



Universidad
Zaragoza

Trabajo Fin de Máster

Estudio biológico de potenciales fármacos multidiana

Autor:

José Carlos Royo Sanz

Directoras:

Elena Cerrada Lamuela

M^a Jesús Rodríguez Yoldi

Diciembre 2021



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza

Índice

RESUMEN.....	3
ABSTRACT	3
1. Introducción.....	5
1.1. Cáncer de colon.....	5
1.2. Uso de metales en quimioterapia.....	6
1.3. Usos terapéuticos del oro	7
1.4. Sulfonamidas, compuestos derivados de ellas y su combinación con metales	8
1.5. Dianas celulares de los complejos de oro(I) con bencenosulfonamidas.....	10
1.5.1. Inhibición de la enzima tiorredoxina reductasa	10
1.5.2. Inhibición de la enzima anhidrasa carbónica.....	11
1.6. Mecanismos de muerte celular	12
2. Objetivos.....	14
3. Materiales y métodos	15
3.1. Complejos de oro (I) y preparación de disoluciones madre.....	15
3.2. Determinación de las propiedades fisicoquímicas de los compuestos	16
3.2.1. Medida de estabilidad de los compuestos	16
3.2.2. Medida del coeficiente de reparto agua-octanol ($\log P_{7,4}$)	16
3.3. Cultivo celular	17
3.4. Estudio de viabilidad celular mediante ensayo MTT y cálculo de IC_{50}	17
3.5. Estudio de apoptosis. Doble tinción con Anexina V y PI.....	18
3.6. Determinación de la activación de caspasa 3 y p53	19
3.7. Estudio de ciclo celular. Tinción de DNA con yoduro de propidio	19
3.8. Determinación de potencial mitocondrial (ψ_m).....	19
3.9. Determinación de los niveles intracelulares de ROS.....	20
3.10. Medida de la actividad tiorredoxina reductasa en lisado celular.....	20
3.11. Interacción <i>in vitro</i> con la enzima tiorredoxina reductasa	21
3.12. Interacción <i>in vitro</i> con la enzima anhidrasa carbónica.....	21
3.13. Análisis estadístico	22
4. Resultados.....	22
4.1. Estudios de las propiedades fisicoquímicas de los compuestos	22
4.1.1. Estabilidad en un medio fisiológico (PBS).....	22
4.1.2. Coeficiente de reparto ($\log P_{7,4}$).....	23

4.2. Estudio de viabilidad celular mediante ensayo MTT y cálculo de IC ₅₀	24
4.3. Estudio de apoptosis	32
4.4. Activación de caspasa 3	33
4.5. Determinación del potencial mitocondrial (ψ_m)	34
4.6. Activación de p53.....	34
4.7. Estudio de ciclo celular.....	35
4.8. Determinación de niveles intracelulares de ROS	37
4.9. Interacción <i>in vitro</i> con la enzima tioredoxina reductasa	38
4.10. Interacción <i>in vitro</i> con enzima anhidrasa carbónica IX	39
5. Discusión	40
6. Conclusiones.....	44
6. Conclusions	44
7. Bibliografía.....	46
8. Anexo	51
8.1. Gráficas de estabilidad.....	51

RESUMEN

Hoy en día, el cáncer es una de las principales causas de mortalidad en el mundo. Del conjunto de enfermedades que lo engloban, el que afecta al colon se encuentra entre los más comunes.

Se han establecido distintas estrategias para su tratamiento, como el uso de metales, siendo el *cisplatino* su principal exponente. Sin embargo, sus inconvenientes promovieron la búsqueda de análogos y el estudio de otros metales como el oro. Por otro lado, los agentes antibacterianos derivados de sulfonamidas se han sugerido también como un tratamiento útil para el cáncer, por su capacidad de inhibir la enzima anhidrasa carbónica. En el presente trabajo se han estudiado diez complejos de oro (I) con unidades bencenosulfonamida y ligandos del tipo fosfinas y carbenos frente a la línea celular de adenocarcinoma de colon humano Caco-2 (clon TC7) y a fibroblastos. Se comprobó que los más selectivos sobre células cancerosas de cada familia eran el **complejo 1** ($[\text{Au}(\text{S}_2\text{CNHSO}_2\text{C}_6\text{H}_5)(\text{PPh}_3)]$) y el **complejo 8** ($[\text{Au}(\text{S}_2\text{CNHSO}_2\text{-}p\text{-Me-C}_6\text{H}_4)(\text{NHC})]$; NHC = 1-metil-3-(2-propin-1-il)-imidazol), teniendo éste último una actuación más lenta. También fueron capaces de provocar apoptosis, a través de la activación de la caspasa 3 en ambos casos y la modificación del potencial mitocondrial para el **complejo 1**. El estrés que indujeron en la célula fue capaz de activar a p53, lo que detuvo el ciclo en fase G₁ para el **complejo 1** y G₂ para el **8**.

El **complejo 8** generó un incremento de ROS, lo que se correlacionaría con la inhibición de enzimas implicadas en el equilibrio redox, como la tioredoxina reductasa. Ambos compuestos también demostraron una reducción *in vitro* de la actividad de la enzima recombinante anhidrasa carbónica AC IX.

ABSTRACT

Nowadays, cancer is one of the leading causes of death in the world. The one that affects colon is between the most common types.

There are several treatment strategies established, like the use of metals, being *cisplatin* the most remarkable example. However, their disadvantages promoted the search of analogues and the study of other metals, like gold. On the other hand, antibacterial agents derived from sulphonamides have been suggested as a useful cancer treatment, due to their ability of provoking inhibition of carbonic anhydrase enzyme.

