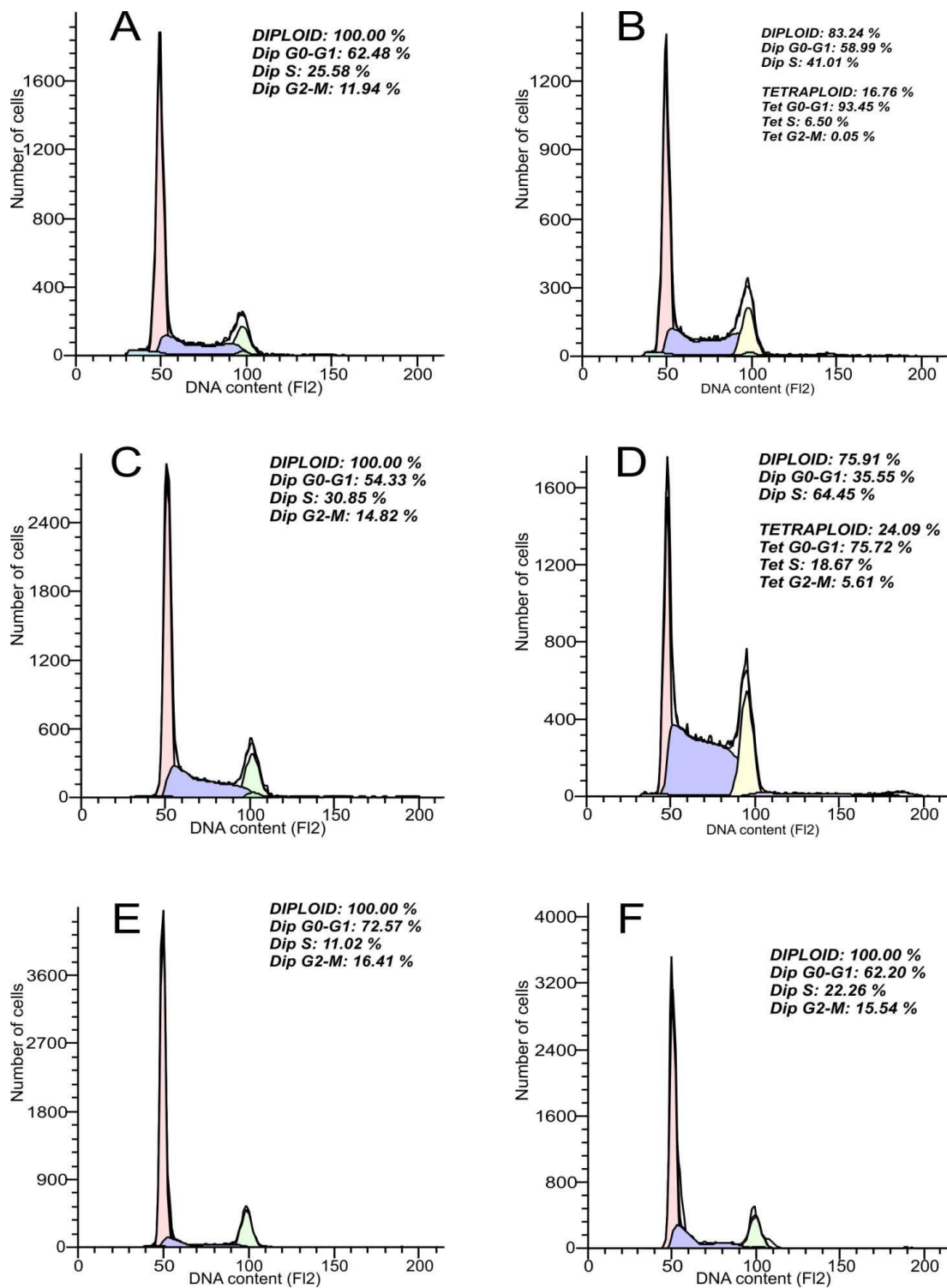


Figura 7.10. Analisis del ciclo celular de células MCF-7, MDA-MB-231 and SK-BR-3 de cáncer de mama después de 24 h a 37 °C. Los histogramas A), C) y E) son células sin tratar (control). MCF-7, MDA-MB-231 and SK-BR-3, son respectivamente: B), D) y F) son células expuestas a PtBz-SFNs a una concentración de 0,5 µM.

