



Trabajo Fin de Grado

Actividad biológica de complejos metálicos con
ligandos N-dadores en células de carcinoma de
colon humano

Autor:

José Carlos Royo Sanz

Directoras:

Elena Cerrada Lamuela

M^a Jesús Rodríguez Yoldi

Septiembre 2019



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza

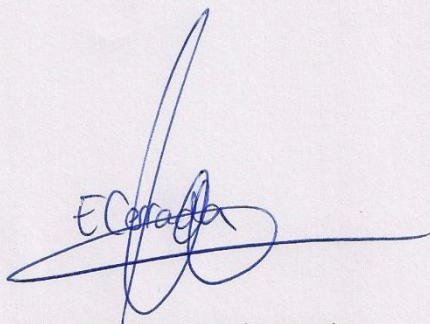
ELENA CERRADA LAMUELA Profesora Titular del departamento de Química Inorgánica de la Universidad de Zaragoza

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 “Actividad biológica de complejos metálicos con ligandos N-dadores en células de carcinoma de colon humano” 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, 13 de septiembre 2019



Fdo.: Dra. Elena Cerrada Lamuela



Fdo.: Dra. M^a Jesús Rodríguez Yoldi

ÍNDICE

1. Resumen/Abstract	1
2.Introducción	2
3.Objetivos	5
4. Materiales y métodos	6
4.1. Preparación de las disoluciones madre	6
4.2. Cultivo celular	6
4.3. Ensayos de toxicidad y viabilidad celular (MTT)	6
4.4. Ensayos de apoptosis y ciclo celular	7
4.5. Activación de caspasa 3	8
4.6. Determinación del potencial mitocondrial (ψ_m)	8
4.7. Cuantificación de especies reactivas de oxígeno (ROS)	8
4.8. Actividad de la enzima Tiorredoxina Reductasa (TrxR)	9
4.9. Actividad de la enzima Glutation Reductasa (GR)	9
4.10. Inhibición del proteasoma	10
5. Resultados y discusión	11
5.1. Ensayos de toxicidad y viabilidad celular	11
5.2. Porcentaje de células en apoptosis y fases del ciclo celular	14
5.3. Actividad de la caspasa 3	16
5.4. Evaluación del potencial mitocondrial (ψ_m)	16
5.5. Cuantificación de especies reactivas de oxígeno	17
5.6. Actividad de la enzima Tiorredoxina reductasa (TrxR)	18
5.7. Actividad de la enzima Glutation Reductasa (GR)	19
5.8. Inhibición del proteasoma	20
6. Conclusiones/Conclusions	21
7. Referencias	22

Abreviaturas

AgSD	Sulfadiazina de plata
COX	Ciclooxigenasa
DCFH-DA	Diacetato-diclorofluoresceína
DMEM	Medio mínimo esencial de Eagle Dulbecco modificado
DMSO	Dimetilsulfóxido
EGFR	Factor de crecimiento epidérmico
FDA	Food and Drug Administration
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
GR	Glutación Reductasa
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
PBS	Tampón fosfato salino
PI	Yoduro de propidio
PPh ₃	Trifenilfosfina
PS	Fosfatidilserina
ψ_m	Potencial mitocondrial
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SI	Selectivity index (índice de selectividad)
TrxR	Tiorredoxina Reductasa

1. Resumen

El cáncer es una patología asociada a una elevada proliferación celular causada por mutaciones en determinados genes. En concreto el cáncer de colon ocupa el tercer lugar en casos en el mundo. Los efectos secundarios de los tratamientos quimioterápicos convencionales con el cisplatino y sus derivados han demostrado ser poco selectivos y presentan efectos secundarios para los pacientes. Debido a ello, las nuevas investigaciones se han dirigido hacia los complejos de coordinación con metales de transición que han demostrado actuar sobre dianas específicas de células cancerosas. Dentro de todos ellos, los complejos con Au(I) y Ag(I) han sido objeto de este estudio. Se ha evaluado su toxicidad en células Caco-2/TC7 (adenocarcinoma de colon humano) y su selectividad frente a las células diferenciadas como modelo de la barrera intestinal

Del mismo modo, se han determinado las distintas dianas sobre las que actúan, así como los posibles mecanismos a través de los cuales son capaces de causar la muerte de las células tumorales. Los complejos de oro y plata con el ligando derivado de la 2-anilino piridina con piridina como sustituyente (complejos **1**, **2** y **3**) han resultado ser los más selectivos, por lo que podrían evitar efectos secundarios al no afectar al crecimiento de las células sanas.

En cuanto al mecanismo de acción, el **complejo 1** con oro ([AuL1(PPh₃)]TfO) posiblemente, actúa elevando los niveles de ROS debido a su capacidad de inhibir la enzima Tiorredoxina Reductasa (TrxR), además de actuar sobre la subunidad β5 del proteasoma, provocando su inhibición.

Respecto al homólogo de plata (**complejo 2**, [AgL1(PPh₃)(OTf)]), aumenta la cantidad de ROS, pero para ello requiere mayores concentraciones. Esta ruptura del equilibrio redox se relaciona con su capacidad de alterar el potencial mitocondrial.

1. Abstract

Cancer is a disease related to an increase of cellular proliferation due to mutations in certain genes. In particular, colon cancer is the third most abundant in the world. Secondary effects of traditional chemotherapy drugs like cis-platin and their derivatives are poorly selective and present secondary effects to the patients.

New investigations are focused in coordination complexes of transition metals that act in targets specific of cancerous cells. Among them, those with Au(I) and Ag(I) have been studied in this work. We have evaluated their toxicity in Caco-2/TC7 cells (colon human adenocarcinoma) and their selectivity towards differentiated cells as a model of the intestinal barrier.

It has been determined their targets and mechanisms of action that cause death of cancer cells. **Complexes 1, 2 and 3** with pyridine as substituent are the most selective, since they would avoid secondary effects not affecting the growth of normal cells.

Respect of targets, probably **complex 1** increase reactive oxygen species levels due to an inhibition of the enzyme Thioredoxin Reductase (TrxR). Also, appears to cause inhibition of the β5 subunit of the proteasome, but more essays are needed in order to confirm it.

Complex 2 increase ROS but requires higher concentrations to do that. This disruption of the redox balance is related to its ability to modify the mitochondrial potential.

2. Introducción

El cáncer es una patología cuya principal característica es un crecimiento celular descontrolado. Su origen se encuentra en una serie de mutaciones sucesivas en determinados genes que transforman las células normales en tumorales. Entre ellos, se encuentran los genes supresores de tumores, encargados de la regulación del ciclo celular. Por otro lado, los oncogenes facilitan la proliferación de las células. En el caso de que se produzcan mutaciones en ellos, las células mantienen activas las rutas de transducción de señales que favorecen la proliferación y no detienen su ciclo en caso de fallos en el ADN.

En concreto, el cáncer de colon es el tercero más abundante en todo el mundo¹. Inicialmente comienza con la formación de un tumor benigno en el epitelio intestinal denominado adenoma, debido en la mayoría de los casos a mutaciones de genes supresores de tumores tales como APC y p53. Estos intervienen en la regulación del ciclo celular, por lo que esta alteración lleva a una proliferación incontrolada de células provocando la formación de un adenocarcinoma o tumor maligno debido a la acumulación de mutaciones en otros genes como Ras y alteraciones epigenéticas. En este estado, las células adquieren la capacidad de migrar a otros tejidos, provocando la metástasis².

Existen diversas opciones para su tratamiento tales como cirugía, radioterapia y quimioterapia. La elección de uno u otro tratamiento dependerá de la etapa de progresión de la enfermedad en la que se encuentre el paciente. Por ejemplo, en el caso de los pacientes que se encuentran en un estadio avanzado de la enfermedad (como la etapa III, en la que se ha producido metástasis) se les trata con un derivado metálico de platino, conocido como oxaliplatino, junto con 5-fluorouracilo y leucovorin, como agentes adyuvantes después de haber sido sometidos a cirugía. También se llevan a cabo tratamientos con anticuerpos monoclonales tales como bevacizumab³.

La investigación de compuestos metálicos para el tratamiento del cáncer comenzó con el descubrimiento accidental en 1966 del cis-diaminodicloroplatino (II) comúnmente denominado cisplatino, siendo éste el primer derivado de platino utilizado en el tratamiento del cáncer. Su mecanismo de acción se basa en la unión al DNA causando una serie de daños, que alteran los procesos de replicación y transcripción provocando la entrada de las células en apoptosis⁴⁻⁵.

El cisplatino presenta una elevada toxicidad dependiente de la dosis, así como importantes efectos adversos, tales como cardiotoxicidad o nefrotoxicidad. Para evitar dichos efectos negativos manteniendo la efectividad terapéutica, se diseñaron los derivados análogos carboplatino y oxaliplatino (**figura 1**), denominados de segunda y tercera generación, respectivamente. El último fue aprobado en 2002 por la FDA (Food and Drug Administration) para el tratamiento de cáncer de colon resistente a cisplatino y se administra junto con 5-fluorouracilo y leucovorin en una combinación denominada FOLFOX³. Aunque el oxaliplatino es más efectivo que los anteriores compuestos, no está exento de efectos secundarios. Esto se debe a que los derivados del platino carecen de selectividad sobre las células cancerosas debido a que la fuerte unión al DNA afecta tanto a células cancerosas como a las sanas. En consecuencia, las últimas investigaciones en el cáncer colorectal se han dirigido hacia la búsqueda de compuestos metálicos distintos al cisplatino y sus derivados que actúen sobre dianas específicas de las células tumorales en lugar de sobre el DNA, para mejorar su selectividad. Dichas dianas suelen ser proteínas específicas que se encuentran sobreexpresadas en células tumorales⁶⁻⁷.

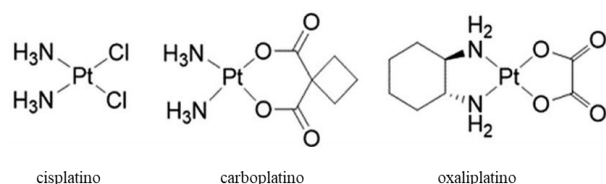


Figura 1. Estructura química de los derivados del platino utilizados en clínica.

