



Trabajo Fin de Grado

“Estudio de las propiedades anticancerígenas de complejos metálicos de oro con ligandos ditiocarbamato”

Autor:

Luis Javier Quero Bellido

Directoras:

Elena Cerrada Lamuela
M^a Jesús Rodríguez Yoldi



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza

Junio 2016

ELENA CERRADA LAMUELA Profesora Titular del departamento de
Química Inorgánica de la Universidad de Zaragoza

M^a JESÚS RODRÍGUEZ YOLDI Profesora Titular del departamento
de
Farmacología y Fisiología de la Universidad de Zaragoza

CERTIFICAN

Que el trabajo que se presenta bajo el título “Estudios de las propiedades anticancerígenas de complejos metálicos de oro con ligandos ditiocarbamato” ha sido realizado en el departamento de Química Inorgánica de la Facultad de Ciencias y en el departamento de Farmacología y Fisiología de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza, bajo nuestra dirección, autorizando su presentación.

Zaragoza, 23 Junio 2016



Fdo.: Dra. Elena Cerrada Lamuela



Fdo.: Dra. M^a Jesús Rodríguez Yoldi

ÍNDICE

Resumen/Abstract	1
1. Introducción	2
2. Objetivos	5
3. Materiales y métodos	6
3.1. Preparación de las disoluciones madre	6
3.2. Cultivo celular	6
3.3. Ensayo de viabilidad celular	7
3.4. Interacción con BSA	7
3.5. Interacción con DNA	8
3.6. Determinación del nivel de especies reactivas de oxígeno	8
3.7. Evaluación <i>in vivo</i> de la actividad enzimática de la tiorredoxina reductasa	9
3.8. Estudios de apoptosis	9
3.9. Estudios de ciclo celular	9
3.10. Evaluación del potencial mitocondrial	9
4. Resultados y discusión	10
4.1. Ensayos de viabilidad celular (MTT)	10
4.2. Interacción con BSA	11
4.3. Interacción con DNA	15
4.4. Determinación del nivel de especies reactivas de oxígenos (ROS)	16
4.5. Interacción con la enzima tiorredoxina reductasa (TrxR)	16
4.6. Estudios de apoptosis	17
4.7. Estudios de ciclo celular	18
4.8. Evaluación del potencial mitocondrial	19
4.9. Estudios de necroptosis	20
5. Conclusiones/Conclusions	21
6. Referencias	22

RESUMEN

El cáncer es en la actualidad uno de los trastornos más investigados debido a su alta incidencia y al desconocimiento que todavía existe acerca de su aparición y desarrollo. Dentro de los distintos tipos de tumores que el organismo humano puede desarrollar, el tercero con mayor incidencia a nivel mundial es el cáncer de colon.

Los efectos secundarios que el uso de los tratamientos convencionales, la radioterapia y la quimioterapia, acarrea en el paciente, junto a su escasa efectividad, propicia la búsqueda de nuevos tratamientos.

En esta línea aparecieron los complejos metálicos, entre los que se encuentran los complejos de oro(I) y de oro(III). En el presente trabajo se ensayó el efecto de cuatro complejos de oro(III) sobre la línea celular Caco-2/TC7 (células de carcinoma de colon humano) para determinar tanto su actividad citotóxica como las posibles dianas y vías de actuación.

Se ha visto que todos los complejos estudiados son capaces de inducir la muerte celular en células anticancerígenas, aunque el **complejo 4** carece de selectividad y también afecta a los enterocitos normales. La inducción de la necroptosis mediante la activación de proteínas como la quinasa RIP1, parece ser la causa del efecto citotóxico de estos complejos de oro(III). Por último, la enzima tiorredoxina reductasa se presenta como una de las dianas del **complejo 2**, que rompería la homeostasis redox en las células, aumentando los niveles de ROS y favoreciendo la muerte celular.

ABSTRACT

Nowadays, cancer is one of the most investigated disorders due to its high incidence and the ignorance that still remains about its occurrence. In particular, colorectal cancer is the third most common cancer in the world and one of the leading causes of cancer mortality worldwide.

The standard treatment for most types of cancer currently compromises radiotherapy and chemotherapy. However, the adverse reactions caused by this traditional treatment, together with its low efficacy, set the basis for the search of new treatments.

In an attempt to overcome these drawbacks, new metal complexes appeared and started to be used in chemotherapy. Among these complexes, we can find gold(I) and gold(III) derivatives. In the present work, four different gold (III) complexes were tested in Caco-2/TC7 cells (human colon carcinoma cell line) in order to evaluate their cytotoxic effect, as well as their most likely targets and mechanism of action.

As a result, I have found that every tested complexes can induce cancer cells death, although complex 4 also presented significant effect on non-carcinogenic cells. Activation of RIP1 kinase by these gold(III) complexes seems to be the cause of cytotoxic effect, promoting necroptosis. Finally, the enzyme thioredoxin reductase is reported to be one of the targets of complex 2. Interaction of complex 2 with the enzyme would disrupt redox homeostasis in cells, leading to an increase in ROS levels and, consequently, death.

1. INTRODUCCIÓN

El cáncer es un trastorno que clínicamente se define como el resultado de dos procesos. El primero de ellos es la división incontrolada de las células, que van perdiendo su morfología normal, dando lugar a un tumor. El segundo de los procesos es la adquisición de la capacidad de invadir otros tejidos, es decir, de producir metástasis.

Existen diferentes tipos de cáncer, ya que estos pueden aparecer en la práctica totalidad de los tejidos y órganos, aunque son las células epiteliales las más susceptibles de sufrir estas transformaciones. El cáncer de colon es un adenocarcinoma propio de las células epiteliales, más concretamente de la mucosa, del intestino grueso¹.

Las causas por las cuales se origina el cáncer aún son en gran medida desconocidas. Existen una gran cantidad de factores de riesgo, desde el estilo de vida (tabaquismo, dieta o exposición a radiaciones) hasta los virus, pasando por el historial familiar, que pueden aumentar la posibilidad de desarrollar la enfermedad.

Las bases moleculares del cáncer son alteraciones a nivel genético. Concretamente, mutaciones en los oncogenes, genes implicados en la división celular. Se diferencian dos tipos de oncogenes, por un lado, aquellos que controlan vías proliferativas y de diferenciación celular, y cuya sobreexpresión dará lugar a tumores por una continua entrada en ciclo y el crecimiento descontrolado de las células. Por otro lado, encontramos los genes supresores de tumores que tienen un efecto contrario, promoviendo apoptosis, entrada en fase G0 y evitando la replicación de material genético dañado y cuya expresión se verá disminuida en los tejidos cancerosos.

Sin embargo, los importantes avances en la biología y genética del cáncer contrastan con la escasa revolución terapéutica en oncología. El cáncer sigue siendo una de las principales causas de mortalidad a nivel mundial debido a una elevada incidencia y a la inexistencia de un tratamiento eficaz.

En el caso del cáncer de colon (cáncer en el que hemos centrado el presente trabajo), como en la mayoría de los tumores en estados poco avanzados y de fácil acceso, la cirugía es el principal tratamiento. Sin embargo, cuando el cáncer ya ha evolucionado a etapas más avanzadas, la radioterapia y la quimioterapia son las armas principales para combatir la enfermedad².

La mayoría de los agentes empleados en quimioterapia son moléculas orgánicas, sin embargo, tras el descubrimiento accidental del comportamiento anticancerígeno de un complejo metálico de platino (*cis*-[PtCl₂(NH₃)₂]), más conocido como *cisplatino* en la década de los años 60, se han multiplicado el número de compuestos metálicos empleados en una variedad de tipos de cáncer³. La actividad del *cisplatino* se debe principalmente a su actuación como inhibidor del crecimiento celular al generar cambios conformacionales en la doble hélice del DNA que impiden la replicación⁴. A partir de su descubrimiento, más concretamente a principios del siglo XXI, el *cisplatino* ya era uno de los tres agentes quimioterapéuticos más utilizados para el tratamiento del cáncer⁴.

Sin embargo, el *cisplatino* presenta dos problemas importantes, como son la presencia de graves efectos secundarios tras su tratamiento y el desarrollo de algunas líneas de células de cáncer resistentes al mismo⁴. Los complejos también de platino desarrollados como segunda y

tercera generación de anticancerígenos basados en este metal: *carboplatino* (*cis*-diamino(ciclobutano-1,1-dicarboxilato-*O,O'*)platino(II)) y *oxaliplatino* (*cis*-[oxalato(*trans*-1-1,2-diaminociclohexano)platino(II)]) (*Figura 1*), surgieron con la idea de mejorar los efectos secundarios de cisplatino. En la actualidad es el derivado denominado como oxaliplatino el que se emplea en el tratamiento de primera línea contra el cáncer de colon metastásico en combinación con 5-fluorouracilo y leucovorina como coadyuvantes^{2,5}.

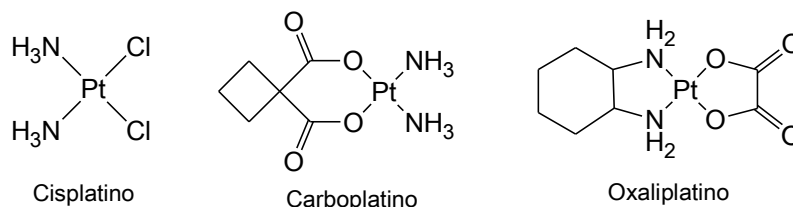


Figura 1. Algunos de los principales fármacos basados en platino empleados en quimioterapia.