In this research, ten gold (I) complexes with bencenesulphonamides units and phosphine and carbene ligands have been assayed in Caco-2 (clone TC7) colon cancer cell line and fibroblasts. **Complexes 1** ($[\text{Au}(\text{S}_2\text{CNHSO}_2\text{C}_6\text{H}_5)(\text{PPh}_3)]$) and **8** ($[\text{Au}(\text{S}_2\text{CNHSO}_2\text{-}p\text{-Me-C}_6\text{H}_4)(\text{NHC})]$; NHC = 1-methyl-3-(2-propyn-1-yl)-imidazole), were the most selective to cancer cells over normal cells, the latter being much slower. They were able to provoke apoptosis through caspase 3 activation in both cases and modification of mitochondrial potential for **complex 1**. Their treatment in cells induced stress that activated p53, which arrested cell cycle in phase G₁ for **complex 1** and G₂ for **8**. **Complex 8** increased ROS levels, which would be related with redox enzymes inhibition, like thioredoxin reductase. Both complexes also proved to reduce *in vitro* the activity of recombinant enzyme carbonic anhydrase CA IX.

Palabras clave

Cáncer, complejos de oro (I), sulfonamidas, estrés oxidativo, anhidrasa carbónica.

Abreviaciones

AC	Anhidrasa carbónica
Cdk	Quinasa dependiente de ciclina
DCFH-DA	Dicloro-dihidroacetato de fluoresceína
DiIC1	Yoduro de 1,1',3,3,3'-hexametiléndicarbo-cianina
DMEM	Medio mínimo esencial de Eagle Dulbecco modificado
DMSO	Dimetilsulfóxido
DTNB	Ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoico)
dUMP	Desoxiuridín monofostato
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
HIF-1	Factor inducido por hipoxia 1
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
NHC	Carbeno N-heterocíclico
4-NPA	4-nitrofenil acetato
PABA	Ácido p-aminobenzoico
PBS	Tampón fosfato salino
PI	Yoduro de propidio
PPh ₃	Trifenilfosfina
ψ_m	Potencial mitocondrial
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SFB	Suero Fetal Bovino
TPPTS	Trifenilfosfina trisulfonada de sodio
TrxR	Tiorredoxina reductasa
VEGF	Factor de crecimiento endotelial

1. Introducción

1.1. Cáncer de colon

El **cáncer** es una enfermedad caracterizada por una progresión celular incontrolada, que comienza localizada en una zona concreta y con el tiempo puede migrar a otros tejidos y órganos del cuerpo en un proceso denominado metástasis. Concretamente, el que afecta al colon es el tercero que presenta una mayor incidencia a nivel mundial y la cuarta causa de muerte más común¹⁻².

La mayoría de los cánceres de **colon** comienzan a generarse a partir de una anomalía en las criptas que recubren el epitelio intestinal, que evoluciona hacia una lesión neoplásica denominada pólipo. Su origen se encuentra en células madre de dicho epitelio que acumulan una serie de mutaciones, lo que provoca la activación de oncogenes como K-Ras y la desactivación de genes supresores de tumores como APC y TP53. Estos mismos son los que más habitualmente acumulan dichas mutaciones en cáncer de colon. Concretamente este tipo de cáncer puede presentarse en dos formas: esporádica y hereditaria, siendo la primera de ellas la más habitual, en la que un tumor benigno o adenoma evoluciona hacia un tumor maligno o adenocarcinoma. Las células de los tejidos afectados adquieren la capacidad de movilizarse hacia otras zonas del organismo en el estado de metástasis³⁻⁴.

Entre los factores de riesgo para la aparición del cáncer de colon en su forma esporádica se encuentran la edad, sobre todo a partir de los 50 años. También los antecedentes de poliposis adenomatosa son la causa del 95% de los casos esporádicos de cáncer de colon desarrollados a partir de adenomas. Del mismo modo, aquellas personas que presenten patologías intestinales como la poliposis adenomatosa o la enfermedad inflamatoria intestinal (dentro de la que se engloban la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa) incrementan las posibilidades de padecer cáncer de colon en su forma hereditaria. La diferencia entre ambas reside en que en la primera la localización de la inflamación es el colon y recto, mientras que en la enfermedad de Crohn la inflamación puede afectar a cualquier tramo del tubo digestivo¹.

Por otro lado, los factores genéticos hereditarios también influyen, pero en menor medida, siendo la causa de entre el 5 y 10% de los casos totales de este cáncer. Las enfermedades de transmisión hereditaria más frecuentes son la poliposis adenomatosa familiar debida a la mutación del gen APC y el síndrome de Lynch, con mutaciones presentes en los genes MLH1 y MSH2, los cuales codifican para proteínas implicadas en la reparación del DNA. Otros factores de riesgo adicionales que inducen su aparición son aquellos relacionados con el ambiente y muchas veces debidos un estilo de vida concreto: dieta rica en grasas, falta de ejercicio físico, obesidad y elevado consumo de alcohol y tabaco^{1,5}.

Actualmente, la primera estrategia que se sigue para evitar la progresión del tumor, en el caso de que este se encuentre localizado en una zona concreta, es su extirpación mediante cirugía. Según el grado de extensión del tumor alrededor del organismo se puede utilizar **radioterapia** o **quimioterapia** para disminuir la cantidad de células cancerosas. Es posible llevar a cabo este procedimiento antes del proceso quirúrgico, con la terapia

neoadyuvante o posteriormente a él con la terapia adyuvante. Entre los agentes quimioterápicos que se administran para evitar la progresión de las células tumorales, el más utilizado en cáncer colorrectal es el 5-fluorouracilo. Este provoca daño en el DNA mediante la inhibición de la enzima timidilato sintasa, debido a que compite con la unión de su sustrato desoxiuridín monofosfato (dUMP). Además de individualmente, existe también la posibilidad de su administración junto con *oxaliplatino* (FOLFOX) o irinotecan (FOLFIRI) en la denominada terapia combinada⁶. Como alternativa a este tratamiento, es común el uso de agentes biológicos basados en la Inmunología mediante anticuerpos. Estos tienen como objetivo la unión a proteínas claves para el crecimiento tumoral, como bevacizumab dirigido al factor de crecimiento endotelial VEGF y cetuximab, dirigido al receptor del factor de crecimiento epidérmico EGFR. Por tanto, de esta forma se detienen procesos clave para la progresión de las células tumorales como son la angiogénesis y el crecimiento celular descontrolado, respectivamente⁷.