De entre las moléculas que pueden considerarse como dianas específicas en el tratamiento del cáncer de colon se encuentran: la tiorredoxina reductasa (TrxR), sobreexpresada en diversos tipos de cáncer entre los que se encuentra el de colon⁸, el sistema proteasoma, cuya actividad también se encuentra incrementada en estas células⁹, la ciclooxigenasa (COX)¹⁰ y la anhidrasa carbónica (isoforma CAIX)¹¹. Además de estas nuevas estrategias, actualmente se están investigando sistemas capaces de inhibir el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF)¹², además de la inmunoterapia¹³.

En la búsqueda de alternativas al empleo de complejos metálicos basados en platino, los derivados de **oro** representan un excelente punto de partida, debido principalmente a que complejos de este elemento han venido siendo empleados en medicina desde hace miles de años¹⁴, aunque su estudio como agentes anticancerígenos es mucho más reciente. Dentro de los complejos de oro destaca el auranofín, un compuesto de oro (I) en el que el centro de oro está coordinado a una molécula de azúcar y a una fosfina terciaria que le proporciona estabilidad (**figura 2**). Inicialmente se utilizaba para el tratamiento de la artritis reumatoide y se vio que dichos pacientes tenían menor riesgo de padecer cáncer¹⁵. Su mecanismo de acción se basa en la unión a la enzima Tiorredoxina Reductasa (TrxR), gracias a la afinidad que presentan los compuestos de oro por las selenoenzimas¹⁶. Esto provoca un desequilibrio en las especies reactivas de oxígeno (ROS) en la célula tumoral, lo que conlleva a su muerte.

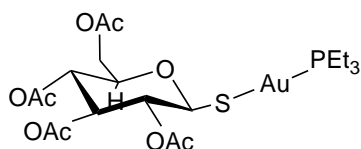


Figura 2. Estructura química del auranofín

Son muchos los ejemplos de complejos de oro que han demostrado tener actividad anticancerígena y se han publicado una gran diversidad de revisiones además de artículos científicos, que demuestran una variedad de estructuras y ligandos entre los que destacan: fosfinas, ditiocarbamatos, tiolatos, carbenos N-heterocíclicos y alquinos. Los complejos de oro presentan mecanismos de acción diferentes al platino, de modo que, en lugar de unirse al DNA presentan una mayor afinidad hacia proteínas tales como tiorredoxina reductasa o proteasoma¹⁷⁻¹⁸, entre otras¹⁹⁻²⁰, lo cual les hace excelentes candidatos para ser empleados como inhibidores de dichas proteínas, sobreexpresadas en el cáncer de colon, como ya hemos descrito anteriormente.

Además del oro, los complejos de plata son conocidos desde hace tiempo por sus propiedades antimicrobianas. Se cree que estas derivan de su capacidad de unirse a enzimas esenciales que mantienen la pared bacteriana, causando su inactivación²¹. En los comienzos de su uso médico se utilizaba en forma de sales, como el nitrato de plata (AgNO₃) destinado al tratamiento de úlceras y más tarde como una forma de evitar que se produjesen infecciones en las heridas. También se ha utilizado sulfadiazina de plata (AgSD) en forma de crema como antibacteriano ante las

quemaduras²³, cuya estructura química aparece representada en la **figura 3**. En este caso, la forma de sal de la plata puede presentar toxicidad ya que es absorbida rápidamente por la piel.

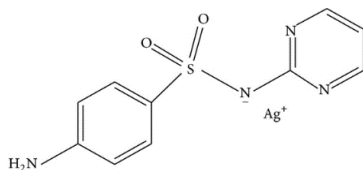


Figura 3. Estructura química de la sulfadiazina de plata. (AgSD)

Últimamente ha aumentado el interés de complejos de Ag como agentes anticancerígenos, en concreto los derivados de Ag(I) debido a que presentan una gran selectividad y citotoxicidad¹⁹. La ventaja que tiene es su baja toxicidad respecto a las células sanas si bien no están exentos de problemas, como lo es la baja biodisponibilidad debido a su rápida precipitación a cloruro de plata en el interior celular²¹⁻²². Estos problemas se pueden solventar diseñando ligandos que aumenten la biodisponibilidad de la plata en el organismo y faciliten la correcta liberación de los iones para que estos puedan dirigirse a su diana de actuación.

Algunos de los ligandos más utilizados en coordinación con plata son los derivados de piridina y benzimidazol, carbenos N-heterocíclicos (NHC), coumarinas, fosfinas y carboxilatos. De todos modos, todavía queda por descubrir su mecanismo de acción concreto, aunque se ha visto que pueden actuar sobre distintas dianas como la producción de especies reactivas de oxígeno, activación de caspasa 3 provocando un proceso apoptótico y la alteración del ciclo celular²². Por ello, su uso como agentes antineoplásicos todavía no está muy extendido y requieren investigaciones más amplias.

En este Trabajo de Fin de Grado se ensayaron complejos de Au(I) y Ag(I) con ligandos N-dadores derivados de la 2-anilino piridina con unidades piridina (L1) y tiofeno (L2). En la **figura 4** se muestra la estructura de los 6 complejos, así como los ligandos libres (denominados L1 y L2). De todos ellos, el ligando trifenilfosfina (PPh₃) aumenta la liposolubilidad del compuesto debido a los 3 grupos fenilo que contiene²⁵. Esta característica facilita su paso a través de la membrana lipídica de las células, favoreciendo la llegada a su diana específica²⁴. Del mismo modo también poseen el anión triflato (TfO), como un contranión que compensa la carga positiva creada al formarse el complejo entre el metal y el ligando. En este trabajo, hemos evaluado si la presencia de las unidades piridina o tiofeno en los ligandos de los distintos complejos afecta a la toxicidad que estos presentan sobre células de adenocarcinoma de colon Caco-2/TC7 así como su selectividad sobre células sanas, es decir, diferenciadas.

3. Objetivos del trabajo

Una vez vistos los antecedentes, en este trabajo se plantearon los siguientes objetivos:

- Estudio del efecto citotóxico de dos familias de complejos metálicos de oro (I) y plata (I) con ligandos derivados de la 2-anilino piridina con los sustituyentes piridina y tiofeno sobre la línea de células de adenocarcinoma de colon humano Caco-2 diferenciadas e indiferenciadas o cancerosas con el fin de establecer su posible selectividad. El estudio sobre las células diferenciadas, semejantes a enterocitos normales, nos permitirá determinar el posible efecto “per se” de los compuestos y por tanto valorar si producen efectos secundarios.
- Determinar si existen diferencias en el comportamiento antitumoral al variar la estructura del ligando, los centros metálicos de oro y plata, así como los ligandos de la esfera de coordinación de dichos metales.
- Determinar el tipo de muerte celular que producen los compuestos ensayados sobre las células Caco-2 indiferenciadas. Asimismo, se estudiará su mecanismo de acción y posibles dianas sobre las que actúan estos complejos metálicos.

Para desarrollar dichos objetivos se han utilizado los ligandos y los complejos que se recogen en la **figura 4**, llevándose a cabo los siguientes estudios:

-Evaluación de la toxicidad mediante ensayos de MTT sobre células Caco-2/TC7.

-Estudios de citometría de flujo para identificar el tipo de muerte inducida (apoptosis o necrosis), así como la evolución del ciclo celular.

-Estado del equilibrio redox en las células mediante estudios de medida de niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) y de porcentaje de actividad de las enzimas redox glutatión reductasa (GR) y tioredoxina reductasa (TrxR).

-Medida de la actividad del proteasoma, complejo formado por subunidades proteolíticas implicado en la expresión de diferentes genes, algunos de ellos relacionados con la carcinogénesis.

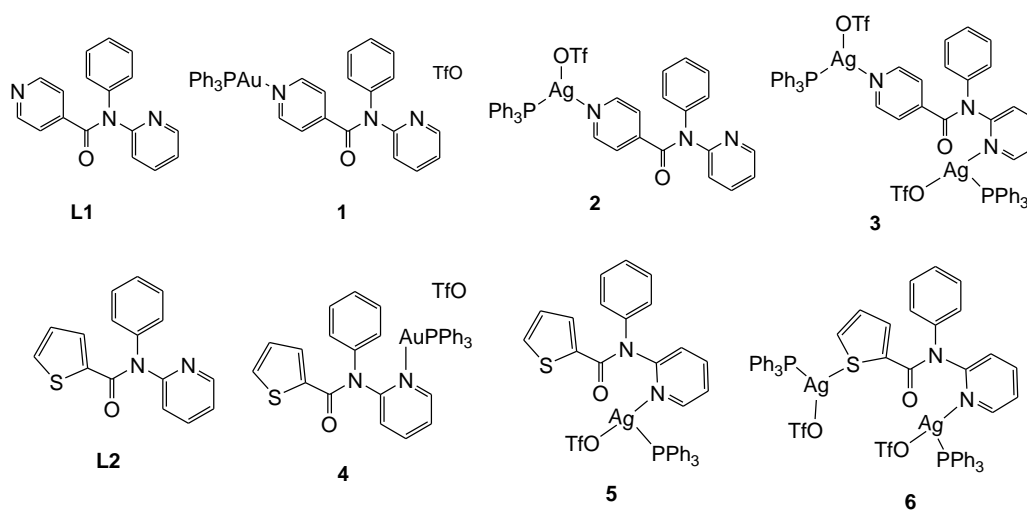


Figura 4. Representación de la estructura de los ligandos L1 y L2, así como de sus correspondientes complejos de Au(I) y Ag(I). **Complejo 1:** $[AuL1(PPh_3)]TfO$; **Complejo 2:** $[AgL1(PPh_3)(OTf)]$; **Complejo 3:** $[Ag_2L1(PPh_3)(OTf)_2]$; **Complejo 4:** $[AuL2(PPh_3)]TfO$; **Complejo 5:** $[AgL2(PPh_3)(OTf)]$; **Complejo 6:** $[Ag_2L2(PPh_3)_2(OTf)_2]$

4. Materiales y métodos

4.1. Preparación de las disoluciones madre

Los complejos metálicos recogidos en la **figura 4**, así como los ligandos L1 y L2, fueron sintetizados previamente en el laboratorio de la Dra. Elena Cerrada en el departamento de Química Inorgánica de la Facultad de Ciencias. Partimos de cada compuesto en forma sólida y para poder llevar a cabo los ensayos, se disolvió cada uno en la cantidad necesaria de DMSO para alcanzar una concentración final de 0,02 M. A partir de dichas disoluciones madre se pueden preparar otras de menor concentración según sea necesario en cada ensayo, llevando a cabo las diluciones correspondientes.