A pesar del uso del oxaliplatino como agente quimioterápico, el cáncer de colon sigue siendo el tercero que más mortalidad causa en Estados Unidos y el cuarto a nivel mundial con 690.000 defunciones anuales^{2,6}. Por lo tanto, visto que la terapia con fármacos basados en platino tiene algunos efectos adversos, así como una eficacia relativa, en los últimos años se han intentado buscar nuevos complejos metálicos con menos efectos secundarios para el paciente. Dentro de estas posibles alternativas han ido surgiendo complejos de rutenio, rodio y oro, así como combinaciones de estos⁵.

En la antigüedad, el oro ya era considerado un fármaco con múltiples efectos beneficiosos sobre la salud. Por ejemplo, la cultura China usaba compuestos de oro en el siglo III para tratar desde convulsiones hasta infecciones de la piel⁷. Ya en el siglo XX, se empezó a utilizar el oro de una manera racional para tratar la tuberculosis cuando se descubrió que presentaba un efecto bacteriostático. Además, en los últimos 80 años, distintos complejos metálicos de oro han sido usados para tratar la artritis reumatoide, ya que se ha visto que los iones de oro podrían actuar sobre el sistema inmune reduciendo la inflamación y consecuentemente el dolor en las articulaciones⁷.

Por lo tanto, el efecto terapéutico que los iones de oro parecen tener sobre diversas enfermedades, junto con el efecto inhibitorio del crecimiento celular que presentan los compuestos de platino (con el que guarda semejanzas en lo que se refiere a comportamiento químico), hizo que se empezasen a desarrollar distintos complejos de oro (*Figura 2*) con un potencial efecto anticancerígeno⁸.

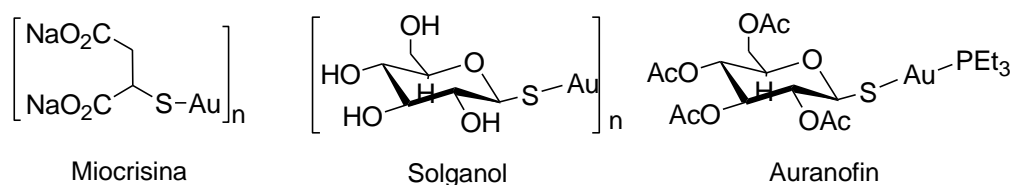


Figura 2. Primeros complejos de oro usados en crisoterapia, derivados con ligandos del tipo tiolato.

Se descubrió así, en los años 80, que el *auranofin* (1-tio-β-D-glucopiranos-2,3,4,6-tetraacetato-S-trietilfosfina oro(I)), uno de los derivados de oro(I) más estudiados, además de

poseer efectos antiartríticos⁷ presentaba unas propiedades anticancerígenas muy similares al *cisplatino*⁸. Sin embargo, su actividad antitumoral *in vivo* es muy limitada y solo presenta un efecto destacado en el caso de la leucemia P388⁹.

El oro se puede presentar en dos estados de oxidación distintos: Au(I) y Au(III). Aunque los complejos de oro(I) han sido los más estudiados a raíz del *auranofin*, el oro(III) suscita un gran interés debido a la analogía que existe entre estos complejos y los de platino(II), ya que ambos son isoelectrónicos (configuración electrónica d^8) e isoestructurales (geometría plano-cuadrada)¹⁰. Esto ha hecho que en los últimos años hayan ido surgiendo una enorme variedad de complejos de oro(III) con actividad anticancerígena^{8,10-12}.

A la hora de buscar posibles anticancerígenos basados en metales, es importante la elección de los ligandos que acompañan al metal, para por un lado dar estabilidad a la molécula, y por otro conseguir un balance entre el elevado efecto citotóxico y unos leves efectos secundarios. Por ejemplo, se han usado con frecuencia ligandos de tipo pirimidina o heterociclos con nitrógeno como la porfirina para la estabilización del átomo de oro mediante enlaces con el N¹¹⁻¹². También en los complejos de oro han sido muy usados ligandos de tipo ditiocarbamato (*Figura 3*) como agentes protectores frente a la nefrotoxicidad del *cisplatino*¹³.

Esta última singularidad, junto con la estabilidad que los enlaces Au-S ofrecen en condiciones fisiológicas⁸, ha propiciado su elección como ligandos de oro(III) para el desarrollo del trabajo fin de Grado.

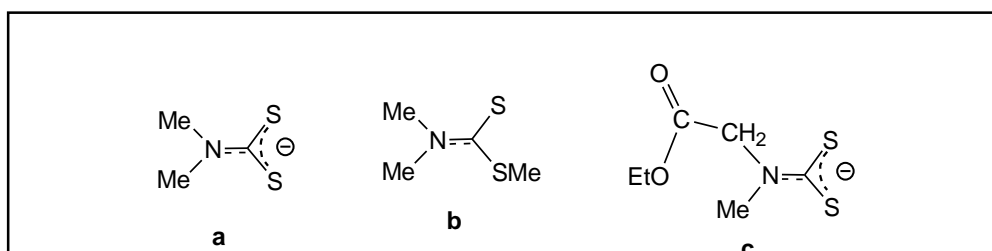


Figura 3. Ligandos del tipo ditiocarbamato: a) *N,N*-Dimetilcarbamato (DMDT); b) *S*-Metil-*N,N*-dimetilditiocarbamato (DMDTM); c) *Etil*sarcosinaditiocarbamato (ESDT)

Por lo tanto, en este estudio se van a llevar a cabo diferentes ensayos *in vitro* en los que se evaluará la citotoxicidad de cuatro complejos de oro(III), así como un estudio de algunas vías de posible actuación.

2. OBJETIVOS

Con todos estos antecedentes, y teniendo en cuenta que el número de complejos de oro(III) con propiedades anticancerígenas es mucho menor que el de complejos de oro(I) y su desconocimiento del mecanismo de actuación, en el presente trabajo se plantean dos objetivos principales:

-El estudio de la citotoxicidad de diferentes complejos metálicos de oro(III) con ligandos ditiocarbamato para así determinar sus propiedades anticancerígenas.

-El estudio de los posibles mecanismos de actuación de estos complejos metálicos.

Para el desarrollo de estos objetivos se han utilizado cuatro complejos de oro(III) (*Figura 4*), cuya actividad anticancerígena ha sido testada en células de cáncer de colon humano Caco-2/TC7. Esta línea celular presenta la particularidad de que al alcanzar un estado de confluencia pasan de ser células tumorales a células diferenciadas (enterocitos normales).

Los estudios que se han llevado a cabo para la consecución de los objetivos planteados son los siguientes:

- Estudios farmacodinámicos realizados mediante ensayos de viabilidad celular (MTT) tanto en células indiferenciadas como en células diferenciadas.

- Estudios de interacción con DNA, posible diana de los complejos, y con proteínas plasmáticas, concretamente con la albúmina sérica bovina (BSA).

- Estudios de daño oxidativo mediante la determinación de las especies reactivas de oxígeno, así como estudios de actividad enzimática de la tiorredoxina reductasa y del potencial mitocondrial (Ψ_m).

-Determinación de la vía de muerte celular mediante estudios de apoptosis y necroptosis.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Preparación de las disoluciones madre

Los complejos de oro(III) empleados en este trabajo son derivados de 3 ditiocarbamatos diferentes (S_2CNR_2 , con $\text{R} = \text{Me}$, Et , CH_2Ph) junto con ligandos tiolato (metilpirimidina tiolato y dimetilpirimidina tiolato) que proporcionan elevada estabilidad al complejo resultante. En la figura 4 se recogen las estructuras de los mismos, así como la numeración que seguiremos en la descripción de los resultados.

Se parte de los productos obtenidos directamente de la síntesis, es decir, de los complejos en forma sólida. Para poder realizar los diferentes ensayos, los complejos se deberán añadir en disolventes orgánicos, obteniendo una disolución de concentración conocida (disolución madre) de la que se partirá para elaborar todas las que se requieran posteriormente.

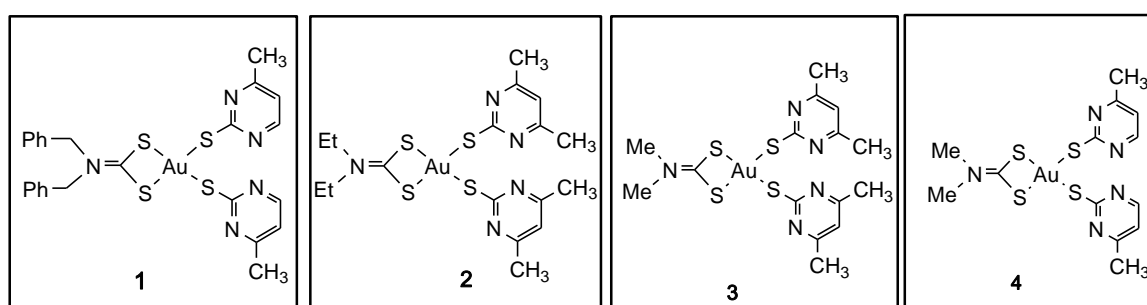


Figura 4. Complejos de oro (III) utilizados cuyo estudio se ha abordado en este trabajo.

1: $[\text{Au}(\text{SMePirimidina})_2(\text{S}_2\text{C}=\text{NBz}_2)]$. Disolución madre: 5mM (en DMSO). PM: 715,50 g/mol.

2: $[\text{Au}(\text{SMe}_2\text{Pirimidina})_2(\text{S}_2\text{C}=\text{NEt})]$. Disolución madre: 5mM (en DMSO). PM: 621,42 g/mol.

3: $[\text{Au}(\text{SMe}_2\text{Pirimidina})_2(\text{S}_2\text{C}=\text{NMe}_2)]$. Disolución madre: 9mM (en acetonitrilo, clorometano y acetona). PM: 595,38 g/mol.