1.2. Uso de metales en quimioterapia

El primer derivado metálico utilizado en quimioterapia fue el *cisplatino* (cis-diclorodiamina platino (II), **figura 1a**), cuyos efectos inhibitorios sobre la proliferación celular fueron descubiertos por primera vez en los años 60 por Rosenberg⁸⁻⁹. Es utilizado en el tratamiento de diversos cánceres como el de pulmón, cabeza y cuello, vejiga, ovario y testicular. Concretamente su efecto citotóxico reside en la capacidad de unión al DNA que presenta, generando entrecruzamientos con las bases nitrogenadas. Este hecho, sumado a la dificultad de las enzimas reparadoras para revertir dicha unión desencadena finalmente la muerte celular programada por apoptosis de las células sobre las que actúa⁹.

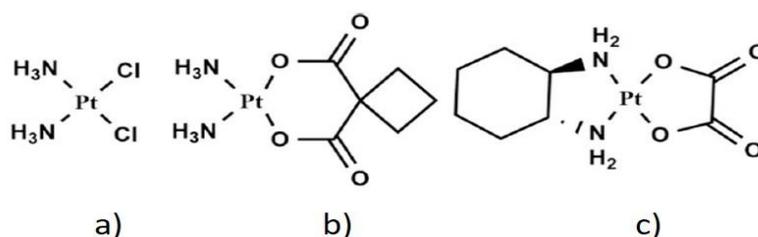


Figura 1. Estructura química de compuestos derivados de Pt (II) utilizados en clínica: *cisplatino* (a) y sus análogos *carboplatino* (b) y *oxaliplatino* (c). **Fuente:** Ghosh. *Bioorg Chem* (2019)

El principal problema que presenta dicho mecanismo de acción es la falta de especificidad de unión sobre células cancerosas respecto a las sanas, lo que se encuentra unido a una serie de efectos secundarios derivados de su administración, como nefrotoxicidad y hepatotoxicidad. Debido a ello, se están investigando gran cantidad de análogos, unos pocos de ellos han entrado en ensayos clínicos y solo dos están autorizados actualmente para su uso terapéutico: *carboplatino* y *oxaliplatino*. Concretamente la menor toxicidad del primero es ventajosa, aunque su reducida potencia respecto al *cisplatino* requiere la administración de dosis cuatro veces mayores para lograr el mismo efecto¹⁰. Por otro lado, el *oxaliplatino* permite superar la resistencia celular al *cisplatino* debido a la menor

formación de entrecruzamientos con el DNA, lo que facilita su aplicación en distintos tipos de cánceres como el de colon¹⁰.

Por todo ello, en los últimos años se han buscado nuevas alternativas al *cisplatino* y derivados que presenten un mecanismo de acción diferente, con el fin de evitar sus efectos secundarios por la falta de selectividad sobre células cancerosas. Las más utilizadas son aquellas en las que se utilizan complejos que contienen otros metales entre los que se encuentran rutenio, titanio y oro¹¹. Concretamente, los compuestos de oro en estados de oxidación +I y +III han demostrado su eficacia como antitumorales, mostrando ser más selectivos por su afinidad por los grupos tiol de las cisteínas y selenol de la selenocisteína de la enzima tioredoxina reductasa, con actividad incrementada en células tumorales¹¹⁻¹².

1.3. Usos terapéuticos del oro

Los primeros usos del oro en medicina datan de hace siglos en la medicina tradicional india y egipcia donde se utilizaban como tratamiento de varias enfermedades como la sífilis¹¹. Su uso era común también en China, donde se relacionaba con la longevidad. Sin embargo, el momento clave para su uso en medicina fue en el siglo XIX cuando Robert Koch demostró por primera vez las propiedades antibacterianas del complejo de oro (III) ($K[Au(CN)_2]$) sobre cepas de *Mycobacterium tuberculosis*. En los años 20 del pasado siglo, se propuso la utilización de estos compuestos para el tratamiento de la artritis reumatoide por su similitud de síntomas con la tuberculosis¹³. El hecho de que estos complejos metálicos poseyeran propiedades antiinflamatorias e inmunosupresivas permitió la creación de los primeros fármacos derivados de oro con aplicaciones en medicina en la denominada crisoterapia. Compuestos como aurotioglucosa (solganol) y aurotiomalato de sodio (miocrisina), son algunos ejemplos de ellos¹⁴.

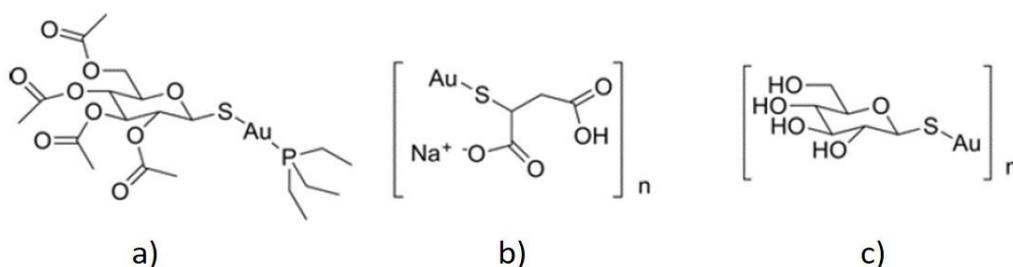


Figura 2. Compuestos derivados de oro utilizados en crisoterapia: **a)** auranofin, **b)** aurotiomalato de sodio (miocrisina) y **c)** auratioglucosa (solganol). **Fuente:** Casini et al. *Met Ions Life Sci* (2018).