4.2. Cultivo celular

Los estudios biológicos se llevaron a cabo en el laboratorio de la Dra. M.^a Jesús Rodríguez-Yoldi en la Unidad de Fisiología de la Facultad de Veterinaria. El cultivo celular es una forma muy útil de evaluar el efecto de nuevos fármacos debido a que el uso de líneas celulares nos permite reproducir ensayos en material biológico libre de interferencias nerviosas y/o hormonales y sin sacrificio de animales. Se han utilizado células Caco2, en concreto el clon TC7. Estas células se dividen y alcanzan la confluencia pasados 7 días de la siembra y a partir de ese momento comienzan a diferenciarse a enterocitos normales expresando todas las enzimas características del epitelio intestinal²⁶⁻²⁷. Además, la cepa TC7 procede de pasajes tardíos, lo que garantiza la homogeneidad del cultivo. Las células se mantienen en una estufa de CO₂ (Heraeus) a 37°C con 90% de aire y 10% de CO₂.

El medio de cultivo utilizado para el mantenimiento de las células contiene medio de cultivo Dulbecco modificado (DMEM) suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 20%, penicilina (1000U/ml) al 1%, estreptomycin (1000µg/ml) al 1%, aminoácidos no esenciales al 1%, L-glutamina (200mM 100x) y anfotericina (250 U/ml) al 1%. Durante el tratamiento con los compuestos metálicos, al medio de cultivo no se le añade suero fetal bovino.

En el momento en el que las células han alcanzado la confluencia, es necesario realizar un subcultivo. Para ello, se lleva a cabo la tripsinización para separarlas de la caja de cultivo. Cada vez que se tripsinice, se siembra una caja de mantenimiento. El proceso se realiza de la siguiente forma: se retira el medio de cultivo de la caja, se lava con PBS y se añade tripsina. Se deja 10 minutos en la estufa hasta que se hayan separado las células de la caja. Se homogeneiza con una pipeta y se llevan a un tubo Falcon con medio de cultivo para centrifugar 5 minutos a 3900 rpm. Tras este periodo de tiempo se retira el sobrenadante y se añade medio al tubo. A partir de esta suspensión se procede al conteo de células en una cámara de Neubauer mediante el método del azul trypan. Necesitamos sembrar 300.000 células en las cajas de mantenimiento de 25 cm². Se hacen cálculos para determinar la cantidad a añadir de la suspensión celular. En el caso de las placas de 96 pocillos son necesarias 400.000 células en total.

4.3. Evaluación de la viabilidad celular mediante ensayo de MTT

El ensayo de MTT nos permite determinar la toxicidad de los compuestos metálicos sobre el crecimiento de las células. Se basa en la capacidad de las células viables de reducir el compuesto bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa. Mediante este ensayo colorimétrico se puede medir la funcionalidad mitocondrial de un cultivo y determinar su estado tras haber sido sometido a un tratamiento capaz de ejercer un efecto citotóxico sobre él. La reducción metabólica del MTT a azul formazán,

permite evaluar la actividad de la enzima. Por tanto, la intensidad del color será proporcional a la cantidad de células viables.

Para llevar a cabo el ensayo, se siembran 400.000 células en una placa de 96 pocillos y se dejan crecer durante 24 horas. Después se tratan con los compuestos metálicos a distintas concentraciones. En los pocillos control se añade el disolvente en el que se prepararon las disoluciones madre, que es el DMSO. Después del tratamiento las placas se dejan incubando durante 24, 48 ó 72 horas antes de llevar a cabo el ensayo de MTT. Esto se debe a que queremos evaluar el efecto citotóxico de los compuestos tanto a corto como a largo plazo.

Pasado este tiempo, se añade en cada pocillo 10 μ L de MTT (5 mg/ml) que se ha preparado disuelto en PBS y se incuban entre 3 y 4 horas a 37°C. Se añade DMSO a cada pocillo para solubilizar los cristales de formazán y se lee la absorbancia entre 570 y 690 nm en un espectrofotómetro (SPECTROstar Nano, BMG LABTECH).

4.4. Estudio de apoptosis

Para estudiar el tipo de muerte de las células, se recurre a la citometría de flujo. Se utiliza para el marcaje por un lado Anexina V, que se une a la fosfatidilserina en el caso de que se haya translocado a la membrana externa, lo que permitirá determinar si se ha producido apoptosis. Esta se encuentra unida al fluorocromo FITC para su detección. También se marca con yoduro de propidio (PI), colorante fluorescente que se une al DNA, que penetrará en aquellas células con membrana dañada, ya sea porque se encuentren en apoptosis o necrosis.

El ensayo se cuantifica en el Centro de Investigación Biomédica de Aragón (CIBA). En primer lugar, se lavan las células con PBS, se resuspenden en 100 μ L de buffer de unión a Anexina V (10 mM Hepes/NaOH, pH 7,4, 140 mM NaCl, 2,5 mM CaCl₂) y se adicionan 5 μ L de Anexina V y 5 μ L de yoduro de propidio a cada muestra. Se incuban 15 minutos a temperatura ambiente en oscuridad y se añaden 400 μ L de buffer de unión a Anexina V. Se mide la intensidad de fluorescencia durante una hora con el citómetro de flujo FACSARIA BD y se analiza usando el software FACSDIVA BD.

4.5. Estudio del ciclo celular

Muchas veces, las células detienen su crecimiento por la acción de algún agente antitumoral en una fase concreta, normalmente suele ser en fase G1 o G2. En efecto, si se produce una parada del ciclo celular en una fase en concreto nos permitirá determinar el mecanismo de acción mediante el que actúa. Se utiliza citometría de flujo para establecer las células que han incorporado el colorante fluorescente yoduro de propidio, que se une específicamente al DNA de las células, emitiendo a 620 nm. La señal que emitan las células será mayor cuanto mayor sea su proliferación, es decir cuanto más avanzado se encuentre el ciclo.

Dicho ensayo se llevó a cabo en el Centro de Investigación Biomédica de Aragón (CIBA). El protocolo consiste en la fijación de las células en etanol al 70% enfriado con hielo y su almacenaje a 4°C durante 24 horas. A continuación, se lleva a cabo una centrifugación y rehidratación con PBS, previo a la tinción con yoduro de propidio (50 μ g/ml, solución con RNasa a 100 μ g/ml). Se analiza el contenido de las células con un FACSARRAY BD equipado con un láser de iones de argón. El porcentaje de células en cada fase se determina mediante el software de verificación MODIFIT 3.

4.6. Estudio de la activación de la caspasa 3

Las caspasas son enzimas cisteína proteasas que hidrolizan residuos de aspartato. Existen 2 clases: las iniciadoras y ejecutoras. La actividad de las últimas causa la activación del proceso de apoptosis actuando sobre la regulación del ciclo celular²⁸. En este ensayo vamos a determinar los niveles de la caspasa 3 ejecutora con el fin de dilucidar si nuestros complejos están provocando la muerte celular por vía apoptótica.

Como el resto de ensayos que requerían el citómetro de flujo, los estudios fueron determinados en el CIBA. Después del tratamiento de las células con los complejos metálicos, éstas se ponen en formaldehído al 0,01% durante 5 minutos y se centrifugan a 300 g a temperatura ambiente. El pellet de células obtenido se resuspende en una solución de digitonina 0,5% v/v en PBS y se incuba en la oscuridad durante 15 minutos. Tras ello, se lavan con PBS con digitonina al 0,1%. Se añaden los anticuerpos anti-caspasa 3, se mezcla y se incuba durante 1 hora a temperatura ambiente. Se centrifuga 5 minutos a 3000 rpm y se lava dos veces con PBS. Las células se resuspenden en PBS. Se analizó la fluorescencia a 494 nm (excitación) y 520 nm (emisión) mediante citometría de flujo utilizando un FACSARRAY BD equipado con un láser de argón.

4.7. Determinación del potencial mitocondrial

Si se produce apoptosis por vía intrínseca o mitocondrial, puede llevar a la formación de poros en la membrana, alterando los niveles de potencial electroquímico (ψ_m). Debido a que la matriz mitocondrial está negativamente cargada y es permeable a compuestos por los daños sufridos, el uso de una sonda catiónica que se acumula en la matriz permite distinguir las células que se encuentran en apoptosis de las sanas.²⁹

La cuantificación también se realiza en el CIBA. Se lavan las células con PBS, atemperado, dos veces y se resuspenden en PBS a concentración de 10^6 células/mL. Se añade la sonda catiónica DilC1 10 μ M y se incuba 15 minutos a 37°C con 5% de CO₂. Se añade a continuación PBS a la muestra y se analiza la fluorescencia mediante citometría de flujo con un FACSARRAY BD con excitación a 633 nm y emisión a 658 nm.

4.8. Determinación de ROS

Las células cancerígenas se caracterizan por proliferar de forma incontrolada, aumentando enormemente su metabolismo. Esto causa la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), que actúan como segundos mensajeros facilitando la progresión del tumor. Sin embargo, un exceso de ROS puede resultar perjudicial llegando a provocar su muerte. Para hacer frente a este aumento y mantener su proliferación, las células cancerígenas sobreexpresan enzimas antioxidantes como la glutatión reductasa y la tiorredoxina reductasa.³⁰⁻³¹

Este ensayo permite determinar si los complejos estudiados modifican los niveles de ROS y de esta forma poderlo relacionar con alguna inhibición de las enzimas redox y con posibles alteraciones del potencial mitocondrial. Para ello, se siembran las células en una placa de 96 pocillos y se deja que crezcan durante 24 horas. Tras ello, se incuban junto con los compuestos de oro y de plata durante 1 hora a 37°C. El medio se aspira y se lava con PBS con el fin de eliminar todos los restos de color que puedan interferir en las medidas de fluorescencia. Las células se incuban con la sonda fluorescente diclorofluoresceína (DCFH-DA) durante 20 minutos, para que atraviese la membrana de las células. Una vez en el interior es degradada por la enzima esterasa uniéndose después a las ROS. Se aspira el medio y se lava 2 veces con PBS para eliminar los restos de sonda que no hayan penetrado en las células y se mide la fluorescencia en unidades

arbitrarias de fluorescencia en un espectrofotómetro FLUOstar Omega (BMG Labtech). Comparando los datos de fluorescencia respecto al control, se obtiene la medida del tanto por ciento de ROS que se ha generado.