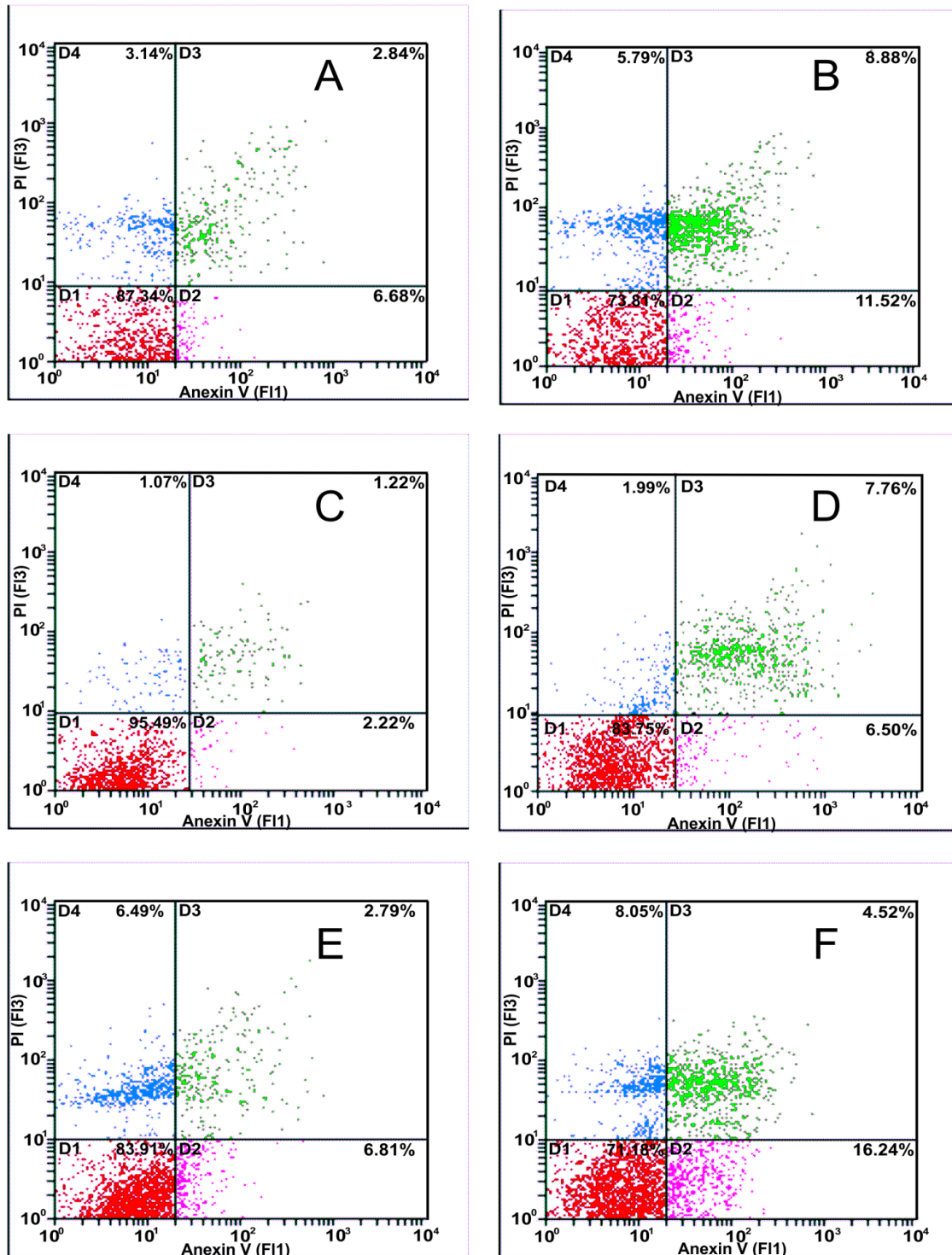


Figura 7.11. Análisis de apoptosis por citometría de flujo de células de cáncer de mama MCF-7, MDA-MB-231 y SK-BR-3 tratadas con PtBz-SFNs a una concentración de 1 μ M (24 h). MCF-7 (A), MDA-MB-231 (C) y SK-BR-3 (E) son células control y MCF-7 (B), MDA-MB-231 (D) y SK-BR-3 (F) son células tratadas con PtBz-SFNs.