4: $[\text{Au}(\text{SMePirimidina})_2(\text{S}_2\text{C}=\text{NMe}_2)]$. Disolución madre: 20mM (en DMSO). PM: 567,53 g/mol.

3.2. Cultivo celular

Se denomina cultivo celular al mantenimiento de células viables en un entorno controlado, con objeto de que conserven sus características biológicas propias de proliferación, diferenciación y envejecimiento. Se trata por lo tanto de una de las principales herramientas utilizadas en biotecnología, ya que proporcionan un modelo primario para el estudio de la biología de las células, permitiendo, por ejemplo, conocer su respuesta y comportamiento frente a determinados productos químicos.

Para este trabajo se han utilizado células Caco-2, una línea celular adherente procedente de carcinoma de colon humano. Esta línea presenta la peculiaridad de que, al alcanzar la confluencia a los 7 días de haber sido sembradas, las células sufren la diferenciación a enterocitos normales de manera espontánea. Además, la cepa utilizada, TC7, procede de pasajes tardíos (140-150), hecho que se refleja en su estabilidad y homogeneidad.

El cultivo se ha realizado en una estufa de incubación (Haeraeus BB16) a una temperatura de 37°C y con una atmósfera humidificada que contiene un 95% de O_2 y un 5% de CO_2 . Para el crecimiento celular se empleó el medio de cultivo Dulbecco modificado (DMEM)

suplementado con suero fetal bovino (FBS) al 20%, aminoácidos no esenciales al 1%, estreptomicina (1000 µg/ml) al 1%, penicilina (1000U/ml) al 1% y anfotericina (250 U/ml) al 1%. Para el cultivo de células tratadas con los complejos se ha utilizado el mismo medio sin el suplemento de FBS. Además, el cultivo debe permanecer siempre en condiciones estériles, por lo que su manipulación se llevará a cabo siempre con material estéril y en una campana de flujo laminar vertical de clase II (Telstar AV-100).

Con el objeto de evitar la confluencia, cada 5 ó 6 días se deberá realizar un subcultivo. Este se lleva a cabo mediante la técnica de la tripsinización, en la cual, tras lavar el cultivo con PBS, se trata con una solución de la proteasa tripsina, que permite separar las células del sustrato sólido sobre el que crecen. Tras centrifugar 5 minutos a 3.900 rpm, se añade medio nuevo al pellet obtenido y se realiza el contaje en un microscopio óptico, ayudándose para ello del colorante vital azul trypan y de la cámara Neubauer.

Una vez determinada la concentración celular se procede a la siembra de 300.000 células en una nueva caja de 25 cm². Para la siembra de las placas de 96 pocillos y de las botellas de 75 cm² necesarias para llevar a cabo los diferentes experimentos se procede del mismo modo, sembrando finalmente 4.000 células/pocillo y 500.000 células/botella.

3.3. Ensayo de viabilidad celular (MTT)

El MTT es un ensayo colorimétrico que permite medir la actividad celular de un determinado cultivo y determinar el estado de un cultivo tras ser sometido a un tratamiento que haya podido ejercer un efecto citotóxico sobre éste. Este método se basa en la reducción metabólica del Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa en un compuesto coloreado de color azul (formazán), permitiendo determinar la funcionalidad mitocondrial de las células tratadas. La cantidad de células vivas será proporcional a la cantidad de formazán producido, que se medirá por absorbancia con un espectrofotómetro (TECAN).

Para el desarrollo de esta prueba se siembran las células en una placa de 96 pocillos. Tras 24 horas de crecimiento, se añaden diferentes concentraciones de cada uno de los complejos en los diferentes pocillos, así como los disolventes orgánicos (DMSO, acetonitrilo, clorometano y acetona) que actuarán como control. La incubación con los complejos se realizará tanto a 24 como a 72 h, después de las cuales se añaden 10 µl de reactivo MTT (5mg/ml) y se incuban a 37°C durante 3-4 horas. Posteriormente, se procede a la adición de DMSO para solubilizar los cristales de formazán y se lee la absorbancia de la placa a 540 nm.

3.4 Interacción con BSA

Se prepara una disolución con 0,5 gramos de BSA (de Sigma Aldrich) en 100 ml de PBS a pH= 7,4. La concentración real se confirma mediante espectroscopia visible ultravioleta (UV-vis) ($\epsilon_{280 \text{ nm}} = 43824 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) siendo ésta de 540 µM. Se utiliza el espectrofotómetro Termo Scientific, con lámpara de Deuterio $\lambda < 325$ y lámpara de Wolframio $\lambda > 325$ y se mide en el rango de 200-500 nm. A partir de la disolución obtenida, se prepara otra de 50 µM.

Se prepara una disolución del complejo de oro en DMSO 2,5 μM . Cada 4 minutos, se añaden 3 μl de la solución 2,5 μM del complejo de oro sobre 3 ml de la solución BSA 50 μM en una cubeta de cuarzo de longitud de paso óptico de 1 cm. De esta manera las concentraciones finales de cada uno de los complejos después de cada adición y a las cuales se realizarán las medidas son: 5, 10, 15, 20, 25 y 30 μM . El espectro de fluorescencia se mide con el espectrofotómetro Jobin-Y von-Horiba fluorolog FL-3-11, que excita las muestras a 295 nm, recogiendo el espectro de emisión en el rango entre 210-450 nm. Las intensidades de fluorescencia de PBS y los complejos de oro son irrelevantes en las condiciones descritas.

Los datos se analizan usando la ecuación de Stern-Volmer: $F_0/F = 1 + K_{sv} \cdot [Q] = 1 + K_q \cdot \tau_0 \cdot [Q]$, donde F_0 y F son las intensidades de fluorescencia de la BSA antes y después de la adición del complejo, respectivamente; K_{sv} , es la constante de *quenching* (desactivación) de Stern-Volmer; K_q , es la constante bimolecular de desactivación; $[Q]$ es la concentración del agente desactivador (en este caso, el complejo de oro); y τ_0 es el tiempo de vida de fluorescencia de la especie emisora. La gráfica de F_0/F vs $[Q]$ nos dará el valor de K_{sv} . La constante de enlace (K_b) se determina usando la ecuación modificada de Stern-Volmer: $\log\{(F_0/F)/F\} = \log K_b + n \cdot \log [Q]$, donde n es el número de sitios de unión.

3.5. Interacción con DNA

Para estudiar si los complejos de oro tienen la capacidad de unirse al DNA, se lleva a cabo un ensayo que consiste en el estudio de la interacción de los complejos con el plásmido pIRES2-EGFP. Este plásmido, de 5308 pb, es de la casa comercial Clontech.

Para realizar este experimento, en primer lugar, se añade el volumen necesario de la disolución del metal recién preparada en agua miliQ. A continuación, el plásmido ([3 nM]) se incuba 24 horas a 37°C con los complejos de oro a distintas relaciones plásmido/complejo, así como con el cisplatino (que se usará como control positivo). Por último, se analiza la movilidad de las muestras de pIRES-EGFP tratadas con los complejos con la adición de Sybersafe mediante electroforesis de gel de agarosa al 1% con tampón TBE (0,5%) (Tris-Borato/EDTA) 90 minutos a 50 V.

3.6. Determinación del nivel de especies reactivas de oxígeno (ROS)

Para comprobar si los complejos son capaces de romper el equilibrio redox de la célula e inducir así la muerte causando un estrés oxidativo, se va a determinar el nivel de ROS mediante ensayos de fluorescencia.

Para llevar a cabo este estudio, las células son sembradas en una placa de 96 pocillos y se dejan crecer durante 24 horas. Pasado este tiempo, se incuban con los compuestos de oro durante 1 hora a 37°C. Posteriormente, se absorbe el medio y se lavan las células con PBS; a continuación, se incuban con 100 μl de DCFH-DA (diacetato-diclorofluoresceína) 20 mM a temperatura ambiente durante 20 minutos. Tras este tiempo, las células se vuelven a lavar 2 veces con PBS para, finalmente, medir la fluorescencia. La producción de ROS se expresará por lo tanto en unidades arbitrarias de fluorescencia, expresadas en tantos por cien con respecto al control.

3.7. Evaluación *in vivo* de la actividad enzimática de la tiorredoxina reductasa (TrxR)

Para estudiar una posible interacción directa de los compuestos con la enzima TrxR, se siembra una placa de 96 pocillos y se trata con los complejos. Tras dejar incubar durante 24 horas, se procede a la lisis celular utilizando un buffer de lisis, y al lisado se le añaden 25 µl de PBS pH 7 en el que se han disuelto diferentes concentraciones del complejo a estudiar. Se incuba con agitación a 37°C durante 75 minutos. A continuación, se añaden a cada pocillo 25 µl de mezcla de reacción (500 µl PBS pH 7; 80 µl EDTA 100mM pH 7,5; 20 µl BSA 0,05%; 100 µl NADPH 20 mM; 300 µl H₂O destilada). Finalmente, se añaden 25 µl de disolución DTNB para dar comienzo a la reacción, se agita y se comienza a monitorizar la absorbancia a 405 nm durante 6 minutos en intervalos de 10 segundos.

3.8. Estudios de apoptosis

Para determinar el tipo de muerte celular se ha recurrido a la técnica de la citometría de flujo, empleando un marcaje con anexina V conjugada al fluorocromo FITC para permitir su detección y yoduro de propidio.

En primer lugar, las células son lavadas dos veces con PBS, posteriormente se resuspenden en 100 µl de anexina V-FITC y 5 µl de yoduro de propidio (PI) a cada muestra. Se incuban 15 minutos a temperatura ambiente en oscuridad y se añaden 400 µl de buffer de unión a anexina V 1X. Se mide la intensidad de fluorescencia durante una hora con un FACSARIA BD. La intensidad de señal se analiza con FACSDIVA BD.