En 1972 Sutton estudiaba posibles candidatos de fármacos antiinflamatorios orales para el tratamiento de la artritis reumatoide, lo que llevó a la aparición del compuesto conocido como *auranofin* (**Figura 2a**), que es un complejo de oro (I) con una molécula de tioglucosa y la fosfina trietilfosfina. Más tarde se observaron las propiedades anticancerígenas de dicho compuesto sobre los pacientes a los que se le administraba, lo

que permitió su estudio como agente quimioterápico. Hoy en día, es la referencia en cuanto a fármacos derivados de metales para el estudio en el tratamiento del cáncer¹³.

Las propiedades del oro (I) como ácido de Lewis blando, le confieren alta afinidad por ligandos fácilmente polarizables como S-dadores y P-dadores. Su estructura de configuración electrónica d^{10} le permite establecer distintas geometrías de coordinación tales como tetraédrica, trigonal o lineal. De todas ellas, la última es la más relevante para la utilización de compuestos derivados de oro(I) con fines médicos¹⁴⁻¹⁵. Su mecanismo de acción es independiente de la unión al DNA, ya que se dirige a otras dianas específicas de células tumorales inhibiendo su actividad, tal es el caso de la enzima tiorredoxina reductasa (TrxR). Esto permite solventar los problemas de falta de selectividad que existen en el caso del cisplatino y sus derivados.

Con anterioridad se ha demostrado la efectividad de la coordinación de centros de oro(I) a una serie de ligandos del tipo fosfinas, tiolatos, ditiocarbamatos y carbenos N-heterocíclicos (NHC), entre otros, que proporcionan una elevada estabilidad a los complejos finales y que han mostrado actividad anticancerígena en una gran diversidad de células cancerosas¹⁶. De entre ellos, destacamos los fosfino y los carbenos NHC derivados, ya que son el tipo de complejos empleados en este estudio. Tanto las fosfinas como los carbenos N-heterocíclicos han sido ampliamente empleados como ligandos en complejos de oro(I) dando lugar a potenciales agentes antitumorales¹⁷⁻²¹.

1.4. Sulfonamidas, compuestos derivados de ellas y su combinación con metales

Las **sulfonamidas** son fármacos que contienen el grupo sulfonamida ($R-SO_2NH_2$) y que presentan gran diversidad de actividades biológicas, entre las que se incluyen: propiedades anticancerígenas, bactericidas, antiparasitarias o antidiuréticas²²⁻²⁵.

Su desarrollo comenzó tras la observación de las propiedades antibacterianas del profármaco Prontosil (**Figura 3**), que contenía dicho grupo.

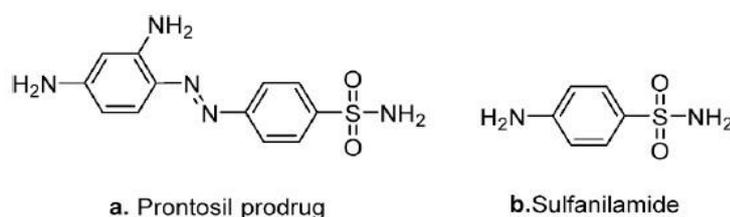


Figura 3. Estructura química del profármaco **Prontosil** (izquierda) y su forma biológicamente activa **sulfanilamida** (derecha). **Fuente:** Apaydin S et al. *Bioorg Med Chem Lett* (2019).

Tras ello, numerosos derivados de sulfonamidas se utilizaron debido a sus propiedades antibacterianas y antifúngicas. Concretamente, su mecanismo de acción antibacteriano reside en la inhibición competitiva de la síntesis de ácido fólico por parte de la enzima dihidropteroato sintetasa²⁶. Ello se debe a que, compiten por unirse a ella a causa de la

analogía estructural que presentan con su sustrato: el ácido p-aminobenzoico (PABA). Una destacable ventaja a la hora de su aplicación en el tratamiento de diversas patologías es la ausencia de efectos secundarios sobre las células eucariotas humanas ya que en este caso el ácido fólico se adquiere de la dieta, como en el resto de los mamíferos, por lo que no se sintetiza *de novo*.

Posteriormente, se descubrió su capacidad de inhibir la enzima anhidrasa carbónica, que se encuentra implicada en la regulación del pH celular. La sulfanilamida, la forma activa del profármaco Prontosil antes mencionado (**Figura 3**), fue el primer compuesto basado en sulfonamidas capaz de inhibir la anhidrasa carbónica que se utilizó en clínica. El hecho de que se encontrase esta nueva diana para estos fármacos permitió extender sus aplicaciones al tratamiento de enfermedades complejas: comenzó su utilización para el glaucoma y como diuréticos, siendo en este caso la acetazolamida el primero en utilizarse en los años 50²⁷. Más tarde, la gran cantidad de funciones y localizaciones que presenta dicha enzima permitieron ampliar el rango de enfermedades donde se podía utilizar: hipertiroidismo, epilepsia, diabetes o cáncer²⁶.

Existen notables ejemplos de inhibidores de la anhidrasa carbónica cuya eficacia se ha demostrado en los últimos años, como el compuesto SLC-0111 o también denominado U-104 [(4fluorofenil)amino]carbonil]amino] bencenosulfonamida, utilizado en el tratamiento del cáncer de mama siendo objetivo la inhibición de la isoforma AC IX²⁷. Otro inhibidor de tipo sulfonamida es el indisulam o E7070 (N-(3-cloro-7-indolil)-1,4-bencenodisulfonamida), cuyos efectos antitumorales residen en la inhibición de la isoforma AC IX junto con la AC XII. Además, actúa sobre las quinasas dependientes de ciclina (CDK), por lo que acaba deteniendo el ciclo en fase G₁/S con el fin de impedir la progresión celular descontrolada²⁴.