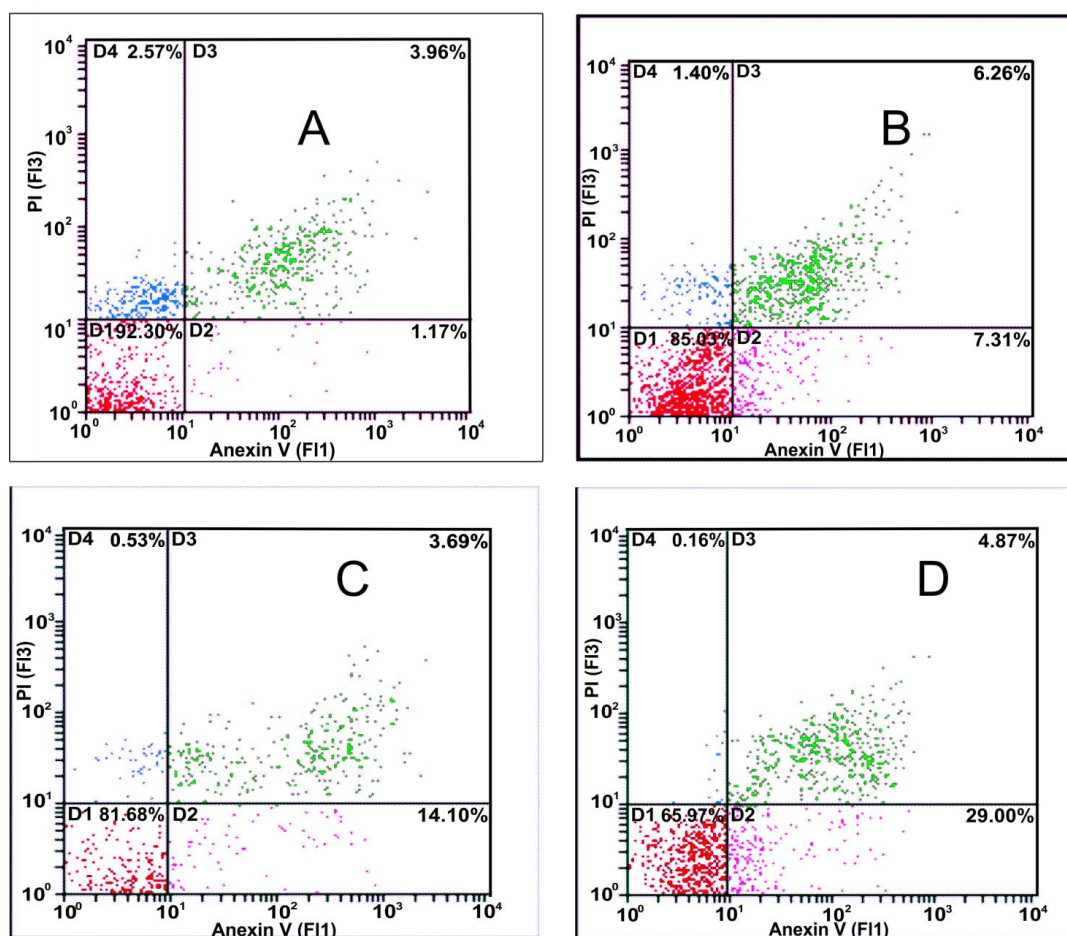


Figura 7.12. Análisis de apoptosis por citometría de flujo de células de cáncer de ovario humano sensible A2780 y resistente A2780cis después del tratamiento con PtBz-SFNs. Gráficos de densidad para células no tratadas A2780 (A, control) y A2780cis (C, control) y para células A2780 (B) y A2780cis (D) tratadas con PtBz-SFN a 1 μ M (24 h).