4.9. Inhibición de la enzima tiorredoxina reductasa

Como se ha comentado anteriormente, las células cancerígenas requieren para su proliferación determinados niveles de especies reactivas de oxígeno. Sin embargo, el mantenimiento del estado redox es su principal limitación. Por ello, una de las estrategias a seguir en los tratamientos es la inhibición de enzimas implicadas en mantener el estado redox³¹. Ejemplo de ello son la tiorredoxina reductasa (TrxR) y la glutatión reductasa (GR), que veremos más tarde.

Para estudiar la inhibición de la enzima redox tiorredoxina reductasa se siembran las células en una placa de 96 pocillos y se tratan con los compuestos, dejándolos en incubación 24 horas. Tras este periodo, se añade un buffer de lisis (500 µL TRIS 50 mM y 200 µL EDTA 2 mM) al que se le ha añadido previamente inhibidores de proteasas. Esto se debe a que al llevar a cabo la lisis se van a liberar proteasas como caspasas que no queremos que interfieran en los resultados. Se incuba con 1mL del buffer de lisis durante 20 minutos y en agitación. Añadimos solamente a las filas pares 50 µL de auranofin que es un inhibidor ya conocido de la tiorredoxina reductasa que será utilizado como control a la hora de analizar los resultados. Por último, se añaden 25 µL de buffer de reacción (500 µL PBS pH 7; 80 µL EDTA 100 mM pH 7,5; 20 µL BSA 0,05%; 100 µL NADPH 20 mM; 300 µL H₂O destilada) y 25 µL de DTNB que es sustrato de la enzima. Se añade rápidamente, agitando para evitar que se formen burbujas y se mide la fluorescencia durante 5 minutos en intervalos de 60 segundos.

4.10. Inhibición de la enzima glutatión reductasa

El glutatión es un tripéptido cuya forma reducida (GSH) es uno de los sistemas más importantes de defensa antioxidante del organismo. Además de prevenir el excesivo aumento de ROS participa en la detoxificación de fármacos, lo que puede conllevar el desarrollo de resistencia de los tumores al tratamiento. Tras llevar a cabo su acción protectora, pasa a su estado oxidado (GSSG), por lo que requiere retornar a su estado reducido para seguir degradando especies reactivas, acción en la que participa la enzima glutatión reductasa (GR). La búsqueda de compuestos capaces de inhibir su actividad podría contemplarse como una estrategia prometedora en los tratamientos de quimioterapia.³²⁻³³

Para llevar a cabo el ensayo, se siembran una placa de 96 pocillos a una densidad de 4.000 células por pocillo y se deja crecer durante 24 horas. Se incuba con los compuestos de plata y oro durante otras 24 horas. Se retira el sobrenadante y se añaden 25 µL de buffer RIPA (Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, EDTA 1mM, Tritón X-100 1%, SDS 1%, DOC 1%, NaF 1mM y agua milliQ). Este buffer contiene una mezcla de distintos detergentes como SDS, Tritón X-100 y DOC que actúan lisando las membranas celulares para permitir la salida de los componentes celulares al exterior, entre ellos la enzima glutatión reductasa. Es necesario añadir inhibidores de proteasas a dicho buffer con el fin de evitar la degradación de la enzima cuya actividad estamos determinando. A continuación, se añaden 25 µL de PBS evitando la formación de burbujas. Justo antes de llevar a cabo la medición de absorbancia es necesario añadir tanto la mezcla de reacción que consta de Tris-HCl 0,1 M y NADPH 0,02 mM y 25 µL de solución de glutatión (GSSG). Es importante añadirlo justo antes de realizar la medida porque la reacción ya habrá comenzado. Finalmente, medimos la absorbancia a 340 nm en un espectrofotómetro SPECTROstar Nano (BMG LABTECH).

4.11. Inhibición del proteasoma

El sistema ubiquitina-proteasoma (UPS) está constituido por un núcleo con actividad catalítica (partícula 20S) que está cubierto por dos partículas 19S. En concreto, posee 3 actividades: quimotripsina-like (CT-L), tripsina-like (T-L) y caspasa-like (C-L) que están asociadas a las subunidades $\beta 5$, $\beta 2$ y $\beta 1$ respectivamente³⁴. Se encuentra implicado en la regulación de metabolismo de las células cancerígenas, ya que en ellas es más rápido de lo normal, por lo que también requieren sistemas que les permitan degradar gran cantidad de proteínas. La inhibición de la subunidad $\beta 5$ con actividad quimotripsina-like (CT-L), se ha propuesto como diana de fármacos por favorecer procesos apoptóticos y detener la proliferación de células tumorales.

Para llevar a cabo el ensayo, se sembraron las células Caco-2 en placas de 96 pocillos y se trataron con el complejo de oro o el de plata. Tras la incubación durante 24 h, se procedió a la lisis celular. Para ello, se resuspendieron las células en 400 μ l de saponina 0,05% (en PBS) y se centrifugaron a 13000 rpm durante 15 minutos a 4°C. Tras esto, se recogió en sobrenadante para iniciar el ensayo. En una placa de 96 pocillos se añadió a cada uno 10 μ g de proteína procedente del lisado celular y se completó hasta 100 μ l con tampón de reacción (Tris/HCl 25 mM pH 7,5). Finalmente, se añadió 1 μ l de sustrato de proteasoma N-Suc-L-L-V-T-AMC (SIGMA® SG510) y se incubó a 37°C durante 2 horas. Se midió la fluorescencia con un espectrofotómetro (FLUOstar Omega, BMG LABTECH) con filtros de 360 nm (excitación) y 535 nm (emisión). La cantidad de proteína presente en el lisado celular se determinó mediante el método de Bradford.

Utilizamos como control positivo MG132 (carbобензохи-L-leucil-L-leucil-L-leucinal), un inhibidor conocido de la subunidad $\beta 5$ del proteasoma.

4.12. Análisis estadístico

Todos los ensayos se hicieron un mínimo de 3 veces y en las placas de 96 pocillos se utilizaron siempre al menos 4 pocillos por condición. Con todos los datos obtenidos se hizo la media y se calculó la desviación estándar, que se representa en forma de barras de error. Finalmente, para determinar la significancia se realizó la prueba t Student de dos colas. Se consideraron significativos p-valores iguales o menores a 0,05.

5. Resultados y discusión

5.1. Ensayo de MTT

Este ensayo se llevó a cabo tal y como se ha descrito anteriormente en el apartado de materiales y métodos, determinándose los correspondientes valores de IC_{50} para todos los compuestos tras su incubación durante 72 h (**Tabla 1**) tanto sobre células indiferenciadas (cancerosas) como en diferenciadas, es decir, enterocitos que han llegado a la confluencia. Para llevar a cabo los ensayos en estas últimas, se incubaron con una concentración de los complejos equivalente a las concentraciones del IC_{50} determinadas en el caso de las indiferenciadas. Con este experimento se pretendió estudiar el posible efecto de los derivados metálicos sobre las células no cancerosas, estudiando de esta forma su selectividad.

Tabla 1. Valores de IC_{50} obtenidos tras 72 h de tratamiento con los ligandos y con los complejos metálicos, tanto en células cancerosas Caco-2/TC7 como en células diferenciadas. Del mismo modo, en cada caso se indica el parámetro “selectivity index”.

Compuesto	IC_{50} (μ M)		Selectivity Index (SI)
	No diferenciadas	Diferenciadas	
L1	>100	>100	1,00
L2	>100	>100	1,00
Complejo 1	2,68 \pm 0,33	23,62 \pm 7,46	8,82
Complejo 2	5,52 \pm 1,90	14,89 \pm 5,47	2,70
Complejo 3	0,26 \pm 0,33	10,88 \pm 2,82	42,01
Complejo 4	4,52 \pm 0,27	11,64 \pm 0,44	2,57
Complejo 5	7,11 \pm 0,92	10,61 \pm 4,55	1,49
Complejo 6	14,41 \pm 2,60	29,41 \pm 5,58	2,04

Los resultados obtenidos y recogidos en la **Tabla 1** muestran la ineficacia de los ligandos L1 y L2 por sí solos, es decir, sin la presencia del metal, de ahí los elevados valores de IC_{50} obtenidos en ambos casos. Este resultado no es sorprendente y demuestra la necesidad de su coordinación a un centro metálico para mostrar algún tipo de actividad antitumoral. Igualmente se observa que los complejos coordinados al ligando L2 (complejos **4**, **5** y **6**) son menos efectivos que los que contienen el ligando L1 (complejos **1**, **2** y **3**). La mayor diferencia se encuentra entre los complejos dinucleares de plata (complejos **3** y **6**), siendo el complejo **3** unas 50 veces más efectivo que su homólogo con el ligando L2. La diferencia entre las dos familias de complejos está en el sustituyente de la molécula de 2-anilino piridina, siendo una piridina en el caso de L1 y una unidad tiofeno en L2. La coordinación a los centros metálicos de Au y Ag tiene lugar a través del átomo de nitrógeno de dicha unidad piridina en los complejos con L1, mientras que el azufre del anillo tiofeno del ligando L2 queda libre en los complejos **4** y **5**. Parece que la ausencia de coordinación al tiofeno, mantiene la citotoxicidad de dichos complejos en un orden similar a sus congéneres **1** y **2**. Sin embargo, la incorporación de una unidad AgPPh₃ extra a la unidad tiofeno, reduce drásticamente dicha actividad, al haber retirado la densidad electrónica del átomo de S.