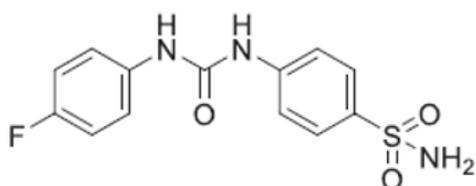


Figura 4. Estructura del compuesto SLC-0111 que presenta afinidad por la anhidrasa carbónica IX y XII. **Fuente:** Krasavin et al. *J Enzyme Inhib Med Chem* (2020)

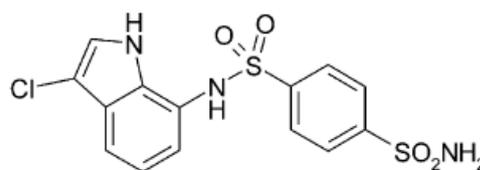


Figura 5. Estructura del compuesto indisulam (E7070). Presenta alta afinidad por las isoformas IX y XII de la anhidrasa carbónica **Fuente:** Abbate et al. *Bioorg Med Chem Lett* (2003)

En la bibliografía científica se recogen diversos ejemplos de derivados metálicos con ligandos derivados de sulfonamidas, activos frente a células de cáncer y capaces de inhibir la enzima anhidrasa carbónica. Entre los más estudiados destacan principalmente los complejos de rutenio²⁹⁻³³, por representar una alternativa atractiva a los fármacos basados en platino. Muchos de sus complejos en agua muestran cinéticas de intercambio de

ligandos similares a los complejos de platino, y también pueden utilizar la proteína transferrina transportadora de hierro para facilitar su absorción en las células tumorales, ya que esta proteína se encuentra sobreexpresada en muchos tumores³⁴. Además de rutenio se conocen ejemplos de complejos metálicos con ligandos del tipo sulfonamida con otros metales tales como osmio, platino, rodio, titanio, cobre, plata y cinc entre otros. Sin embargo, solo en algunos de dichos ejemplos se ha estudiado su capacidad de inhibición de alguna de las isoformas de la enzima AC³⁵⁻³⁹. Hasta la fecha, no se conocen complejos de oro con sulfonamidas que puedan actuar como inhibidores de AC.

1.5. Dianas celulares de los complejos de oro(I) con bencenosulfonamidas

1.5.1. Inhibición de la enzima tiorredoxina reductasa

Las especies reactivas de oxígeno (ROS), cumplen un importante papel en varios procesos celulares como la señalización, activación de factores de transcripción nucleares o reacciones enzimáticas⁴⁰. Sin embargo, una excesiva producción podría ser perjudicial, debido a la alteración de funciones biológicas que pueden desencadenar. Ejemplo de ello serían la oxidación de cisteínas proteicas, que alterarían su función biológica por la formación de puentes disulfuro⁴⁰⁻⁴¹ o la inducción del proceso de apoptosis o muerte celular⁴². Por ello, existen distintos mecanismos celulares que ayudan a mantener el equilibrio redox, como es el sistema tiorredoxina. Este consta de la enzima tiorredoxina reductasa (EC1.8.1.9), que cataliza la reducción dependiente de NADPH de la tiorredoxina⁴². La tiorredoxina reductasa pertenece a la familia de piridina nucleótido disulfuro oxidorreductasas y posee un grupo prostético FAD, un sitio de unión para el NADPH y un centro activo con un motivo disulfuro. Inicialmente, la forma activa de la tiorredoxina es la reducida ditiol Trx-(SH)₂. Esta interacciona con diversas proteínas oxidándose y pasando a la forma disulfuro Trx (S)₂ que será reducida de nuevo gracias a la tiorredoxina reductasa con gasto de NADPH⁴¹. En mamíferos, la tiorredoxina reductasa se encuentra presente en dos isoformas, con distinta localización celular: la TrxR1 en el citosol y la TrxR2 en la mitocondria.

Las células cancerosas generan una elevada cantidad de ROS debido a su metabolismo incrementado y excesiva proliferación. Para hacer frente a ello, el sistema tiorredoxina/tiorredoxina reductasa se encuentra sobreexpresado en muchos tumores sólidos para permitir la reducción del H₂O₂ y refleja un crecimiento tumoral agresivo, por lo que indica un mal pronóstico⁴¹. Además, se encuentra relacionada con el proceso apoptótico ya que regula las caspasas que participan en él, evitando desencadenar su muerte^{40,43}. Por ello, el desarrollo de inhibidores dirigidos a esta diana es una útil estrategia en el tratamiento.

Se conoce que metales nobles como oro⁴⁴, plata, platino, paladio o rutenio, son capaces de inhibir dicha enzima ya que actúan como ácidos blandos. Estos tienen tendencia hacia los átomos de sulfuro/selenio que se comportan como bases blandas. Estos átomos se encuentran presentes en residuos claves para la actividad enzimática, como los de selenocisteína localizados en el extremo C-terminal que conforman el sitio activo⁴⁵⁻⁴⁷.

1.5.2. Inhibición de la enzima anhidrasa carbónica

Las enzimas anhidrasas carbónicas (EC 4.2.1.1) pertenecen a 5 familias genéticas distintas (α , β , γ , δ y ϵ) de las que las únicas que se encuentran expresadas en humanos son las α . Llevan a cabo la reacción de hidratación reversible de CO_2 a HCO_3^- y H^+ , lo que permite establecer una precisa regulación del pH celular. Existen unas 15 isoformas distintas en humanos. De todas ellas, 12 son catalíticamente activas debido al átomo de Zn^{2+} localizado en su centro activo. Este se encuentra coordinado a tres residuos de histidina en disposición tetraédrica y una molécula de agua²⁷.