7.3. Conclusiones

En resumen, hemos generado con éxito SNF cargadas con un profármaco de platino(IV) hidrofóbico, PtBz. Sólo una pequeña fracción de PtBz cargada se libera (menos del 10% después de 48 h). Los PtBz-SFN son muy citotóxicos (valores de IC₅₀ nanomolar) frente a las líneas celulares ováricas A2780 y A2780cis, y varias líneas celulares tumorales SK-BR-3, MCF-7 y MDA-MB-231, superando la resistencia a cisplatino. Curiosamente, PtBz-SFNs no son muy activas contra las líneas celulares renales no tumorigénicas LLC-PK1. Los factores de selectividad celular (SF = relación de IC₅₀ para LLC-PK1/IC₅₀ para células A2780) para los PtBz-SFN (SF = 46,7) son mayores que los de CDDP (SF = 2,0). Por lo tanto, la carga en los SFN puede mejorar la liberación de PtBz poco soluble y reducir su toxicidad hacia células no tumorigénicas. Las imágenes por microscopía electrónica de transmisión (TEM) mostraron alta densidad de electrones en el núcleo de las células A2780. Los PtBz-SFNs causan la detención del ciclo celular en las fases S y G₂ e inducen apoptosis tardía.

7.4. Bibliografía

1. Fuertes, M. A.; Alonso, C.; Perez, J. M. "Biochemical modulation of Cisplatin mechanisms of action: enhancement of antitumor activity and circumvention of drug resistance", **2003**, Chem Rev, (103), 645-662.
2. Wang, D.; Lippard, S. J. "Cellular processing of platinum anticancer drugs", **2005**, Nat Rev Drug Discov, (4), 307-320.
3. Min, Y.; Mao, C. Q.; Chen, S.; Ma, G.; Wang, J.; Liu, Y. "Combating the drug resistance of cisplatin using a platinum prodrug based delivery system", **2012**, Angew Chem Int Ed Engl, (51), 6742-6747.
4. Kelland, L. "The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy", **2007**, Nat Rev Cancer, (7), 573-584.
5. Hall, M. D.; Mellor, H. R.; Callaghan, R.; Hambley, T. W. "Basis for design and development of platinum(IV) anticancer complexes", **2007**, J Med Chem, (50), 3403-3411.
6. Graf, N.; Lippard, S. J. "Redox activation of metal-based prodrugs as a strategy for drug delivery", **2012**, Adv Drug Deliv Rev, (64), 993-1004.
7. Jain, R. K.; Stylianopoulos, T. "Delivering nanomedicine to solid tumors", **2010**, Nat Rev Clin Oncol, (7), 653-664.
8. Maldonado, C. R.; Salassa, L.; Gomez-Blanco, N.; Mareque-Rivas, J. C. "Nano-functionalization of metal complexes for molecular imaging and anticancer therapy", **2013**, Coord Chem Rev, (257), 2668-2688.
9. Peer, D.; Karp, J. M.; Hong, S.; Farokhzad, O. C.; Margalit, R.; Langer, R. "Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy", **2007**, Nat Nanotechnol, (2), 751-760.
10. Cabral, H.; Nishiyama, N.; Kataoka, K. "Supramolecular nanodevices: from design validation to theranostic nanomedicine", **2011**, Acc Chem Res, (44), 999-1008.
11. Ozgur, A.; Lambrecht, F. Y.; Ocakoglu, K.; Gunduz, C.; Yucebas, M. "Synthesis and biological evaluation of radiolabeled photosensitizer linked bovine serum albumin nanoparticles as a tumor imaging agent", **2012**, Int J Pharm, (422), 472-478.
12. Kamaly, N.; Xiao, Z.; Valencia, P. M.; Radovic-Moreno, A. F.; Farokhzad, O. C. "Targeted polymeric therapeutic nanoparticles: design, development and clinical translation", **2012**, Chem Soc Rev, (41), 2971-3010.
13. Rocca, J. D.; Liu, D.; Lin, W. "Nanoscale Metal–Organic Frameworks for Biomedical Imaging and Drug Delivery", **2011**, Acc Chem Res, (44), 957-968.
14. Prabhakar, U.; Maeda, H.; Jain, R. K.; Sevick-Muraca, E. M.; Zamboni, W.; Farokhzad, O. C.; Barry, S. T.; Gabizon, A.; Grodzinski, P.; Blakey, D. C. "Challenges and Key Considerations of the Enhanced Permeability and Retention Effect for Nanomedicine Drug Delivery in Oncology", **2013**, Cancer Research, (73), 2412-2417.
15. Ang, W. H.; Khalaila, I.; Allardyce, C. S.; Juillerat-Jeanneret, L.; Dyson, P. J. "Rational design of platinum(IV) compounds to overcome glutathione-S-transferase mediated drug resistance", **2005**, J Am Chem Soc, (127), 1382-1383.
16. Dhar, S.; Lippard, S. J. "Mitaplatin, a potent fusion of cisplatin and the orphan drug dichloroacetate", **2009**, Proc Nat Acad Sci, (106), 22199-22204.
17. Dhar, S.; Gu, F. X.; Langer, R.; Farokhzad, O. C.; Lippard, S. J. "Targeted delivery of cisplatin to prostate cancer cells by aptamer functionalized Pt(IV) prodrug-PLGA-PEG nanoparticles", **2008**, Proc Natl Acad Sci U S A, (105), 17356-17361.