3.9. Estudios de ciclo celular

Con el objetivo de conocer en qué punto del ciclo celular se produce la muerte de las células, se hace uso de la citometría de flujo, para determinar las células teñidas con un colorante fluorescente que se une al DNA, el yoduro de propidio (PI), que emite fluorescencia a 620 nm.

El procedimiento consiste en fijar las células en etanol al 70% enfriado con hielo y almacenarlas a 4°C durante 24 horas. Se centrifugan y se rehidratan con PBS, para después teñirlas con PI (50 µg/ml; la solución contiene RNasa A 100 µg/ml). El contenido de DNA de las células se analiza con un FACSARRAY BD equipado con un láser de iones de argón. El porcentaje de células en cada fase del ciclo celular se determina usando el software de verificación MODIFIT 3.0.

3.10. Evaluación del potencial mitocondrial

Las células Caco-2/TC7 se sembraron en botellas de 75 cm² y se incubaron durante 24 horas bajo las condiciones de cultivo estándar. A continuación, se expusieron a la concentración del IC₅₀ de los compuestos de oro durante 24 horas. Posteriormente, las células se lavaron dos veces con PBS atemperado y después se resuspendieron en PBS a una concentración de 1·10⁶ cél/ml. Se añadieron a cada muestra 5 µl de la sonda catiónica yoduro de 1,1',3,3,3'-hexametilindodicarbo-cianina (DiIC1, 10 µM) y se incubó 15 minutos a 37°C con un 5% de CO₂. Tras este tiempo se añadieron 400 µl de PBS a cada muestra y la fluorescencia se analizó por citometría de flujo (FACSARRAY BD) a 633 nm (excitación) y 658 nm (emisión).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Ensayos de viabilidad celular (MTT)

Mediante la realización de este experimento vamos a poder evaluar la citotoxicidad de los diferentes complejos ensayados, determinando parámetros como el IC₅₀. En este caso, el IC₅₀ se define como la cantidad de una sustancia que es necesaria para reducir en un 50% a la población celular, es decir, es una medida de la efectividad a la hora de inhibir el crecimiento celular.

En este trabajo no solo se persigue conocer la citotoxicidad de los compuestos sobre las células cancerosas, sino que también se pretende conseguir algunos datos primarios sobre la seguridad de los mismos. Por lo tanto, la evaluación de la citotoxicidad se realizará tanto en células Caco-2 indiferenciadas (*Tabla 1*), como en células que ya han alcanzado la confluencia y se han diferenciado a enterocitos normales (*Tabla 2*).

En primer lugar, se lleva a cabo el ensayo sobre células indiferenciadas como se ha descrito en la parte experimental. La incubación de las células con los diferentes complejos se ha realizado tanto durante 24 horas como a 72 horas y se ha determinado el IC₅₀ en ambos casos.

Por lo general, se busca conseguir compuestos que sean capaces de actuar y llevar a cabo su acción a concentraciones bajas, ya que esto con casi total probabilidad implicaría unos menores efectos secundarios sobre el organismo. Por tanto, nos van a interesar aquellos complejos que presenten un menor IC₅₀.

Tabla 1. Porcentaje de células cancerosas viables con respecto al control (100%), así como el IC₅₀ correspondiente a cada complejo tras ensayar tanto a 72 horas.

	Complejo 1	Complejo 2	Complejo 3	Complejo 4
IC ₅₀ (μM) 72h	2,42 ± 1,1	2,1 ± 1,15	5,31 ± 3,54	1,17 ± 1,07

Aunque los complejos de oro(I) ejercen su efecto a 24 horas, los complejos de oro(III) parecen ser más lentos a la hora de actuar. Tras incubar durante 24 horas se obtienen resultados poco fiables, con IC₅₀ variables para todos los complejos (el error es muy grande), además de ofrecer una viabilidad muy elevada (para determinados ensayos ni siquiera se pudo determinar el IC₅₀), lo que sugiere que aún no han hecho su efecto sobre las células. Sin embargo, al cabo de 72 horas, los compuestos parecen actuar de forma más coherente y los resultados obtenidos nos permiten establecer algunas conclusiones:

- Los complejos **1, 2 y 4** tienen un IC₅₀ bajo, por lo que, podrían ser usados en quimioterapia, ya que, *a priori*, no sería necesario usar altas concentraciones, que pudiesen tener efectos tóxicos sobre el organismo, para que ejerciesen su efecto anticancerígeno. De todas formas, no es el único factor influyente a la hora de elegir un fármaco apropiado.

-El **Complejo 3** tiene un IC₅₀ más elevado que sus compañeros de estudio, por lo que, en un principio, sería menos interesante como agente terapéutico. Además, los resultados obtenidos son muy heterogéneos, ya que, en todos los experimentos dio problemas para algunas de las

concentraciones ensayadas. Esto sugiere que este complejo puede ser más inestable que los homólogos de la serie ensayada, y se comporta de forma distinta según las condiciones, siendo muy susceptible a cambios en el entorno.

Una vez conocido el IC₅₀ de cada uno de los cuatro complejos, se procede a la evaluación de la citotoxicidad sobre células normales. Para ello se incuban estas células Caco-2 diferenciadas (enterocitos normales) con la concentración IC₅₀ de cada uno de los productos durante 72 horas.

Con esta segunda parte del experimento, se pretende hacer una primera confirmación de la ausencia de efectos secundarios graves, ya que a veces, aunque la concentración a la que el compuesto actúa sea baja, esta puede inhibir también el crecimiento en el resto de células no patológicas del organismo. Es decir, nos interesan compuestos selectivos, que actúen de forma específica sobre las células cancerosas y no tengan efecto también sobre células normales, lo que sería contraproducente.

Tabla 2. Porcentaje de células normales viables tras incubar 72 horas con cada uno de los complejos.

Control	Complejo 1	Complejo 2	Complejo 3	Complejo 4
100	94,33	102,60	90,21	35,60

A la vista de los resultados recogidos por la *Tabla 1*, podemos concluir que el **complejo 4** no podría usarse con fines terapéuticos, ya que también inhibe la proliferación de las células en condiciones fisiológicas normales. Sin embargo, los complejos **1, 2 y 3** no tienen efecto *per se*, por lo que solo afectan a las células cancerígenas.

Debido a estos resultados, se seleccionó el **complejo 2** para llevar a cabo los siguientes experimentos, pues se consideró que reunían las mejores condiciones, es decir, un bajo IC₅₀ y una alta especificidad por las células cancerígenas. Además, también se hicieron experimentos con el **complejo 4**, para ver si se podía determinar alguna diferencia en su modo de actuación que explicase su carencia de especificidad por células cancerígenas.

4.2. Interacción con BSA

La albúmina sérica es la proteína más abundante en el plasma sanguíneo, capaz de unirse de forma reversible a diferentes sustancias, tanto del propio organismo como exógenas, permitiendo su transporte en sangre desde un tejido determinado hasta otro órgano alejado del de origen. Algunos iones metálicos son capaces de interactuar con la proteína, permitiendo así su transporte por el torrente sanguíneo¹⁴.

Todo esto hace a la albúmina sérica una proteína de gran interés para este trabajo, pues le confiere la posibilidad de unirse al oro y transportar así a los complejos en la sangre, permitiendo su distribución por el organismo¹⁴ y su llegada al tejido cancerígeno, actuando posteriormente sobre la diana de cada caso. Esto cobrará aún mayor importancia si van a ser

administrados vía intravenosa, como suele ocurrir con la mayoría de los fármacos utilizados para tratar el cáncer. La interacción con diferentes proteínas séricas como la albúmina, no solo será importante para la distribución del fármaco, sino que también determina otros aspectos del metabolismo del fármaco como la eliminación, así como diferencias en eficacia, actividad y toxicidad.

Nos interesa que la BSA (albúmina sérica bovina) interaccione con los complejos para permitir su distribución. Sin embargo, una unión irreversible impediría que el complejo se soltase cuando llegase al órgano diana, además de suponer graves problemas al saturar a la BSA y comprometer sus diferentes funciones fisiológicas como la regulación del pH sanguíneo o la protección frente al estrés oxidativo.

Se estudia la interacción con la BSA por su homología estructural con la HSA (*Figura 5*)¹⁵. La BSA está formada por una cadena de 580 aminoácidos organizados en tres dominios. Cabe destacar la presencia de dos residuos triptófanos en posiciones 134 y 212 que muestran fluorescencia intrínseca (*Figura 5*). Estos residuos son altamente sensibles a su entorno, pudiendo observarse cambios en su espectro de emisión si la proteína sufre cambios conformacionales que modifican el entorno aminoacídico de estos triptófanos¹⁵.

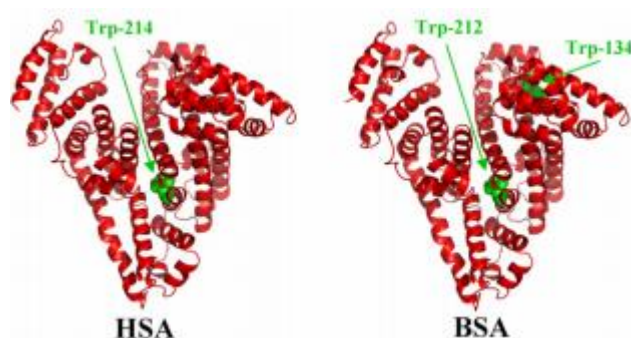


Figura 5. Estructura de la BSA y la HSA. En verde se indican los triptófanos implicados en la fluorescencia de la proteína.