Con anterioridad ya se ha demostrado que entre las dianas de este enzima se encuentran compuestos como las sulfonamidas y sus isoésteres (sulfamatos, sulfamidas) y las coumarinas. La especificidad de unión de los inhibidores de tipo sulfonamida viene conferida por la interacción del nitrógeno presente en el grupo funcional ($\text{R-SO}_2\text{NH}_2$) con el ión Zn^{2+} localizado en el centro activo de la anhidrasa⁴⁸.

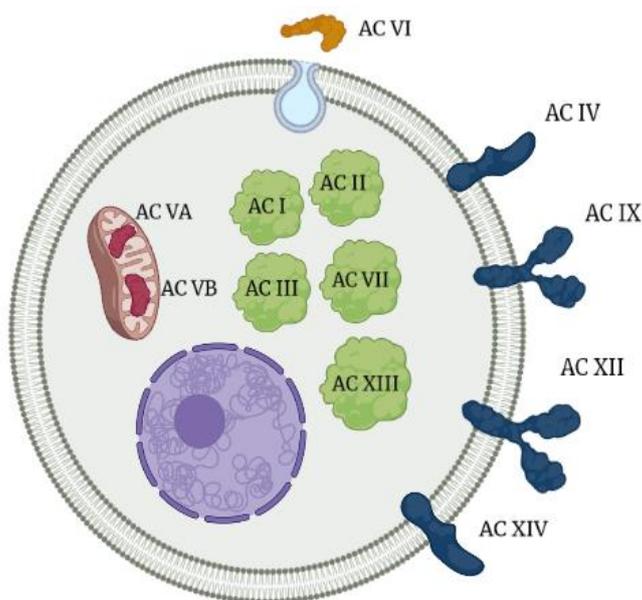


Figura 6. Distribución de las distintas formas de anhidrasa carbónica catalíticamente activas en células eucariotas. Se muestran las presentes en el citosol (verde), las transmembrales (azul), la isoforma secretada (naranja) y las de localización mitocondrial (rojo). (Imagen creada en Biorender.com)

El diseño de inhibidores específicos de una isoenzima implica un desafío por el gran número de isoformas existente y el elevado grado de homología que presentan entre ellas, sobre todo en la estructura del centro activo. Debido a ello, ante un posible uso terapéutico la falta de selectividad sobre la isoforma afectada en una enfermedad podría derivar en efectos secundarios no deseados. Un ejemplo de ello es la relativa homología entre las isoformas IX y XII, incrementadas en tumores y la II, presente en eritrocitos. Todo el conjunto de isoformas se encuentra distribuido en variadas localizaciones celulares como citosol, membrana o mitocondrias (**Figura 6**). En ellas cumplen funciones en procesos fisiológicos

tan diversos como la ureagénesis, gluconeogénesis, balance ácido-base o el transporte de CO_2 en forma de bicarbonato de los tejidos a pulmones⁴⁹.

Debido a las importantes funciones que cumplen, la alteración de los niveles de actividad o expresión de determinadas isoformas se encuentra relacionada con diversas patologías⁵⁰. De entre todas ellas, el incremento del número IX y XII se encuentra relacionado con el cáncer. Ello se debe a que células cancerosas las requieren para

mantener el pH intracelular tamponado gracias a la producción de bicarbonato. Simultáneamente, acidifican el pH extracelular por la producción adicional de protones. Este hecho provoca un aumento de la acidez en el entorno, favoreciendo la invasión y metástasis de las células tumorales y dificultando enormemente la supervivencia de las células sanas a causa de las condiciones de bajo pH⁵¹.

Aunque cumplen una función similar, existen diferencias entre las dos isoformas relacionadas con cáncer, principalmente en la expresión según los tejidos. Por un lado, en el caso de la IX su expresión se encuentra estimulada en tumores de mama, riñón y colon⁵²⁻⁵³, por factores de transcripción, como el inducido por hipoxia (HIF-1). Este aparece en condiciones de baja concentración de O₂ que son características de los tumores, y se encuentran relacionadas con condiciones de pH extracelular bajo. Sin embargo, la isoforma XII se encuentra presente en condiciones normales en gran variedad de tejidos además de sobreexpresarse en tumores como mama, ovario, páncreas, colon o pulmón. Esta isoforma se regula por un mecanismo distinto al de la IX, aunque se cree que también en situaciones de hipoxia^{27,48}. Por ello, la expresión más específica en tejidos tumorales de la isoforma IX en comparación con la XII, hace de ella una diana interesante para diseñar quimioterápicos con el fin de aumentar la selectividad sobre las células tumorales sin alterar el correcto funcionamiento del epitelio intestinal. Esto, sumado a su baja expresión en células sanas, evitaría los efectos secundarios no deseados que pudieran causar los inhibidores inespecíficos dirigidos a todas las isoformas de anhidrasas⁵¹.

1.6. Mecanismos de muerte celular

La existencia de un balance entre progresión celular y muerte es de vital importancia para el organismo, con el fin de mantener la homeostasis celular. Ello se debe a que un desequilibrio en este aspecto podría desencadenar patologías, como el cáncer o autoinmunidad.

Para mantener los niveles celulares estables, principalmente existen dos tipos de muerte celular: apoptosis y necrosis, aunque también se han descubierto otras formas que siguen distintos mecanismos como la catástrofe mitótica, ferroptosis y necroptosis⁵⁴.

En primer lugar, el proceso apoptótico provoca una serie de modificaciones en las células, como fragmentación de la cromatina, pérdida de volumen y formación de vesículas denominadas cuerpos apoptóticos o '*blebs*' (**Figura 7**).