18. Kolishetti, N.; Dhar, S.; Valencia, P. M.; Lin, L. Q.; Karnik, R.; Lippard, S. J.; Langer, R.; Farokhzad, O. C. "Engineering of self-assembled nanoparticle platform for precisely controlled combination drug therapy", **2010**, Proc Natl Acad Sci U S A, (107), 17939-17944.
19. Dhar, S.; Kolishetti, N.; Lippard, S. J.; Farokhzad, O. C. "Targeted delivery of a cisplatin prodrug for safer and more effective prostate cancer therapy in vivo", **2011**, Proc Natl Acad Sci U S A, (108), 1850-1855.
20. Graf, N.; Bielenberg, D. R.; Kolishetti, N.; Muus, C.; Banyard, J.; Farokhzad, O. C.; Lippard, S. J. "alpha(V)beta(3) integrin-targeted PLGA-PEG nanoparticles for enhanced anti-tumor efficacy of a Pt(IV) prodrug", **2012**, ACS Nano, (6), 4530-4539.
21. Vepari, C.; Kaplan, D. L. "Silk as a Biomaterial", **2007**, Prog Polym Sci, (32), 991-1007.
22. Lu, Q.; Wang, X.; Zhu, H.; Kaplan, D. L. "Surface Immobilization of antibody on silk fibroin through conformational transition", **2011**, Acta biomaterialia, (7), 2782-2786.
23. Chen, M.; Shao, Z.; Chen, X. "Paclitaxel-loaded silk fibroin nanospheres", **2012**, J Biomed Mater Res A, (100), 203-210.
24. Lammel, A.; Hu, X.; Park, S.-H.; Kaplan, D. L.; Scheibel, T. "Controlling silk fibroin particle features for drug delivery", **2010**, Biomaterials, (31), 4583-4591.
25. Omenetto, F. G.; Kaplan, D. L. "New opportunities for an ancient material", **2010**, Science, (329), 528-531.
26. Subia, B.; Kundu, S. C. "Drug loading and release on tumor cells using silk fibroin-albumin nanoparticles as carriers", **2013**, Nanotechnology, (24), 035103.
27. Pritchard, E. M.; Valentin, T.; Boison, D.; Kaplan, D. L. "Incorporation of proteinase inhibitors into silk-based delivery devices for enhanced control of degradation and drug release", **2011**, Biomaterials, (32), 909-918.
28. Subia, B.; Chandra, S.; Talukdar, S.; Kundu, S. C. "Folate conjugated silk fibroin nanocarriers for targeted drug delivery", **2014**, Integrative Biology, (6), 203-214.
29. Matsumoto, A.; Chen, J.; Collette, A. L.; Kim, U. J.; Altman, G. H.; Cebe, P.; Kaplan, D. L. "Mechanisms of silk fibroin sol-gel transitions", **2006**, J Phys Chem B, (110), 21630-21638.
30. Kundu, B.; Kurland, N. E.; Bano, S.; Patra, C.; Engel, F. B.; Yadavalli, V. K.; Kundu, S. C. "Silk proteins for biomedical applications: Bioengineering perspectives", **2014**, Prog Polym Sci, (39), 251-267.
31. Shi, P.; Teh, T. K. H.; Toh, S. L.; Goh, J. C. H. "Variation of the effect of calcium phosphate enhancement of implanted silk fibroin ligament bone integration", **2013**, Biomaterials, (34), 5947-5957.
32. Zhang, W.; Chen, J.; Tao, J.; Hu, C.; Chen, L.; Zhao, H.; Xu, G.; Heng, B. C.; Ouyang, H. W. "The promotion of osteochondral repair by combined intra-articular injection of parathyroid hormone-related protein and implantation of a bi-layer collagen-silk scaffold", **2013**, Biomaterials, (34), 6046-6057.
33. Seib, F. P.; Jones, G. T.; Rnjak-Kovacina, J.; Lin, Y.; Kaplan, D. L. "pH-dependent anticancer drug release from silk nanoparticles", **2013**, Adv Healthc Mater, (2), 1606-1611.
34. Qu, J.; Liu, Y.; Yu, Y.; Li, J.; Luo, J.; Li, M. "Silk fibroin nanoparticles prepared by electrospray as controlled release carriers of cisplatin", **2014**, Mater Sci Eng C Mater Biol Appl, (44), 166-174.
35. Brandon, R. J.; Dabrowiak, J. C. "Synthesis, characterization, and properties, of a group of platinum(IV) complexes", **1984**, J Med Chem, (27), 861-865.
36. Mathur, A. B.; Gupta, V. "Silk fibroin-derived nanoparticles for biomedical applications", **2010**, Nanomedicine (Lond), (5), 807-820.