Por lo tanto, en primer lugar, para confirmar la interacción de la proteína con los complejos metálicos, se mide el espectro de fluorescencia en el rango 310-450 nm como se ha explicado en el desarrollo de la metodología.

El fenómeno de desactivación de fluorescencia o quencheo, hace referencia a procesos que provocan una disminución de la intensidad de fluorescencia de una sustancia dada, como ocurre con los triptófanos de la BSA¹⁵. Esta desactivación puede ser resultado de diversos mecanismos que incluyen reacciones de los estados excitados, transferencia de energía, formación de complejos y desactivación por colisiones y se clasifican en: “desactivación colisional o dinámica”, cuando la desactivación es resultado de los choques entre moléculas y “desactivación estática”, cuando es el resultado de formación de complejos¹⁴. El proceso de desactivación es por tanto un método que permite estudiar las interacciones de una proteína con diferentes sustratos gracias a su alta sensibilidad y rápida respuesta.

Cuando se recoge el espectro de emisión de la BSA tras ser excitada a 295 nm, se observa una banda de emisión en torno a 350 nm procedente de los triptófanos mencionados anteriormente. La reducción de la intensidad de emisión conforme se aumenta la concentración de complejo, es decir, la desactivación de la fluorescencia, nos va a permitir determinar experimentalmente la interacción de la proteína con los complejos.

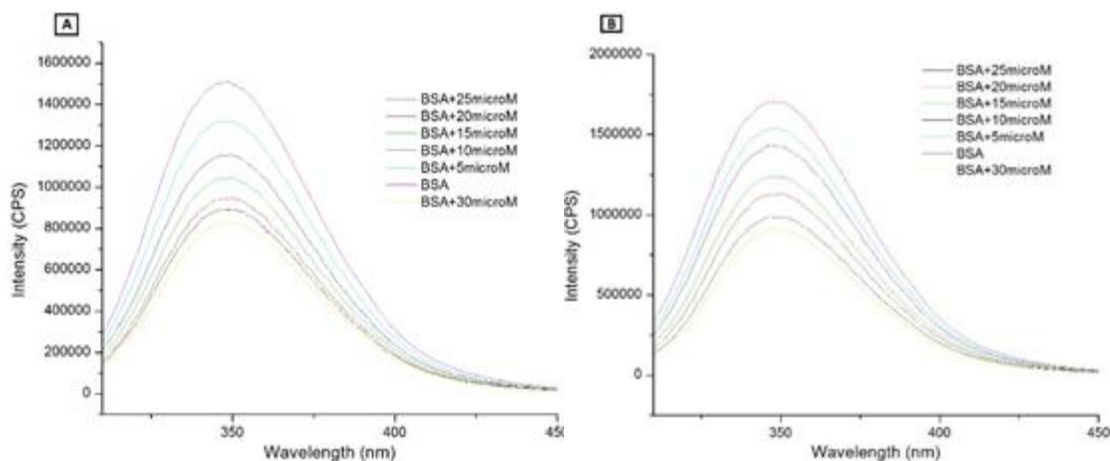


Figura 6. (A) Desactivación de la señal de la BSA tras sucesivas adiciones de **complejo 2**. **(B)** Desactivación de la señal de la BSA tras sucesivas adiciones de **complejo 4**.

Se puede observar en la *Figura 6* que, al aumentar la concentración de sustrato con cada adición de complejo, disminuye la señal de intensidad de fluorescencia sin producirse modificación alguna en la forma del espectro de emisión. Esta desactivación de la fluorescencia indica que el entorno del cromóforo de la proteína BSA cambia al añadir los complejos de oro(III), lo que nos confirma la existencia de interacción de la BSA con el **complejo 2** (*Figura 6.A*) y con el **complejo 4** (*Figura 6.B*).

Sin embargo, ahora se ha de comprobar que esta interacción es reversible. Con este propósito se hará uso de las ecuaciones de Stern-Volmer y la ecuación Stern-Volmer modificada para analizar la fluorescencia y calcular la constante de desactivación de Stern-Volmer (K_{sv}) y la constante de unión (K_b)¹⁴.

El valor de la constante de unión (K_b) observado para el *cisplatino* con la albúmina sérica humana es de $8,52 \cdot 10^2 \text{ (M}^{-1}\text{)}$ ¹⁶. Este es un valor de referencia adecuado, ya que el *cisplatino* es utilizado como fármaco y esta K_b le permite ser distribuido vía hematológica siendo liberado cuando es necesario. Por lo tanto, buscamos obtener unos valores del orden de 10^4 - 10^6 que permiten la unión adecuada de los complejos a la proteína para ser distribuidos por el cuerpo, a la vez que una liberación sencilla en su diana. Por ejemplo, diferentes complejos de paladio(II) y platino(II) presentan una unión no covalente con la BSA, determinada por una K_b del orden de $10^5 \text{ (M}^{-1}\text{)}$ ¹⁷.

En la bibliografía científica se recogen ejemplos de complejos oro(I) y de oro(III), cuyos valores están en el rango de 10^3 - $10^4 \text{ (M}^{-1}\text{)}$ ^{18,19}.

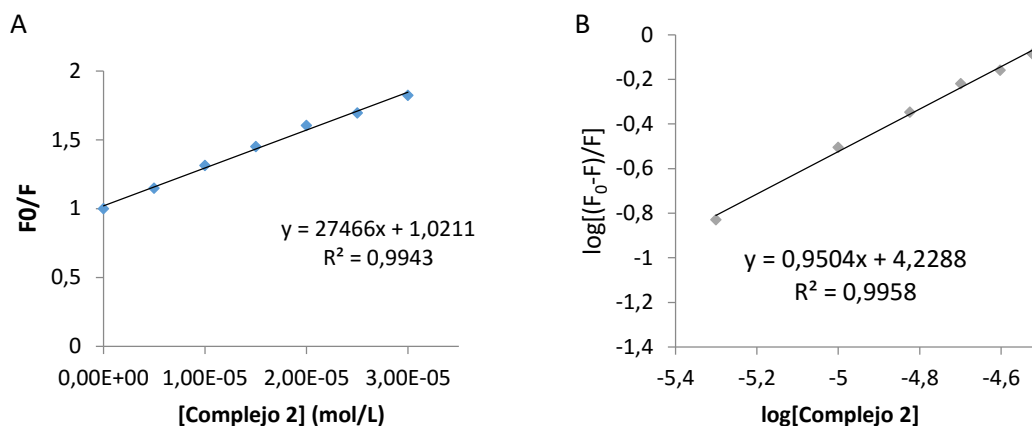


Figura 7. Gráficas de Stern-Volmer para el quencheo de la BSA tras adiciones del **complejo 2**. **(A)** $(F_0/F) = [\text{complejo 2}]K_{sv}$. **(B)** $\log[(F_0-F)/F] = \log K_b + n \log[\text{complejo 2}]$.

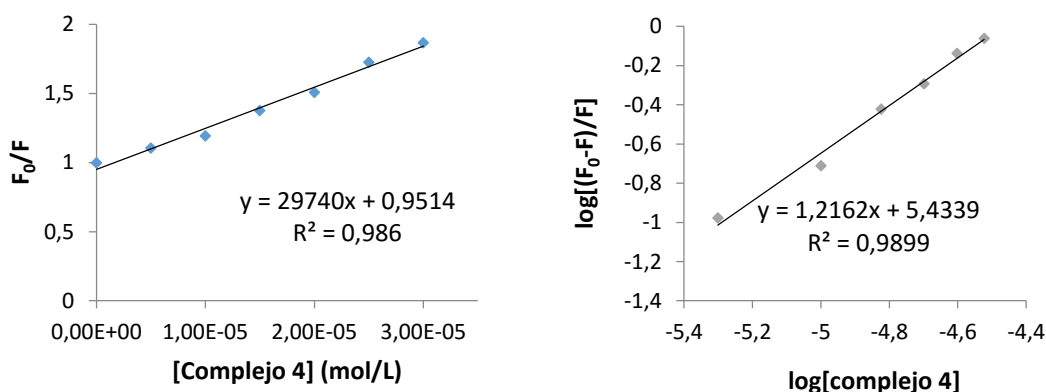


Figura 8. Gráficas de Stern-Volmer para el quencheo de la BSA tras adiciones del **complejo 4**. **(A)** $(F_0/F) = [\text{complejo 4}]K_{sv}$. **(B)** $\log[(F_0-F)/F] = \log K_b + n \log[\text{complejo 4}]$.

De las gráficas anteriores, se obtienen los valores recogidos en la Tabla 3

Tabla 3. Valores de K_{sv} , K_b y n para los complejos 2 y 4.

	$K_{sv} (M^{-1})$	$K_b (M^{-1})$	n
Complejo 2	27466	$1,70 \cdot 10^4$	0,9504
Complejo 4	29740	$2,71 \cdot 10^5$	1,2162

En la *Tabla 3* se observa que los valores de las constantes de unión para el **complejo 2** y el **complejo 4** se encuentran en el rango similar a otros ejemplos publicados, por lo que su interacción con la BSA no es muy fuerte y podrían ser liberados si se requiere. El valor de n hace referencia a las posiciones de posible interacción, por lo que en este caso, valores de n cercanos a 1 indican que hay aproximadamente un solo sitio de unión de la BSA con ambos

complejos de oro (III). En el caso del **complejo 4**, el valor de la constante es ligeramente superior, pero sin embargo su diferencia no explica el comportamiento diferente que han mostrado ambos complejos frente a las células diferenciadas, es decir los enterocitos normales.

Tras analizar los resultados obtenidos en este experimento se puede concluir que ambos complejos tienen en la albúmina sérica un posible medio de transporte y distribución por el organismo, lo que es importante a la hora de ser administrado como fármaco.