Concretamente las señales que la desencadena se pueden activar por dos vías: extrínseca, que es inducida por la activación de receptores de muerte (TNFR1, Fas o TRAIL-R1/2 son algunos de ellos) y la intrínseca o mitocondrial que es independiente de receptores y se activa por estrés celular⁵⁴⁻⁵⁵.

En último término ambas vías convergen en la activación de unas enzimas cisteín-proteasas denominadas caspasas iniciadoras (8 y 9). Ellas a su vez, se encargan de activar por hidrólisis los precursores de las caspasas ejecutoras (3, 6 y 7). En último término establecerán una señalización que acabará con la destrucción de la célula⁵⁵.

La vía mitocondrial es la forma de muerte celular más común en vertebrados. Se desencadena ante la exposición de la célula a diversos tipos de estrés como daño en el DNA, estrés del retículo endoplásmico debido a la presencia de proteínas mal plegadas y escasez de factores de crecimiento⁵⁴.

Una de sus principales consecuencias es que la membrana de dicho orgánulo pierde su integridad. Esto tiene como consecuencia la alteración del potencial mitocondrial (ψ_m) que activa proteínas pro-apoptóticas como Bax y Bak. Estas forman poros en la membrana mitocondrial a través de los cuales se libera citocromo c al citoplasma. Este se une a las proteínas Apaf-1, provocando su oligomerización hasta formar el apoptosoma. Este último se encargará de activar las caspasas iniciadoras y ejecutoras que provocarán la apoptosis⁵⁵⁻⁵⁷.

Por otro lado, y a diferencia de la apoptosis que se produce de forma controlada, el proceso de necrosis ocurre de forma incontrolada ante un daño celular externo, como el generado en una situación de hipoxia o inflamación⁵⁶. Este implica el aumento de volumen, lo que provoca la ruptura de la membrana plasmática y la pérdida de función de los orgánulos ya que se vierte el contenido celular al exterior (**Figura 7**).

Un aspecto destacable es la ausencia de inflamación tras el proceso apoptótico, debido a que las células muertas son retiradas por los macrófagos circundantes⁵⁷. A diferencia del anterior, en el proceso necrótico se vierte el contenido celular al medio externo, provocando la liberación de citoquinas que inducen dicho proceso inflamatorio⁵⁶. Por ello, a la hora de seleccionar candidatos a fármacos lo deseable es que provoquen la muerte celular por apoptosis y no necrosis, para evitar efectos secundarios asociados a la inflamación.

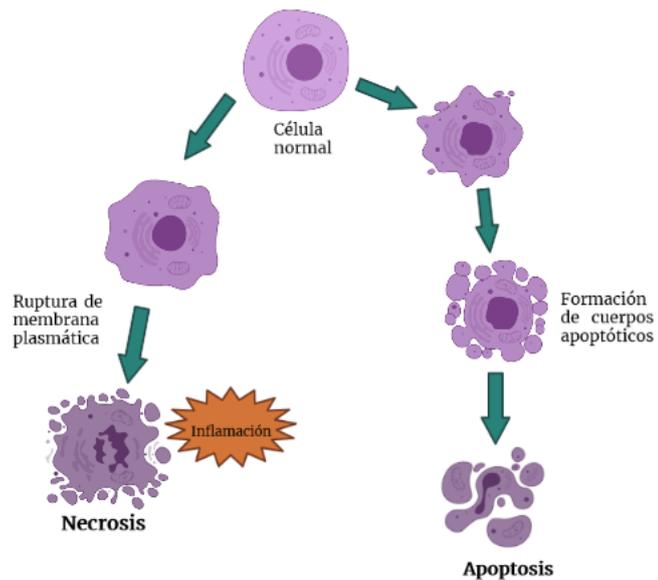


Figura 7. Principales tipos de muerte celular (apoptosis y necrosis) y las alteraciones en su morfología que provocan. (Imagen creada en Biorender.com)

2. Objetivos

Como se ha visto en la introducción, entre las posibilidades que ofrecen los derivados de sulfonamidas incluyen su capacidad de inhibir la actividad de la anhidrasa carbónica, a lo que se une la capacidad de inhibir la actividad de la tiorredoxina reductasa por parte de complejos de oro. Esto planteó como principal objetivo de este Trabajo fin de Máster, la combinación en una misma molécula de dos unidades: sulfonamida y complejo de oro (I) con la intención de diseñar un posible **fármaco multidiana**. Para ello se emplearon dos tipos de derivados previamente sintetizados en el grupo de oro y plata del departamento de Química Inorgánica y que consisten en complejos de oro (I) con ligandos fosfina o carbeno N-heterocíclico (NHC) y un ditiocarbamato con la unidad benceno sulfonamida (**Figura 8**).

En el presente trabajo nos planteamos los siguientes objetivos específicos:

- Estudio de las propiedades fisicoquímicas: demostrar si presentan carácter hidrófobo o hidrófilo y si son capaces de mantenerse estables a lo largo del tiempo en un medio acuoso similar al fisiológico de un organismo
- Evaluar su citotoxicidad en la línea celular de cáncer de colon humano, Caco-2 (clon TC7) y en modelos de células humanas sanas: fibroblastos epiteliales y Caco-2/TC7 diferenciadas. La ausencia de efecto en las células diferenciadas nos permite descartar un posible efecto “per se” de los compuestos utilizados y, por tanto, aconsejar su utilización.
- Determinación del tipo de muerte que causan dichos complejos y procesos relacionados con este hecho, como son la apoptosis por activación de la proteína Caspasa 3 y la alteración del potencial mitocondrial (ψ_m).
- Estudiar si los compuestos afectan a la progresión del ciclo celular y si en este efecto está implicada la activación de la proteína p53.
- Estudiar si estos compuestos modifican el equilibrio redox de las células cancerosas.
- Estudio de la interacción con posibles dianas de los complejos de oro(I) con bencenosulfonamidas.