Capítulo 8

Conclusiones



Se ha investigado la actividad biológica de complejos de coordinación de cuatro elementos diferentes, oro, rutenio, iridio y platino, con nueve tipos distintos de ligandos sobre un conjunto muy amplio de líneas celulares cancerígenas y también, en menor medida, sobre líneas celulares sanas. En un caso particular, para un compuesto de platino, se estudió, asimismo, el efecto citotóxico de nanopartículas de seda cargadas con dicho fármaco.

Para cada clase de compuestos se determinó, primordialmente, la correlación existente entre la modificación sistemática de su estructura y el efecto sobre las líneas celulares, a tres niveles: la actividad citotóxica global, los mecanismos que producían dicha actividad y la localización celular de los compuestos.

En el caso de los compuestos de oro(I) con ligandos derivados de la metiltiourea se estudió la actividad anticancerígena respecto a tres líneas celulares de cáncer de mama representativas y cáncer de ovario. Su actividad citotóxica para estas últimas células era submicromolar. Los compuestos mostraron propiedades antiangiogénicas y antimigratorias, y generaban apoptosis mediante la activación de la caspasa-3. Las microscopías confocal de fluorescencia y la de transmisión electrónica mostraron inequívocamente una acumulación de estos compuestos mayoritaria en el núcleo celular, al contrario que la mayoría de compuestos de oro(I) estudiados hasta la fecha, cuya diana preferente es la mitocondria.

Se estudió el modo de acción biológica de una batería de complejos semi-sándwich de Ru(II) e Ir(III) basados en ligandos C^N tipo 2-fenilbenzimidazol. Se determinó específicamente el efecto de los sustituyentes respecto a la capacidad citotóxica. Todos los compuestos resultaron ser más citotóxicos que el CDDP respecto a las líneas de cáncer estudiadas, en particular aquellos que tenían presente un grupo fenilo adicional. Por otra parte, se encontró que los compuestos de Ru(II) eran más activos que los de Ir(III). Todos los compuestos generaban apoptosis incrementando la actividad de caspasa-3 y la producción de especies de oxígeno reactivas. Presentaban, asimismo, propiedades antiangiogénicas.