Para elegir los compuestos más efectivos de entre los 6 que estamos estudiando para un posible tratamiento, determinamos el parámetro SI “selectivity index” o índice de selectividad, que corresponde al cociente entre los IC_{50} calculado en las células diferenciadas y el IC_{50} obtenido en

las células cancerosas. De esta forma, aquellos compuestos que tengan un valor más alto de este parámetro serán más selectivos y por ello, seguiremos con su estudio en los siguientes ensayos.

De entre todos ellos, destaca el complejo **3**, por su elevado valor de SI. Se trata del compuesto más efectivo sobre células cancerosas, ya que disminuye su población al 50 % a muy bajas concentraciones. Por el contrario, se observa un valor más bajo de IC_{50} en células diferenciadas, pero como el error no es muy grande se puede considerar que este resultado es reproducible.

El resto de compuestos son menos efectivos, por ejemplo el complejo **6** es el más selectivo de todos sobre células diferenciadas (mayor IC_{50} en células no cancerosas) pero es menos efectivo también sobre las tumorales, por lo que requiere mayores concentraciones para lograr su muerte. Esto hace que sea un candidato menos adecuado como agente quimioterápico, ya que queremos administrar la mínima dosis que sea posible para disminuir la población de células tumorales.

Por tanto, de acuerdo con lo que se ha comentado, para llevar a cabo los siguientes ensayos hemos escogido los complejos **1**, **2** y **3** (Complejo 1: $[AuL1(PPh_3)]TfO$; Complejo 2: $[AgL1(PPh_3)(OTf)]$; Complejo 3: $[Ag_2L1(PPh_3)(OTf)_2]$), que son los que presentan los valores más bajos de IC_{50} en células cancerosas y mayor selectividad respecto a las células sanas, reflejado en el mayor índice de selectividad (selectivity index).

Como confirmación de que los 3 complejos elegidos son selectivos sobre células cancerosas y no afectan al crecimiento de células sanas, se llevaron a cabo estudios de viabilidad en células diferenciadas tratadas a la concentración del IC_{50} obtenida para las células cancerosas. En ninguno de los casos se observa una disminución significativa de la viabilidad respecto al control (**figura 5**), lo que indica que son capaces de cumplir su función como fármaco sin tener efectos secundarios sobre la proliferación de células sanas.

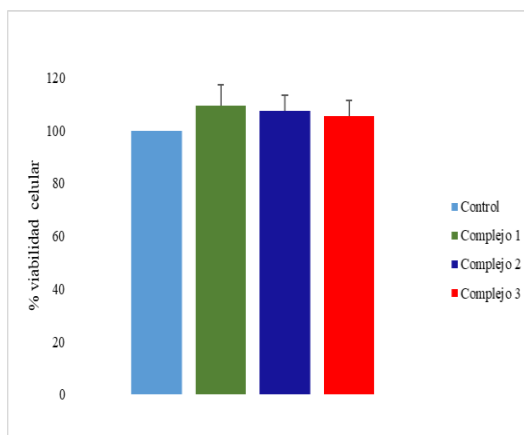


Figura 5. Viabilidad en células Caco-2 diferenciadas obtenida tras el tratamiento durante 72h con los complejos **1**, **2** y **3** a concentraciones del IC_{50} . Se compara con un control negativo, tratado con DMSO.

Se llevó a cabo un estudio adicional para estos 3 complejos con el fin de comprobar el efecto que tenían sobre la proliferación celular con tiempos de tratamiento menores (24 y 48 horas). Los resultados obtenidos se muestran en la **figura 6**.

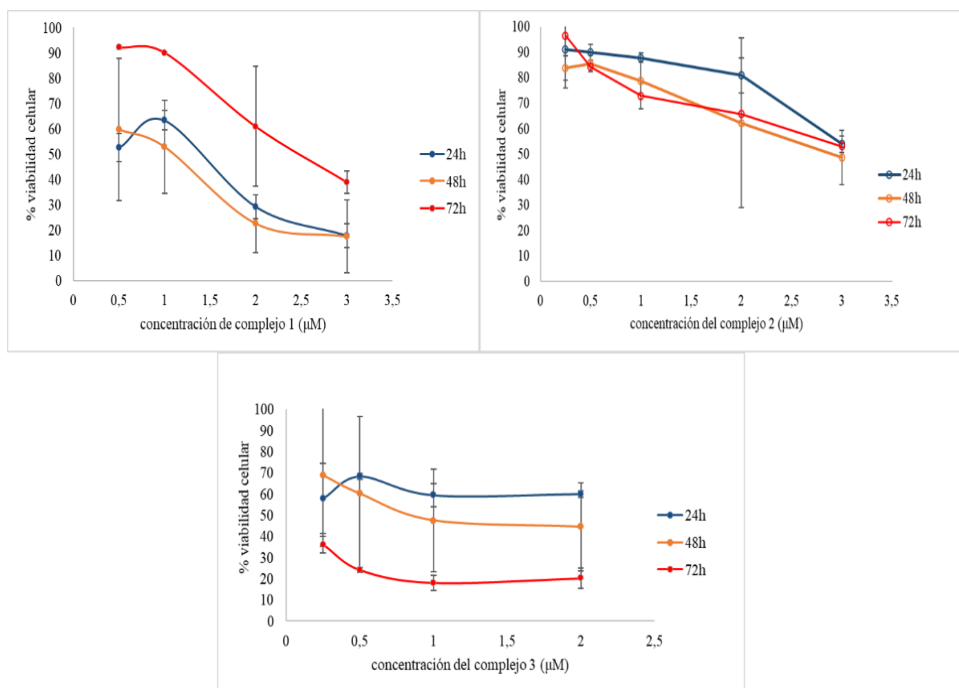


Figura 6. Curvas de dosis-respuesta obtenidas para evaluar el efecto de los complejos 1, 2 y 3 sobre la viabilidad celular. Estos complejos se añadieron a las concentraciones de 3, 2, 1, 0,5 y 0,25 μM en primer lugar durante 72 horas para determinar el IC_{50} . Posteriormente se trató a las mismas concentraciones pero a menores tiempos (24 y 48 horas), con el fin de evaluar su efecto a corto plazo.

En el caso del complejo 1 ($[\text{AuL1}(\text{PPh}_3)]\text{TfO}$) se observa una disminución de la viabilidad a 24 y 48 horas de tratamiento. Sin embargo, a mayores tiempos de tratamiento (72 horas) en el mismo rango de concentraciones, se observa una viabilidad inicial mayor y esta se mantiene moderadamente alta incluso a la mayor concentración ensayada (3 μM). Esto se puede deber a que el compuesto se ha degradado con el tiempo, quizás por la temperatura y ya no es efectivo sobre las células cancerosas. Se obtienen errores bastante grandes, sobre todo a bajas concentraciones ya que al trabajar con cantidades tan pequeñas de producto tenemos más imprecisión en los resultados.

En cuanto a la curva de viabilidad correspondiente al complejo 2 ($[\text{AgL1}(\text{PPh}_3)(\text{OTf})]$) la viabilidad se reduce con el paso del tiempo, aunque no de forma tan llamativa como el resto de complejos en estudio, siendo mayor el descenso a las 72h.

Por último, en la curva del complejo 3 ($[\text{Ag}_2\text{L1}(\text{PPh}_3)(\text{OTf})_2]$) se observa un ligero descenso de la viabilidad entre las 24 y 48 horas de tratamiento y se produce un descenso mucho mayor con el tratamiento a las 72 horas, llegando a niveles de viabilidad mucho menores a las concentraciones más altas de estudio (20 % de viabilidad a concentración 2 μM). Al aumentar la concentración se observa una ligera disminución de la viabilidad, no es un cambio tan grande debido a que probablemente quedan pocas células vivas. Todos estos resultados se corresponden con el menor IC_{50} antes calculado y su alta selectividad, lo que lo hacen el compuesto más eficaz de todos. Sin embargo, debido a que el producto se agotó se ajustó el volumen de DMSO de la disolución a una cantidad menor. Esto llevó al descarte de los resultados obtenidos con este

complejo en los siguientes experimentos, ya que su baja concentración podía provocar falsos negativos en los resultados.

A la vista de todos estos resultados, realizaremos el resto de ensayos con los compuestos 1 y 2 a tiempos de incubación de 48 h con el fin de evitar la presencia de una gran cantidad de células muertas que puedan interferir en los resultados obtenidos.

5.2. Estudio de apoptosis y ciclo celular

Como ya se ha comentado anteriormente, para determinar el tipo de muerte que producen los complejos en las células se han utilizado dos sondas fluorescentes: Anexina V-FITC y yoduro de propidio (PI). Al llevar a cabo la citometría de flujo se obtiene un histograma en el que aparecen recogidas 4 poblaciones de células: las vivas que no tienen fluorescencia, las células que se encuentran en apoptosis temprana y tardía, así como las células necróticas (**figura 7**).

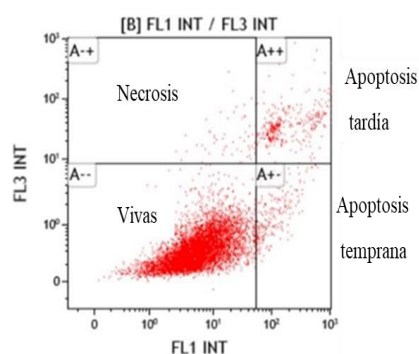


Figura 7. Histograma obtenido tras la citometría de flujo. El incremento de fluorescencia de anexina V-FITC se encuentra representado en el eje de abscisas y el de PI en el eje de ordenadas.

Por tanto, en el cuadrante A- - se encuentran las células menos marcadas que se corresponden con la población sana, conforme avanza hacia la derecha en el cuadrante A+- muestra las células en apoptosis temprana. Esto se debe a que se ha translocado la fosfatidilserina a la membrana externa y se ha unido a ésta la Anexina V-FITC aumentando la fluorescencia obtenida. En el cuadrante A++ se observan las células en apoptosis tardía en las que su membrana se ha fragmentado, permitiendo la entrada de PI que se une al DNA. Por último, en el cuadrante A-+ se encuentran las células en necrosis, ya que su membrana está dañada y ello ha permitido la entrada de PI.