4.3. Interacción con DNA

Una de las posibles dianas de los complejos de oro(III) es el DNA²⁰, por lo que en este experimento se va a tratar de confirmar o descartar esta posibilidad para los dos complejos de estudio. Para ello, se incubó cada uno de los complejos con el plásmido pIRES2-EGFP y se llevó a cabo una electroforesis (*Figura 9*) donde se observará si existe interacción de estos con el DNA según la movilidad de las muestras.

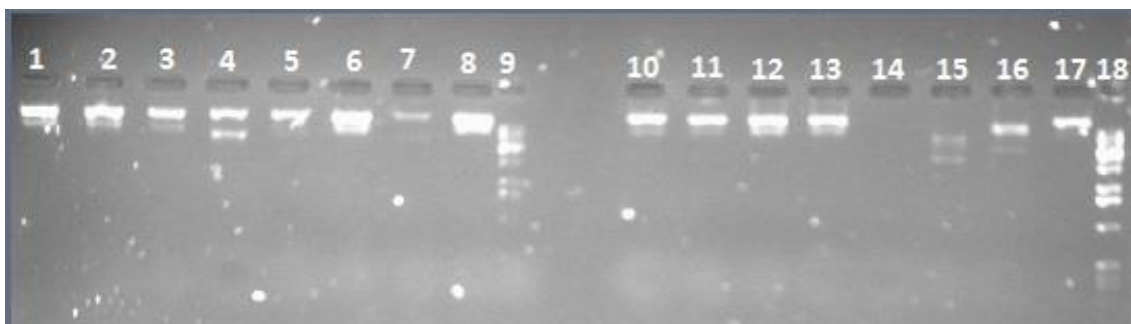


Figura 9. Gel de electroforesis. Carriles: **1. Complejo 4/plásmido (1:2).** **2. Complejo 4/plásmido (1:1).** **3. Complejo 4/plásmido (1:0,5).** **4. Complejo 3/plásmido (1:2).** **5. Complejo 3/plásmido (1:1).** **6. Complejo 3/plásmido (1:0,5).** **7. Complejo 2/plásmido (1:2).** **8. Complejo 2/plásmido (1:1)** **9. Marcador de peso molecular.** **10. Complejo 2/plásmido (1:0,5).** **11. Complejo 1/plásmido (1:2).** **12. Complejo 1/plásmido (1:1).** **13. Complejo 1/plásmido (1:0,5).** **14. Cisplatino/plásmido (1:2).** **15. Cisplatino/plásmido (1:1).** **16. Cisplatino/plásmido (1:0,5).** **17. Control (plásmido + H₂O).** **18. Marcador de peso molecular.**

Al analizar la *Figura 9*, se puede comprobar que en el carril control (17) aparece una banda que corresponde al plásmido. En los carriles que corresponden a los 4 complejos de oro(III), se puede observar esta misma banda a la misma altura, independientemente de la proporción de plásmido/complejo. En algunos de ellos también puede aparecer una banda inferior menos definida que correspondería a la forma superenrollada del plásmido y que en el plásmido no puede detectarse con tanta claridad. En el *cisplatino* (carriles 14-16), sin embargo, aparece una modificación en las bandas tanto en posición como en intensidad y número, lo cual era de esperar ya que este compuesto sí que interacciona con el DNA.

Podemos concluir, por lo tanto, que los complejos de oro(III) analizados en este experimento no presentan interacción con el DNA.

4.4. Determinación del nivel de especies reactivas de oxígeno (ROS)

En la mayor parte de los tipos de cáncer se han detectado niveles elevados de ROS, por lo que se considera que son responsables de promover ciertos aspectos relacionados con el desarrollo del tumor y su progresión. También se observan niveles elevados de las proteínas antioxidantes, lo que sugiere que el nivel de ROS adecuado para la supervivencia de la célula cancerosa es muy delicado. Debido a esta situación, muchos de los actuales agentes anticancerígenos buscan romper este equilibrio para inducir la muerte de la célula^{21,22}.

Para comprobar si los complejos que se están ensayando en el presente trabajo afectan al equilibrio de los ROS se procedió a determinar sus niveles mediante ensayos de fluorescencia como se ha descrito en la parte experimental, obteniendo los resultados presentados en la *Tabla 4*.

Tabla 4. Porcentaje de fluorescencia obtenido en células cancerosas para cada uno de los complejos con respecto al control.

Control	Auranofin	Complejo 2 (IC50)	Complejo 4 (IC50)
100	118,84	136,79	98,90

Al examinar los resultados mostrados en la *Tabla 4*, se puede advertir como la fluorescencia aumenta en los pocillos que han sido tratados con el **complejo 2** cuando se incuban las células con una concentración equivalente a su IC₅₀. Esto quiere decir que se ha producido más agua oxigenada, es decir, más ROS que en las células control. Este aumento de las especies reactivas de oxígeno era el esperado según lo descrito en la literatura²³. Además, para el **complejo 4** los niveles de ROS se encuentran ligeramente por debajo de los de las células control, lo cual contradice los resultados esperados. El auranofin se usó como control, ya que se sabe que este compuesto sí que produce un aumento en el nivel de ROS de las células cancerosas.

En resumen, el **complejo 2** se comporta como un prooxidante, rompiendo el equilibrio, entre el nivel de ROS adecuado y las defensas antioxidantes, necesario para que el buen funcionamiento y la viabilidad de las células cancerosas. El **complejo 4**, sin embargo, no parece llevar a cabo su efecto citotóxico mediante el desajuste redox, ya que los niveles de ROS son muy parecidos a los de células no tratadas, incluso podría presentar un efecto ligeramente antioxidante.

4.5. Interacción con la enzima tiorredoxina reductasa (TrxR)

Tras el análisis de los resultados descritos en el apartado 4.4. en los que los complejos parecían ejercer un importante papel en la variación de los niveles de ROS, llevamos a cabo el estudio de la posible inhibición de la tiorredoxina reductasa, que ya había sido descrita en la bibliografía como una posible diana de los complejos de oro²²⁻²⁵.

La tiorredoxina reductasa (E.C. 1.8.1.9) es una proteína citoplasmática que posee actividad tiorredoxina reductasa y que además puede actuar como glutarredoxina. Induce la polimerización de actina y tubulina, llevando a la formación de protusiones en la membrana celular. Debe homodimerizar para poder llevar a cabo su función. Finalmente, existen siete isoformas distintas, siendo la 1 la isoforma canónica. El sistema tiorredoxina reductasa-tiorredoxina está implicado en mantener el ambiente redox en el interior celular, en el crecimiento de la célula, en la defensa del estrés oxidativo y en el control de la apoptosis^{22,24}. En algunos tumores se observa un aumento en la expresión de ambas, por lo que se consideran importantes objetivos para los fármacos anticancerígenos. El oro y el selenio tienen una elevada afinidad, por lo que parece que la interacción entre el centro metálico del complejo y el átomo de selenio del grupo selenocisteína de la enzima podría ser una de las razones por las que los complejos de oro producen un descenso de la actividad TrxR²².

Para comprobar esta posible interacción del **complejo 2** con la enzima antioxidante tiorredoxina reductasa, se ha llevado a cabo un ensayo en el que se evalúa la actividad enzimática de las células tras haber sido tratadas con los complejos (*Tabla 5*).

Tabla 5. Porcentaje de actividad tiorredoxina reductasa celular tras tratar las células con el **complejo 2** y el **complejo 4**.

Control	Complejo 2 (IC50)	Complejo 4 (IC50)
100	67,87	83,63

Según los resultados obtenidos, ambos complejos parecen afectar a la enzima, inhibiendo su actividad. Esto es lo que cabía esperar para el **complejo 2**, ya que confirma los resultados del apartado 4.4. y explica esta subida de los niveles de ROS por la disminución de la actividad de una de las más importantes enzimas antioxidantes, la TrxR.

Por otro lado, la inhibición que el **complejo 4** causa en la TrxR (17%) no parece suficiente como para provocar un incremento significativo de los niveles de ROS, lo que explicaría los resultados descritos en el apartado 4.4.

4.6. Estudios de apoptosis

Para estudiar el tipo de muerte producida por los complejos, se recurrió a la doble tinción de anexina V y yoduro de propidio. Durante los primeros estadios de la apoptosis, el fosfolípido fosfatidilserina (PS) es trasladado de la parte citosólica a la extracelular de la membrana plasmática. La anexina V, que es conjugada al fluorocromo FITC, es capaz de unirse de manera específica a la PS, permitiendo su detección mediante citometría de flujo. En segundo lugar, el yoduro de propidio (PI) penetrará en aquellas células cuya membrana se encuentre considerablemente alterada, uniéndose a los ácidos nucleicos y proporcionando una segunda señal fluorescente detectable en la citometría de flujo.

Esta técnica, por lo tanto, nos va a permitir distinguir las células sanas (no incorporan ni PI ni Anexina V y no presentarán ninguna fluorescencia), de las células que sufren necrosis (su membrana se encuentra dañada e incorporarán PI) y las células apoptóticas (que unirán la anexina V a la PS de sus membranas). Tras analizar los datos recogidos por el citómetro y representados en la *Figura 10*, se obtuvieron los resultados expuestos en la *Tabla 6*.