Se estudió en detalle la distribución celular de uno de estos compuestos semi-sándwich, concretamente el de Ru(II) denominado GY34. Se ideó un nuevo proceso de fraccionamiento que permitía obtener los orgánulos celulares con un alto grado de pureza y, en consecuencia, determinar con precisión la cantidad de complejo acumulado en cada uno de ellos.

Los compuestos luminiscentes de Ir(III) bis-C^N-ciclometalados presentaron una alta citotoxicidad frente a células cancerígenas y, simultáneamente, bajo poder citotóxico frente a las células no tumorigénicas BGM. Este tipo de compuestos se localizaron, fundamentalmente, en la corteza de actina, según lo observado mediante microscopía confocal.

Se investigó la citotoxicidad y el modo de acción de tres conjuntos diferentes de compuestos de platino no convencionales con ligandos ciclometalados basados en arilmetanaminas. El primer tipo de compuestos presentaba dimetilbencilamina (y ligandos quelato similares), junto a un ligando monodentado DMSO o un derivado de la trifenilfosfina. Algunos de los compuestos con el ligando DMSO se mostraron altamente citotóxicos, con valores de IC_{50} submicromolares frente a la línea celular A2780. Estos compuestos mostraron también una capacidad antiangiogénica notable, siempre a concentraciones inferiores a sus respectivos valores de IC_{50} en la línea celular endotelial. La microscopía electrónica de transmisión mostró inequívocamente la acumulación de los compuestos en el ADN nuclear.

En la segunda clase de los compuestos de platino(II) estudiados se modificó la unidad aromática del ligando C^N quelato, incrementándose gradualmente la hidrofobicidad del compuesto en su conjunto. Si bien en una serie de los compuestos sí se observó una relación entre mayor hidrofobicidad y mayor acumulación celular, este comportamiento no fue general. Los compuestos caracterizados eran también antiangiogénicos y, curiosamente inhibían la polimerización de la tubulina, de forma que degeneraban el citoesqueleto. En este caso se comprobó, *in vivo*, el efecto antiangiogénico utilizando un ensayo sobre la membrana corioalantoidea del embrión de pollo.

En el tercer conjunto, el platino(II) se coordinaba a N,N-dimetilbenzilamina como esqueleto C^N y a heterociclos bidentados diiminas N^N con ligandos que contenían de 2 a 6 anillos aromáticos. Estos complejos se localizaron casi exclusivamente en el núcleo celular y mostraron también un alto poder citotóxico. Cabe resaltar sus mejores valores tanto de resistencia como de selectividad de todos ellos respecto al cisplatino.

Finalmente, se ha estudiado la actividad biológica de nanopartículas de fibroína de seda portadoras de un profármaco de platino(IV). Las nanopartículas cargadas con dicho profármaco son extremadamente citotóxicas, con valores de IC_{50} en el rango de nanomolar frente a A2780 y submicromolar frente a todas las restantes líneas celulares tumorales estudiadas. Al mismo tiempo, la citotoxicidad no era tan alta frente a la línea celular renal no tumorigénica LLC-PK1. Una vez liberado el profármaco, se observó que el platino, acumulado en el núcleo, detenía el ciclo celular en las fases S y G₂ e inducía apoptosis tardía.

Financiación

Esta Tesis Doctoral no habría sido posible sin la financiación de las Entidades que a continuación se citan.

MINISTERIO DE CIENCIA E INNOVACION

Proyecto número: SAF2011-26611

Título del Proyecto: "Diseño y acción de metalofármacos antitumorales no convencionales con portadores biológicos y moleculares"

MINISTERIO DE CIENCIA E INNOVACION

Proyecto número: CTQ2015-64319-R)

Título del proyecto: "Metalofármacos para el tratamiento del cáncer y estrategias para su vehiculización celular"

FUNDACION SÉNECA

Proyecto número: 15354/PI/10

Título del proyecto: "Interacción de complejos metálicos anticancerígenos con proteínas mediante resonancia magnética nuclear"

COST ACTION CM1105.

Functional metal complexes that bind to biomolecules

METDRUGS NETWORK

Proyecto número: CTQ2015-70371-REDT

Título del Proyecto: Metals in Therapy and Diagnosis