En este caso, no nos interesa obtener altos porcentajes de células que se encuentren en necrosis ya que éstas liberan su contenido citoplasmático al exterior celular, induciendo la producción de citoquinas lo que lleva a una situación de inflamación. Esto provocaría efectos secundarios en los pacientes al utilizar el compuesto como fármaco

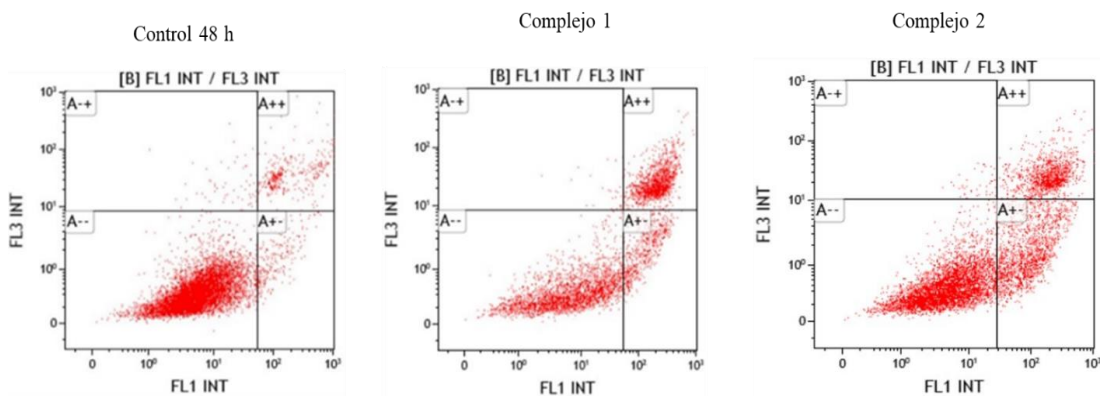


Figura 8. Histogramas obtenidos en el citómetro de flujo para células tratadas con DMSO (control 48h) y con los complejos de oro y plata. A--: células sanas A+-: apoptosis temprana A++: apoptosis tardía A-+: necrosis

Tabla 2. Porcentaje de células vivas y en estado de apoptosis tanto temprana como tardía y necróticas determinadas por el citómetro de flujo tras el tratamiento durante 48 h con los complejos 1 y 2.

Compuesto	% células muertas			
	% vivas	% necrosis	% apoptosis temprana	% apoptosis tardía
Control	92,1	0,71	2,72	4,46
Complejo 1	56,22	0,49	12,04	31,25
Complejo 2	62,33	0,56	20,93	16,18

Respecto a los resultados obtenidos recogidos en la **figura 8** y en la **Tabla 2**, se puede concluir que el complejo **1** ([AuL1(PPh₃)]TfO) produce apoptosis sobre las células tratadas, reduciendo considerablemente el porcentaje de células vivas respecto al control y provocando un aumento del orden de 6 y 7 veces de células que se encuentran en apoptosis temprana y tardía, respectivamente. En el caso del complejo **2** ([AgL1(PPh₃)(OTf)) se observa que también produce apoptosis pero es ligeramente menos efectivo y un mayor porcentaje de células se mantiene en apoptosis temprana. En ambos casos se observan bajos porcentajes de células necróticas, lo que es adecuado para evitar procesos inflamatorios durante el tratamiento, como se ha dicho anteriormente.

5.3. Estudios de ciclo celular

Los agentes quimioterápicos suelen provocar paradas del ciclo celular, impidiendo su división incontrolada. Esta se suele producir en fase G1 o G2.

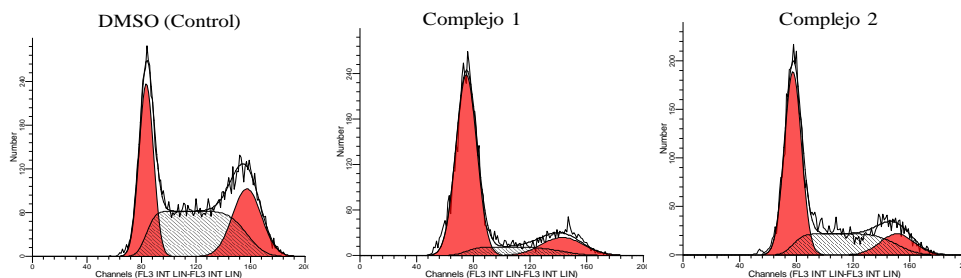


Figura 9. Gráficas obtenidas tras el ensayo del estudio del ciclo celular realizado en el citómetro. Las células se trataron durante 48 horas con DMSO en el caso del control o con los complejos 1 y 2.

Tabla 3. Porcentaje de células presentes en las distintas fases del ciclo celular: G1, S y G2.

Compuesto	G1	S	G2
Control	30,85 %	44,98 %	24,18 %
Complejo 1	72,51 %	12,82 %	14,66 %
Complejo 2	55,64 %	31,45 %	12,91 %

De los resultados obtenidos y que se resumen en la **figura 9** y **Tabla 3** se puede deducir que el complejo **1** provoca un arresto en la fase G1 ya que el porcentaje de células aumenta respecto al control. En el caso del complejo **2** se produce de nuevo un arresto en la fase G1 pero es menor que el del caso anterior y parte de las células siguen el ciclo hacia la fase S. Dicho aumento de la población de células en la fase G1 es habitual en otros complejos de oro como auranofin, entre otros.

5.4. Activación de la Caspasa 3

La activación de la caspasa 3 (**figura 10**) aumenta más de 10 veces para el complejo **1** ([AuL1(PPh₃)]TfO) observándose también una notable activación y en el caso complejo **2** ([AgL1(PPh₃)(OTf])). Igualmente, estos datos se correlacionan con lo visto en la **tabla 2**, que indicaba el mayor porcentaje de células en apoptosis tras el tratamiento con el complejo **1**. No se presentan errores ya que no se pudieron obtener resultados similares en una nueva repetición del ensayo aunque si con la misma tendencia. Nuevos experimentos son necesarios para comprobar si los resultados muestran diferencias significativas.

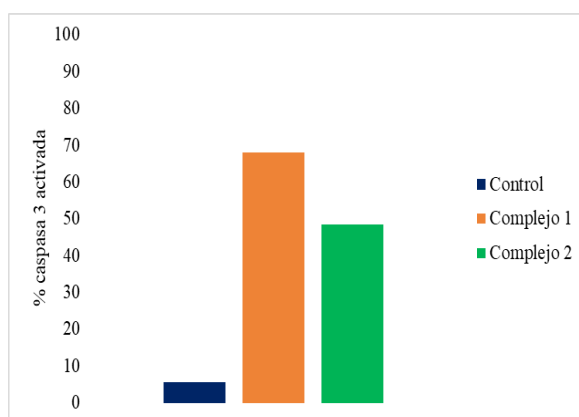


Figura 10. Porcentaje de células que presentan caspasa 3 activada tras el tratamiento durante 48 h con el complejo **1** (2 μ M) y el complejo **2** (5 μ M).

5.5. Determinación del Potencial mitocondrial

El ensayo se llevó a cabo para comprobar si el complejo **1** ([AuL1(PPh₃)]TfO) provoca apoptosis por vía mitocondrial, como se ha visto en anteriores estudios con complejos de oro³⁵. Esto implica daños en su membrana que alteran su permeabilidad y el potencial electroquímico (ψ_m)³⁶. Además, se ensayó también el complejo **2** ([AgL1(PPh₃)(OTf)]) en el que el ligando L1 está unido a un centro de plata (I) desconociéndose si podría actuar a través de este mecanismo.

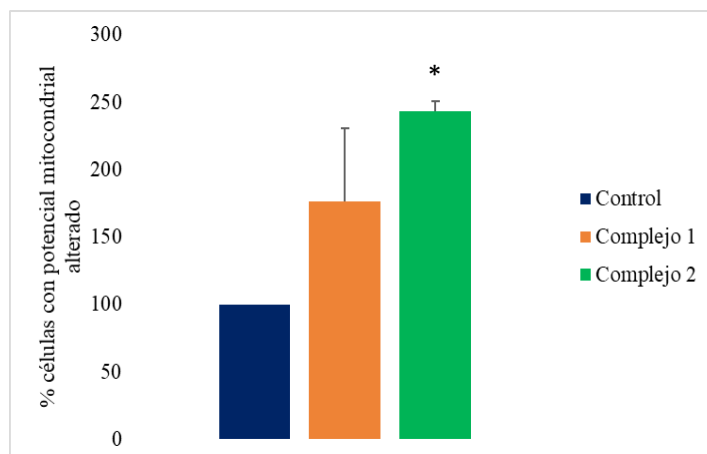


Figura 11. Células que presentan el potencial mitocondrial (ψ) alterado tras el tratamiento durante 48 h con el complejo 1 ($2\mu\text{M}$) y el complejo 2 ($5\mu\text{M}$). Los datos representados se han obtenido normalizando los resultados obtenidos respecto al control, tomando este como 100 %, por ello el control no presenta barras de error. En el caso que se haya obtenido un p-valor igual o menor a 0,05 en la prueba t de Student de dos colas, se indica con un asterisco (*). Ello indica que el aumento de células con el potencial alterado es significativo.

Se observa en la **figura 11** que para ambos casos aumentan el número de células que poseen mitocondrias con el potencial alterado respecto al control, siendo éste mayor y significativo en el caso del **complejo 2**, lo cual parece indicar que este compuesto altera el potencial mitocondrial probablemente debido a un desequilibrio redox celular.

No se podría asegurar con certeza que se produzca la apoptosis por vía mitocondrial, para ello serían necesarios estudios adicionales de niveles de otras proteínas implicadas en el proceso de apoptosis mitocondrial tales como Bax, Bcl-2 o citocromo c. En el siguiente ensayo comprobaremos si esta alteración del potencial se correlaciona con elevados niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS).

5.6. Determinación de ROS

Una de las estrategias que se persiguen a la hora de administrar quimioterápicos es la alteración de la homeostasis de especies reactivas de oxígeno (ROS), que termina provocando la muerte celular debido al intenso estrés oxidativo³⁰.