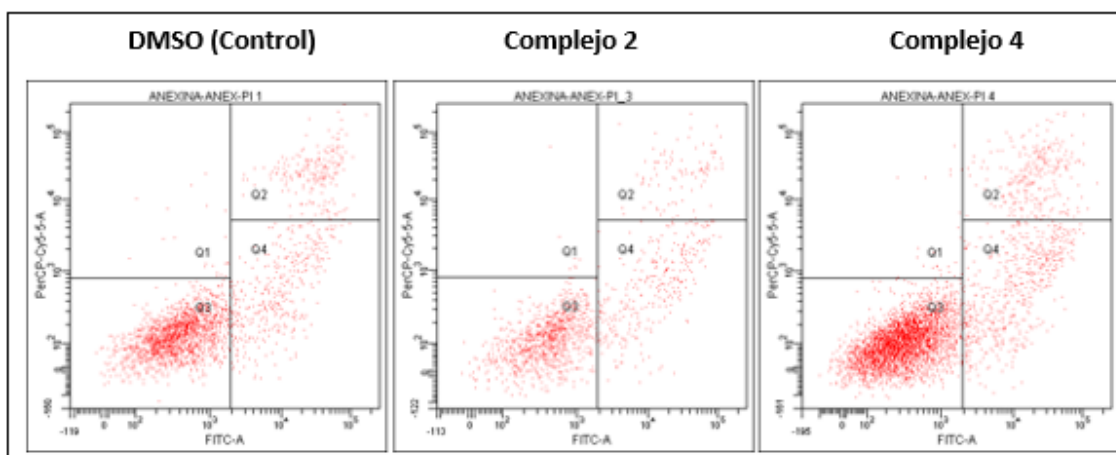


Figura 10. Estudio del tipo de muerte celular sobre células Caco-2/TC7 incubadas con los complejos 2 y 4 durante 24 horas. Análisis por citometría de flujo mediante tinción doble anexina V-PI. Q1: necrosis; Q2: apoptosis tardía; Q3: vivas; Q4: apoptosis temprana.

Tabla 6. Resumen del efecto del tratamiento con los complejos 2 y 4 sobre la muerte celular, tras incubar 24 horas a concentración IC_{50} .

	Nº células	Vivas (%)	Apoptosis temprana (%)	Apoptosis tardía (%)	Necrosis (%)
Control	2.408	75,6	15,3	8,3	0,9
Complejo 2	1.371	72,1	20,8	6,68	0,5
Complejo 4	4.448	81,3	12,3	5,8	0,5

Se esperaban unos resultados positivos para muerte celular por vía apoptótica, ya que esta no provoca una respuesta inflamatoria, contraindicado en el caso de que se administrase como fármaco. Aunque esta vía no parece ser muy significativa en el **complejo 2** y se descarta en el **complejo 4**, los complejos tampoco inducen necrosis, que sí que causa inflamaciones, lo que implicaría su descarte como futuro quimioterápico.

4.7. Estudios de ciclo celular

Conocer en qué punto del ciclo celular se produce la muerte de las células puede ser de mucha ayuda a la hora de determinar la diana sobre la que actúan los compuestos. Uno de los objetivos de la quimioterapia es atacar a las células cancerígenas durante una o más fases de su ciclo reproductivo.

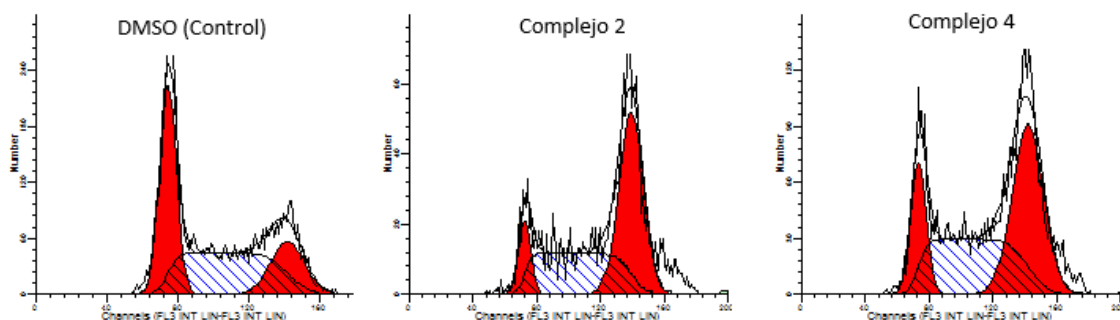


Figura 11. Análisis del ciclo celular tras el tratamiento con los complejos 2 y 4 a concentraciones IC_{50} durante 24 horas.

Tabla 7. Porcentajes de células presentes en cada una de las fases del ciclo celular.

	G ₁ (%)	S (%)	G ₂ (%)
Control	38,19	42,62	19,18
Complejo 2	10,24	39,52	50,24
Complejo 4	16,95	39,47	43,57

Analizando los datos presentes en la *Tabla 7*, se puede observar que el tratamiento con los complejos 2 y 4 provoca un arresto celular en la fase G₂ del ciclo, mientras que el porcentaje de células tanto en fase G₁ como en S disminuye con respecto al control.

La apoptosis suele iniciarse en muchas ocasiones justo detrás de la fase G₁, por lo que la muerte por apoptosis implicaría un incremento de células en cualquier fase del ciclo. Este efecto observado no concuerda con los resultados obtenidos en los experimentos de apoptosis.

4.8. Evaluación del potencial mitocondrial (ψ_m)

Como último ensayo para la verificación de la ausencia de actividad proapoptótica de los complejos 2 y 4, se procedió a la determinación del potencial de membrana mitocondrial, ya que se ha visto con anterioridad que los compuestos de oro tienen tendencia a acumularse en la mitocondria debido a sus propiedades lipofílicas.

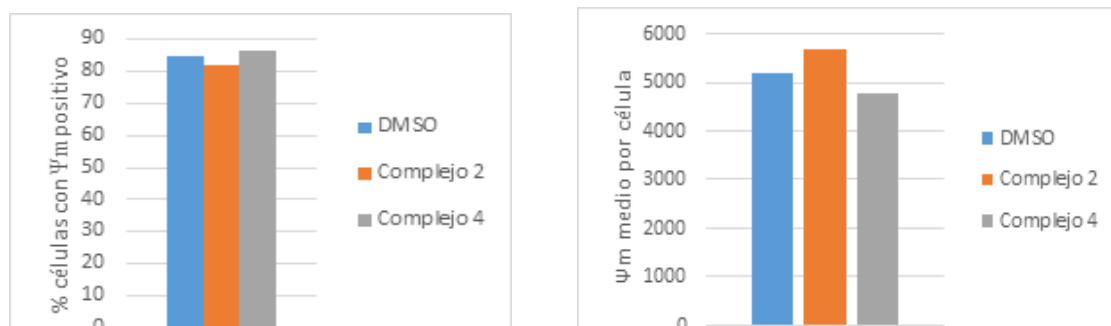


Figura 12. Resultados de la determinación mediante citometría de flujo de: el número de células con un ψ_m positivo (izquierda) y el valor medio de este ψ_m por célula (derecha).

Los resultados representados en la *Figura 12* parecen contradecir la hipótesis de que los complejos **2** y **4** son capaces de entrar en las mitocondrias y causar la muerte de la célula en consecuencia, ya que se observa como el potencial mitocondrial no presenta el descenso esperado. Esto podría terminar de confirmar los resultados de los apartados 4.6 y 4.7 ya que al no alterar el potencial de membrana mitocondrial se desecha la posibilidad de que los complejos **2** y **4** causen apoptosis vía mitocondrial.

4.9. Estudios de necroptosis

Por último, y debido a las sucesivas confirmaciones de que los complejos estudiados no causan la apoptosis celular, se pretendió determinar si el **complejo 2** podría causar la muerte celular por necroptosis. Aunque apoptosis y necrosis son las formas más comunes de muerte celular, actualmente se sabe que existen otras vías alternativas. La necroptosis es una de ellas y es considerada como un estadio intermedio entre los dos mecanismos convencionales. Se encuentra controlada principalmente por la acción de la quinasa RIP1²⁶, en lugar de por la activación de caspasas como ocurre en la apoptosis.

Para realizar este ensayo, se emplea la necrostatina-1 (Nec), un inhibidor de la quinasa RIP1, y se observa el efecto producido sobre el cultivo. Los resultados obtenidos se muestran en la *Figura 13*.

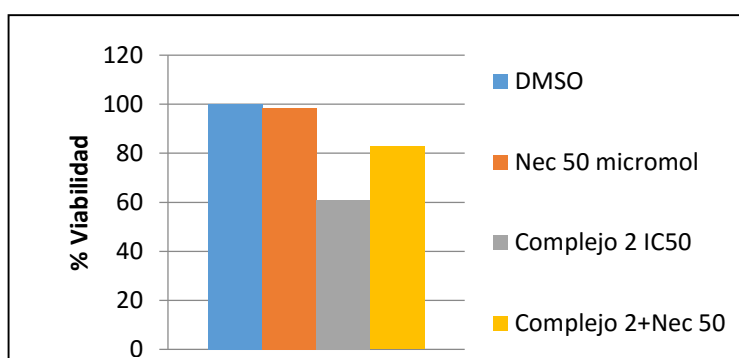


Figura 13. Estudio del efecto del tratamiento con el **complejo 2** a concentraciones IC_{50} tras haber incubado las células con Nec (50 μ M) durante una hora y media.

Al analizar la *Figura 13* se observa cómo, al incubar el **complejo 2** junto a la necrostatina (inhibidor de necroptosis), la viabilidad aumenta en un 20% con respecto a la población celular que solo ha sido tratada con el **complejo 2**. Por lo tanto, se puede confirmar que el **complejo 2** es un inductor de necroptosis.

Debido a las resistencias que aparecen frente a los fármacos clásicos (proapoptóticos), se necesita buscar nuevos tratamientos que actúen por vías alternativas, como puede ser la necroptosis. Por lo tanto, esta característica puede hacer al **complejo 2** interesante desde el punto de vista farmacológico, de hecho, se ha observado que algunos cánceres son especialmente sensibles a la muerte por necroptosis²⁷.