Tal y como se puede apreciar en la **figura 12**, el complejo 1 ($[\text{AuL1}(\text{PPh}_3)]\text{TfO}$) provoca un aumento significativo de las especies reactivas de oxígeno tanto a su concentración de IC_{50} como al doble del IC_{50} . En el caso del complejo 2 ($[\text{AgL1}(\text{PPh}_3)(\text{OTf})]$) no se obtienen valores significativos de producción de ROS a la concentración de IC_{50} pero si al doble de ella, lo que puede sugerir que este no sea su principal mecanismo de acción. Otra posible hipótesis es que el tiempo de incubación de 1 hora no fuera suficiente para que el compuesto actuara, ya que, en ensayos anteriores realizados en el grupo de trabajo, se han obtenido mejores resultados con tiempos de incubación de hasta 2 horas.

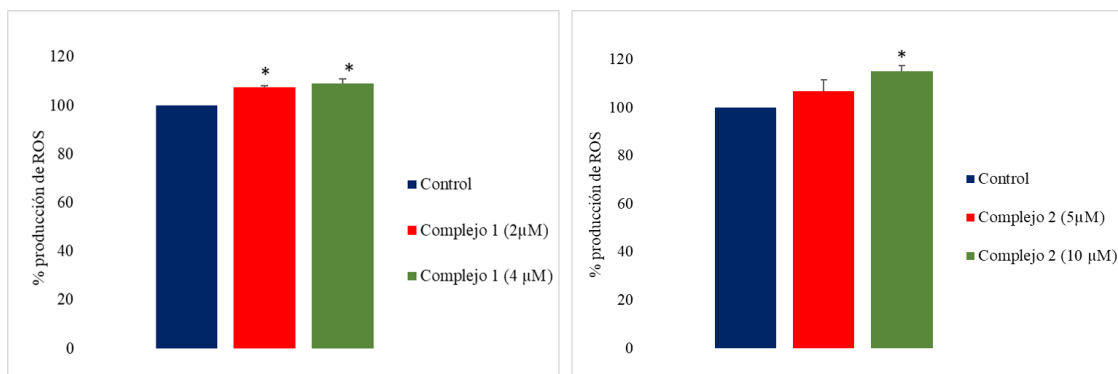


Figura 12. Porcentaje de especies reactivas de oxígeno (ROS) generadas tras el tratamiento durante 24 horas con los complejos a concentraciones correspondientes a su IC_{50} y $2IC_{50}$. Se comparan los resultados respecto a un control negativo tratado durante el mismo tiempo con DMSO. En el caso que se haya obtenido un p-valor igual o menor a 0,05 en la prueba t de Student de dos colas, se indica con un asterisco (*). Ello indica que el aumento de producción de ROS observado es significativo.

En todo caso, hay que considerar que estamos comparando este aumento respecto a un control, que, al tratarse de células cancerígenas, tendrá por sí misma dichos niveles elevados. Por ello, en los siguientes ensayos se va a comprobar si dicho aumento de ROS se debe a que alguno de nuestros complejos está inhibiendo alguna enzima antioxidante.

5.7. Inhibición de la enzima tiorredoxina reductasa (TrxR)

En estudios anteriores, se ha visto que las células cancerígenas no solo sobreexpresan dicha enzima para defenderse del estrés oxidativo, sino que también está implicada en la resistencia a agentes quimioterápicos. Por ello, la búsqueda de nuevos compuestos que tengan como diana la inhibición de la tiorredoxina reductasa contribuirá a la reducción de la progresión tumoral por dos vías: por un lado, desequilibrando la homeostasis redox y por el otro evitando la resistencia a otros fármacos³¹.

Existen evidencias de que los complejos de Au(I) interaccionan con la TrxR gracias a la presencia de unidades de selenocisteína¹⁷, produciendo una inhibición de su actividad. Sin embargo, en el caso de complejos de Ag(I), no está tan claro que tengan el mismo mecanismo. Observando los resultados de la **figura 13** se deduce la probable interacción del complejo **1** con la tiorredoxina reductasa, ya que reduce significativamente su actividad. Esto se correlaciona con los elevados niveles de ROS que presentaba el mismo, tal y como se vio en la **figura 12**. Además, se ha visto que esta enzima podría actuar como defensa antiapoptótica³¹. Este hecho se correspondería con un mayor porcentaje de células en apoptosis tardía, como mostraba la **tabla 2**. Por otro lado, la inhibición producida por el complejo **2** no es significativa y el error es muy grande, por lo que este dato es poco fiable y puede que se deba a algún fallo cometido durante la realización del protocolo. Por lo tanto, sería aconsejable repetir el experimento

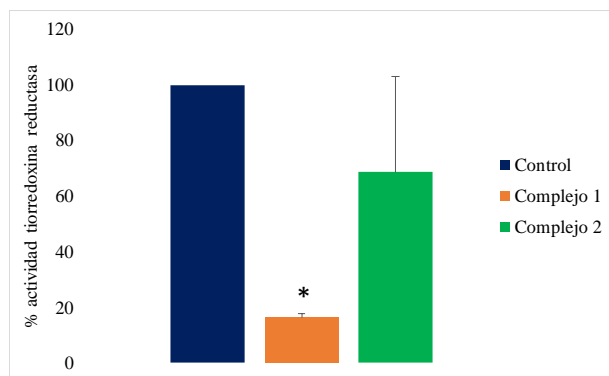


Figura 13. Niveles de actividad de la TrxR debido a su interacción con los complejos 1 (2 μ M) y 2 (5 μ M) tras su incubación durante 24 horas. En el caso que se haya obtenido un p-valor igual o menor a 0,05 en la prueba t de Student de dos colas, se indica con un asterisco (*). Ello indica que el aumento de actividad observado es significativo.

.5.8. Inhibición de la enzima glutatión reductasa

En la **Figura 14** se observa cómo aumenta la actividad glutatión reductasa tanto para el **complejo 1** de oro como para el **2** de plata, en este último de forma significativa. La causa de la sobreexpresión de dicha enzima antioxidante puede deberse al gran aumento de ROS que se está produciendo en la célula, esto lleva a la acumulación de glutatión oxidado (GSSG) que deberá ser reducido de nuevo (GSH) con el fin de paliar el estrés oxidativo. Las células cancerosas requieren unos determinados niveles de estas especies reactivas para sobrevivir, pero su aumento excesivo puede acabar en muerte. Por ello, buscan otros mecanismos de defensa alternativos para compensar la inhibición de otras enzimas como la TrxR (**figura 13**).

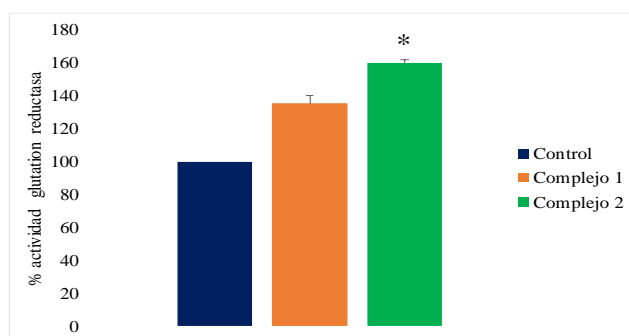


Figura 14. Actividad de la enzima glutatión reductasa tras el tratamiento durante 24 horas con el complejo 1 (2 μ M) y el complejo 2 (5 μ M) en comparación con un control negativo que se trató con DMSO. Se indica con un asterisco (*) si se ha obtenido un p-valor igual o menor a 0,05 en la prueba t Student, lo que significa que el aumento de actividad es significativo.

Este es el caso de la enzima glutatión reductasa (GR), que además de cumplir esta función redox, al generar glutatión interviene en la detoxificación de fármacos. Por ello, esta sobreexpresión como mecanismo de defensa podría acabar generando resistencia a los quimioterápicos.

Se ha visto que el glutatión reducido (GSH), puede reducir a la tiorredoxina cuando la tiorredoxina reductasa está inhibida, con el fin de compensar la falta del balance en su homeostasis redox³⁷, que es lo que probablemente ocurre en este caso con los complejos estudiados.

5.9. Inhibición del proteasoma

En la **figura 15** se observa una clara inhibición de la actividad CT-L del proteasoma tras una incubación de las células con el complejo **1**, por lo que actúa específicamente sobre la subunidad $\beta 5$. En el caso del complejo **2**, que contiene plata, no se observa apenas disminución de la actividad por lo que probablemente el proteasoma no sea su diana.

En este caso no se presentan errores, son datos preliminares porque no hubo tiempo de repetir el ensayo. Existen observaciones que relacionan al proteasoma como un componente esencial de las células cancerígenas, manteniendo el correcto balance entre proteínas pro y antiapoptóticas. La inhibición de su actividad catalítica puede llevar al aumento de las primeras y a la degradación de las segundas, facilitando su entrada en apoptosis³⁴.



Figura 15. Inhibición de la actividad CT-L correspondiente a la subunidad $\beta 5$ del proteasoma en células Caco-2/TC7 tras 48 horas de tratamiento con el complejo **1** ($2\mu\text{M}$) y el complejo **2** ($5\mu\text{M}$). Se compara respecto a un control negativo, tratado con DMSO.

6. Conclusiones

-Los complejos ensayados disminuyen la viabilidad de células Caco-2/TC7, siendo más efectivos los que llevan el ligando con la unidad de piridina (complejos **1**, **2** y **3**) que con la unidad tiofeno (complejos **4**, **5** y **6**)

-En cuanto a la selectividad, los complejos **1**, **2** y **3** ([AuL1(PPh₃)]TfO, [AgL1(PPh₃)(OTf)] y [Ag₂L1(PPh₃)(OTf)₂] respectivamente) presentan los mayores valores de índice de selectividad (selectivity index - SI). Su acción aumenta con tiempos de incubación largos (48h).

- El complejo **1** provoca apoptosis de un mayor número de células, mientras que también retiene un porcentaje considerable de ellas en la fase del ciclo celular G1 e impide su división y por tanto, su proliferación. Esto se relaciona con los altos niveles de caspasa 3 activada y la alteración del potencial mitocondrial, que sugiere la vía apoptótica intrínseca. Sin embargo, se necesitarían más ensayos, como la determinación de los niveles de Bcl-2, para probarlo.

- El complejo **1** aumenta la cantidad de especies reactivas de oxígeno (ROS) a concentraciones de IC₅₀. En el caso del complejo **2** este aumento solo es significativo a concentraciones de 2IC₅₀, sugiriendo la necesidad de un mayor tiempo de incubación para llevar a cabo su efecto.

- El complejo **1** es capaz de inhibir la actividad de la enzima tiorredoxina reductasa (TrxR) en mayor medida que su homólogo de plata el complejo **2**. Esto provocará la necesidad de la sobreexpresión de otras enzimas como sucede con la Glutación Reductasa para mantener la homeostasis redox.

-El proteasoma, en concreto su actividad CT-L correspondiente a la subunidad catalítica β5, se encuentra inhibida fuertemente por el complejo **1**, lo que parece indicar que esta se trata de una diana adicional. Sin embargo el complejo con plata no modifica en ninguna medida dicha actividad, descartándolo como posible diana.

6. Conclusions

- All the complexes essayed reduce the viability of Caco-2/TC7 cells, being more effective those derivatives with pyridine ligands in their structure (complexes **1**, **2** and **3**) compared to those with thiophene moiety (complexes **4**, **5** and **6**).

- Complexes **1**, **2** and **3** are the most selective, which is shown in their bigger values of selectivity index (SI). They are more effective at long times of incubation (48h).

- Complex **1** trigger apoptosis in a bigger percentage of cells and retains most of them in the G1 phase of the cell cycle. This is related with the elevated levels of caspase 3 activated and the alteration of mitochondrial potential. This could suggest that complex **1** cause intrinsic apoptosis, but more essays are required to show that, like evaluation of Bcl-2 protein levels.

-Complex **1** increase levels of reactive oxygen species at a concentration equivalent at IC₅₀ whereas complex **2** require more concentration (2IC₅₀) to induce the same effect. This could suggest that a longer time of incubation than the essayed (1 h) is needed to cause effect in cells.

-Related to the interaction with thioredoxin reductase (TrxR), complex **1** binds it causing inhibition to a greater extent. This will cause the sobreexpresion of other enzymes like Glutathione Reductase in order to maintain the redox homeostasis.

-Proteasome, specifically the chymotrypsin like (CT-L) activity related to the catalytic subunit β5 is inhibited by complex **1**, probably this is one of his targets. In complex **2**, the activity is barely decreased, so this isn't its target.

7. Referencias

1. Kuipers EJ, Grady WM, Lieberman D, Seufferlein T, Sung JJ, Boelens PG, et al. Colorectal cancer. *Nat Rev Dis Primers*. **2015**; 1:15065.
2. Fearon ER. Molecular Genetics of Colorectal Cancer. *Annu Rev Pathol: Mechanisms of Disease*. **2011**;6(1):479-507.
3. De Rosa M, Pace U, Rega D, Costabile V, Duraturo F, Izzo P, et al. Genetics, diagnosis and management of colorectal cancer (Review). *Oncol Rep*. **2015**;34(3):1087-96.
4. Schmitt SM, Frezza M, Dou QP. New applications of old metal-binding drugs in the treatment of human cancer. *Front Biosci (Schol Ed)*. **2012**;4:375-91.
5. Dasari, S.; Tchounwou, P. B., Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *Eur J Pharmacol* **2014**, *740*, 364-78.
6. Bergamo A, Dyson PJ, Sava G. The mechanism of tumour cell death by metal-based anticancer drugs is not only a matter of DNA interactions. *Coord Chem Rev*. **2018**; 360:17-33.
7. Palermo G, Magistrato A, Riedel T, von Erlach T, Davey CA, Dyson PJ, et al. Fighting Cancer with Transition Metal Complexes: From Naked DNA to Protein and Chromatin Targeting Strategies. *ChemMedChem*. **2016**;11(12):1199-210.
8. Raffel J, Bhattacharyya AK, Gallegos A, Cui H, Einspahr JG, Alberts DS, et al. Increased expression of thioredoxin-1 in human colorectal cancer is associated with decreased patient survival. *J Lab Clin Med*. **2003**;142(1):46-51.
9. Arlt A, Bauer I, Schafmayer C, Tepel J, Mürköster SS, Brosch M, et al. Increased proteasome subunit protein expression and proteasome activity in colon cancer relate to an enhanced activation of nuclear factor E2-related factor 2 (Nrf2). *Oncogene*. **2009**;28(45):3983-96.
10. Wang B, Wu S, Lin Z, Jiang Y, Chen Y, Chen Z-S, et al. A personalized and long-acting local therapeutic platform combining photothermal therapy and chemotherapy for the treatment of multidrug-resistant colon tumor. *Int J Nanomedicine*. **2018**;13:8411-27.
11. Tülüce Y, Ahmed BA, Koyuncu İ, Durgun M. The cytotoxic, apoptotic and oxidative effects of carbonic anhydrase IX inhibitor on colorectal cancer cells. *J Bioenerg Biomembr*. **2018**;50(2):107-116.
12. Seeber A, Gunsilius E, Gastl G, Pircher A. Anti-Angiogenics: Their Value in Colorectal Cancer Therapy. *Oncol Res Treat*. **2018**;41(4):188-93.
13. Passardi A, Canale M, Valgiusti M, Ulivi P. Immune Checkpoints as a Target for Colorectal Cancer Treatment. *Int J Mol Sci*. **2017**;18(6):1324.
14. Berners-Price SJ. Gold-Based Therapeutic Agents: A New Perspective. In *Bioinorganic Medicinal Chemistry*, Alessio, E., Ed. Wiley-VCH Verlag GmbH: Weinheim, **2011**; pp 197-221.

- 15.Frezza M, Hindo S, Chen D, Davenport A, Schmitt S, Tomco D, et al. Novel Metals and Metal Complexes as Platforms for Cancer Therapy. *Curr Pharm Des.* **2010**;16(16):1813-25.
- 16.Trudu F, Amato F, Vaňhara P, Pivetta T, Peña-Méndez EM, Havel J. Coordination compounds in cancer: Past, present and perspectives. *J Appl Biomed.* **2015**;13(2):79-103.
- 17.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. *Coord Chem Rev* **2009**, 253 (11-12), 1692-1707.
- 18.Chen, X.; Yang, Q.; Xiao, L.; Tang, D.; Dou, Q. P.; Liu, J., Metal-based proteasomal deubiquitinase inhibitors as potential anticancer agents. *Cancer Metastasis Rev* **2017**, 36 (4), 655-668.
- 19.Casini, A.; Messori, L., Molecular mechanisms and proposed targets for selected anticancer gold compounds. *Curr Top Med Chem* **2011**, 11 (21), 2647-60.
- 20.Iacopetta D, Mariconda A, Saturnino C, Caruso A, Palma G, Ceramella J, et al. Novel Gold and Silver Carbene Complexes Exert Antitumor Effects Triggering the Reactive Oxygen Species Dependent Intrinsic Apoptotic Pathway. *ChemMedChem.* **2017**;12(24):2054-65.
- 21.Ndagi U, Mhlongo N, Soliman ME. Metal complexes in cancer therapy – an update from drug design perspective. *Drug Des Devel Ther.* **2017**; 11:599-616.
- 22.Marloye M, Berger G, Gelbcke M, Dufrasne F. A survey of the mechanisms of action of anticancer transition metal complexes. *Future Med Chem.* **2016**;8(18):2263-86.
- 23.Konop M, Damps T, Misicka A, Rudnicka L. Certain Aspects of Silver and Silver Nanoparticles in Wound Care: A Minireview. *J Nanomater.* **2016**; 2016:10.
- 24.Medici S, Peana M, Crisponi G, Nurchi VM, Lachowicz JI, Remelli M, et al. Silver coordination compounds: A new horizon in medicine. *Coord Chem Rev.* **2016**;327-328:349-59.
- 25.Lima JC, Rodriguez L. Phosphine-gold(I) compounds as anticancer agents: general description and mechanisms of action. *Anticancer Agents Med Chem.* **2011**;11(10):921-8.
- 26.Sambuy Y, De Angelis I, Ranaldi G, Scarino ML, Stamatii A, Zucco F. The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics. *Cell Biol Toxicol.* **2005**;21(1):1-26.
- 27.Lea T. Caco-2 Cell Line. En: Verhoeckx K, Cotter P, López-Expósito I, Kleiveland C, Lea T, Mackie A, et al., editores. The Impact of Food Bioactives on Health: in vitro and ex vivo models [Internet]. *Cham (CH): Springer*; **2015** [citado 26 de junio de 2019]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK500149/>
- 28.Circu ML, Aw TY. Reactive oxygen species, cellular redox systems and apoptosis. *Free Radic Biol Med.* **2010**;48(6):749-62.
- 29.Elmore S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol.* **2007**;35(4):495-516.

30. Glasauer A, Chandel NS. Targeting antioxidants for cancer therapy. *Biochem Pharmacol.* **2014**;92(1):90-101.
31. Zhang J, Li X, Han X, Liu R, Fang J. Targeting the Thioredoxin System for Cancer Therapy. *Trends Pharmacol Sci.* **2017**;38(9):794-808.
32. Corso CR, Acco A. Glutathione system in animal model of solid tumors: From regulation to therapeutic target. *Crit Rev Oncol Hematol.* **2018**; 128:43-57.
33. Bansal A, Simon MC. Glutathione metabolism in cancer progression and treatment resistance. *J Cell Biol.* **2018**;217(7):2291-8.
34. Crawford LJ, Walker B, Irvine AE. Proteasome inhibitors in cancer therapy. *J Cell Commun Signal.* **2011**;5(2):101-10.
35. Sánchez-de-Diego C, Mármol I, Pérez R, Gascón S, Rodríguez-Yoldi MJ, Cerrada E. The anticancer effect related to disturbances in redox balance on Caco-2 cells caused by an alkynyl gold(I) complex. *J Inorg Biochem.* **2017**; 166:108-21.
36. Barnard PJ, Berners-Price SJ. Targeting the mitochondrial cell death pathway with gold compounds. *Coord Chem Rev.* **2007**;251(13):1889-902.
37. Benhar M, Shytaj IL, Stamler JS, Savarino A. Dual targeting of the thioredoxin and glutathione systems in cancer and HIV. *J Clin Invest.* **2016**. 126(5):1630-9.