5. CONCLUSIONES

1. Los cuatro complejos de oro(III) ensayados ejercen un efecto citotóxico sobre células de carcinoma de colon humano Caco-2/TC7.
2. El **complejo 1**, el **complejo 2** y el **complejo 3** son inocuos para las células normales (Caco-2/TC7 diferenciadas), por lo que se consideran selectivos frente a las células cancerosas.
3. El **complejo 4** no es selectivo frente a las células cancerosas ya que disminuye la viabilidad de los enterocitos normales (células Caco-2/TC7 que han llegado a confluencia).
4. El **complejo 2** y el **complejo 4** interaccionan con la BSA con una constante de enlace que les permitirá ser transportados a través del torrente sanguíneo hasta llegar a su diana.
5. El **complejo 2** y el **complejo 4** no presentan interacción con el plásmido pIRES2-EGFP, por lo que no parece que el DNA sea la diana de estos derivados.
6. El **complejo 2** produce una ligera apoptosis, mientras que el **complejo 4** no presenta ningún efecto apoptótico. Ninguno de los dos produce muerte celular por necrosis.
7. El **complejo 2** y el **complejo 4** ejercen su efecto citotóxico a través de la inducción de la necroptosis, activando enzimas tales como la quinasa RIP1.
8. En base a los ensayos realizados, no existen diferencias significativas entre el comportamiento del **complejo 2** y el **complejo 4** para establecer una hipótesis sobre la ausencia de selectividad del **complejo 4**.

5. CONCLUSIONS

1. The four gold(III) complexes tested have shown that they can induce cell death on colon cancer cells Caco-2/TC7.
2. **Complex 1**, **complex 2** and **complex 3** are relatively innocuous on normal cells (Caco-2/TC7 cells that have reached confluence).
3. **Complex 4** doesn't have anticancer properties beside selectivity, as it exerts an effect on normal cells.
4. **Complex 2** and **complex 4** interact with BSA. The moderate value obtained for the binding constant, could indicate that the complexes can be transported in blood stream and released in the target tissue.
5. **Complex 2** and **complex 4** don't interact with pIRES2-EGFP plasmid. DNA isn't a target in the mechanism of action of these complexes.
6. **Complex 2** has a slightly apoptotic effect on cells, whereas **complex 4** doesn't cause any apoptosis. Nor **complex 2**, nor **complex 4** cause necrosis.
7. **Complex 2** and **complex 4** promote RIP1 kinase effect, which leads to necroptosis.
8. The performed assays didn't set any basis on the difference between **complex 2** and **complex 4** mechanism of action that could explain the absence of selectivity of **complex 4**.

REFERENCIAS

- (1) Labianca, R.; Beretta, G. D.; Kildani, B.; Milesi, L.; Merlin, F.; Mosconi, S. M.; Pessi, A.; Prochilo, T.; Quadri, A.; Gatta, G.; de Braud, F.; Wils, J. Colon cancer. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* **2010**, *74*, 106–133.
- (2) Kan, W. L. T.; Yin, C.; Xu, H. X.; Xu, G.; To, K. K. W.; Cho, C. H.; Rudd, J. A.; Lin, G. Antitumor effects of novel compound, guttiferone K, on colon cancer by p21Waf1/Cip1-mediated G0/G1 cell cycle arrest and apoptosis. *International Journal of Cancer* **2013**, *132*, 707-716.
- (3) Barnes, K.R.; Lippard, S.J. *Metal Ions in Biological Systems, Vol 42: Metal Complexes in Tumor Diagnosis and as Anticancer Agents* **2004**, *42*, 143-177.
- (4) Wong, E. and Giandomenico, C. M. Current status of platinum-based antitumor drugs. *Chemical Reviews* **1999**, *99*, 2451-2466.
- (5) Reedijk, J. Metal-Ligand Exchange Kinetics in Platinum and Ruthenium Complexes. *Platinum Metals Review* **2008**, *52* (1), 2-11.
- (6) Li, S.K.H.; Martin, A. Mismatch repair and colon cancer: mechanisms and therapies explored. *Trends in Molecular Medicine* **2016**, *22* (4), 274-289.
- (7) Wang, H.; Su, C.; Wu, Y.; Lin, C.J.; Lee, C.; Shen, J.; Chan, W.; Chang, W.H.; Yeh, H. Application of gold in biomedicine: past, present and future. *Internal Journal of Gerontology* **2012**, *6*, 1-4.
- (8) Ott, I. On the medicinal chemistry of gold complexes as anticancer drugs. *Coordination Chemistry Reviews* **2009**, *253*, 1670-1681.
- (9) Mirabelli, C.K.; Johnson, R.K.; Sung, C.M.; Faucette, L.; Katharine Muirhead, K.; Crooke, S.T. Evaluation of the in vivo antitumor activity and in vitro cytotoxic properties of auranofin, a coordinated gold compound, in murine tumor models. *Cancer Research* **1985**, *45*, 32-39.
- (10) Gabbiani, C.; Cinellu, M. A.; Maiore, L.; Massai, L.; Scaletti, F.; Messori, L. Chemistry and biology of three representative gold (III) compounds as prospective anticancer agents. *Inorganical Chimica Acta* **2012**, *393*, 115-124.
- (11) Sun R.-W.; Che, C.-M. The anti-cancer properties of gold(III) compounds with dianionic porphyrin and tetradentate ligands. *Coordination Chemistry Reviews* **2009**, *253*, 1682-1691.
- (12) Bortolozzi, M.; Pitteri, B. Synthesis of neutral gold(III) pyrimidine-complexes and theoretical studies on the proton affinity of the coordinated ligands. *Polyhedron* **2010**, *29*, 1833-1836.
- (13) L. Ronconi, D. Fregona. The Midas touch in cancer chemotherapy: from platinum- to gold-dithiocarbamate complexes. *Dalton Transactions* **2009**, 10670-10680.
- (14) Correa, R. S.; Oliveira, K. M.; Pérez, H.; Plutín, A. M.; Ramos, R.; Mocelo, R.; Castellano, E. E.; Batista, A. A. cis-bis(N-benzoyl-NO,NO -dibenzylthioureido) platinum(II): Synthesis, molecular structure and its interaction with human and bovine serum albumin. *Arabian Journal of Chemistry* **2015**.

- (15) Bourassa, P.; Hasni, I.; Tajmir-Riahi, H.A. Folic acid complexes with human and bovine serum albumins. *Food Chemistry* **2011**, 129, 1148-1155.
- (16) Neault, J.F.; Tajmir-Riahi, H.A. Interaction of cisplatin with human serum albumin. Drug binding mode and protein secondary structure. *Biochimica et Biophysica Acta-Protein Structure and Molecular Enzymology* **1998**, 1834, 153-159.
- (17) Mukherjee, T.; Sen, B.; Zangrando, E.; Hundal, G.; Chattopadhyay, B.; Chattopadhyay, P. Palladium(II) and platinum(II) complexes of deprotonated N,N'-bis(2-pyridinecarboxamide)-1,2-benzene: Synthesis, structural characterization and binding interactions with DNA and BSA. *Inorganica Chimica Acta* **2013**, 406, 176-183.
- (18) Canumalla, A. J.; Schraa, S.; Isab, A. A.; Shaw, C. F.; Gleichmann, E.; Dunemann, L.; Turfeld, M. Equilibrium binding constants and facile dissociation of novel serum albumin-dicyanoaurate(I) complexes. *Journal of Inorganic Biochemistry* **1998**, 3, 9-17.
- (19) Sanghvi, C. D.; Olsen, P. M.; Elix, C.; Peng, S.; Wang, D. S.; Chen, Z.; Shin, D. M.; Hardcastle, K. I.; MacBeth, C. E.; Eichler, J. F. Antitumor properties of five-coordinate gold(III) complexes bearing substituted polypyridyl ligands. *Journal of Inorganic Biochemistry* **2013**, 128, 68-76.
- (20) Patel, M.N.; Bhatt, B.S.; Dosi, P.A. Synthesis and evaluation of gold(III) complexes as efficient DNA binders and cytotoxic agents. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **2013**, 110, 20-27.
- (21) Watson, J. Oxidants, antioxidants and the current incurability of metastatic cancers. *Open Biology* **2013**, 3.
- (22) Romero-Canelon, I.; Sadler, P.J. Next generation metal anticancer complexes: multi-targeting via redox modulation. *Inorganic Chemistry* **2013**, 52, 12276-12291.
- (23) Vela, L.; Contel, M.; Palomera, L.; Azaceta, G.; Marzo, I. Iminophosphorane-organogold(III) complexes induce cell death through mitochondrial ROS production. *Journal of Inorganic Biochemistry* **2011**, 105, 1306-1313.
- (24) 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. *Coordination Chemistry Reviews* **2009**, 253, 1692-1707.
- (25) Arcau, J.; Andermark, V.; Aguiló, E.; gandioso, A.; Moro, A.; Cetina, M.; Lima, J.C.; Rissanen, K.; Ott, I.; Rodríguez, L. Luminescent alkynyl-gold(I) coumarin derivatives and their biological activity. *Dalton Transactions* **2014**, 43, 4426-44436.
- (26) Zhou, W., Yuan, J. Necroptosis in health and diseases. *Seminars in Cell & Developmental Biology* **2014**; 35, 14-23.
- (27) Su, Z.; Yang, Z.; Xie, L.; DeWitt, J.P.; Chen, Y. Cancer therapy in the necroptosis era. *Cell Death and Differentiation* **2016** 23(5), 748-756.