Con el fin de alcanzar los objetivos mencionados anteriormente, se realizaron los siguientes ensayos:

1. Determinación de las propiedades fisicoquímicas de los complejos en estudio: estabilidad en un medio fisiológico y carácter lipófilo o hidrófilo.
2. Ensayos de viabilidad celular (MTT) en células indiferenciadas cancerosas (Caco-2/TC7) y en modelos de células sanas (fibroblastos epiteliales y Caco-2/TC7 diferenciadas).
3. Determinación por citometría de flujo del tipo de muerte que producen estos complejos metálicos, evaluando la posible detención del ciclo, los cambios en el potencial de membrana mitocondrial y la actividad de las proteínas caspasa 3 y p53.

4. Cuantificación de los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) para evaluar el estrés oxidativo.
5. Ensayos de actividad de las enzimas tiorredoxina reductasa y anhidrasa carbónica como posibles dianas terapéuticas.

3. Materiales y métodos

3.1. Complejos de oro (I) y preparación de disoluciones madre

Los complejos con centro metálico de oro(I) se sintetizaron inicialmente en el laboratorio de la Dra. Elena Cerrada en el departamento de Química Inorgánica de la Facultad de Ciencias.

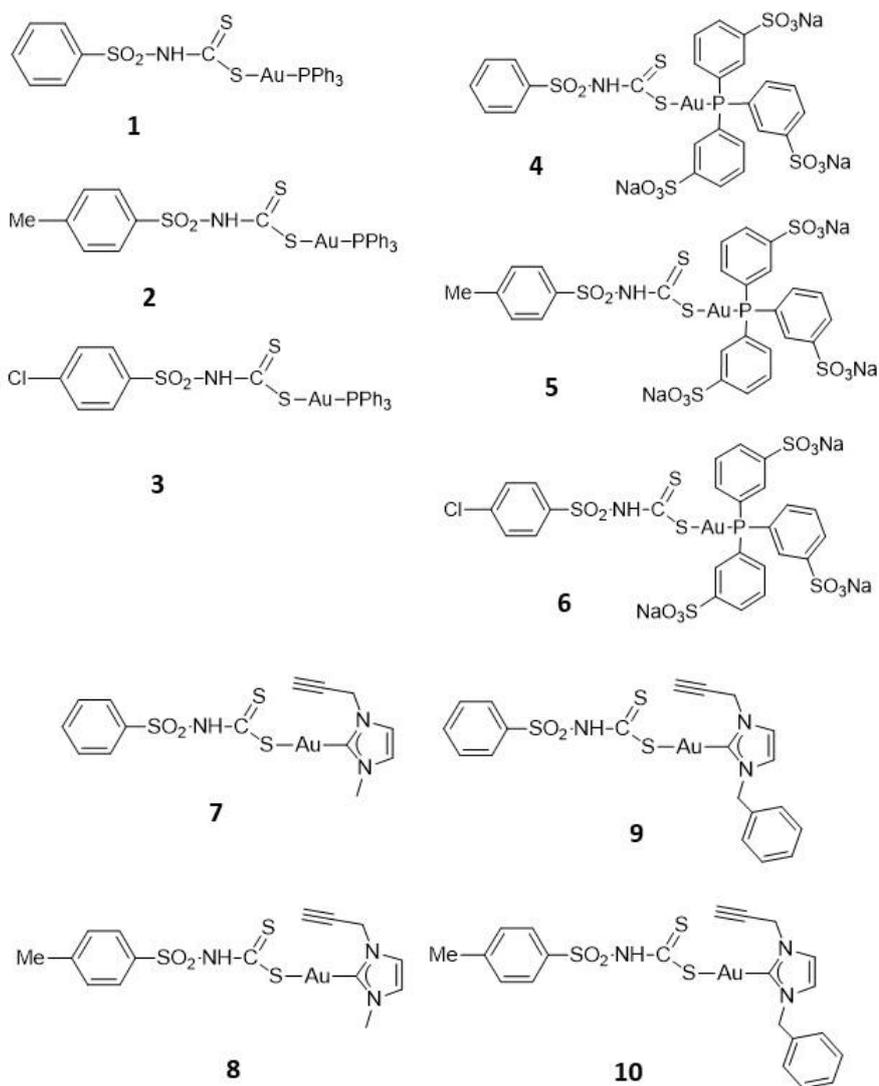


Figura 8. Representación estructural de los complejos utilizados en este trabajo: complejos ditiocarbamato de oro(I) con la unidad bencenosulfonamida y con ligandos trifenilfosfina (PPh₃) (**complejos 1-3**), trifenilfosfina-trisulfonada (TPPTS) (**complejos 4-6**) y carbenos NHC (**complejos 7-10**).

En la **figura 8**, se recogen las estructuras químicas de dichos compuestos, junto con el número asociado a ellos que los identificará al exponer los resultados obtenidos.

Inicialmente, se partía de los productos sintetizados en estado sólido y para realizar los distintos ensayos, se disolvieron en DMSO hasta una concentración de 20 mM. Estas constituyeron las disoluciones madre, a partir de las cuales, se elaboraron otras disoluciones diluidas con la concentración requerida para cada ensayo.

3.2. Determinación de las propiedades fisicoquímicas de los compuestos

3.2.1. Medida de estabilidad de los compuestos

En primer lugar, los compuestos en forma sólida se disolvieron en el volumen necesario de DMSO para alcanzar una concentración de 10 mM. Se tomaron 50 μ L de dicha disolución y se añadieron a 10 mL de disolución acuosa (PBS + NaCl 0,9% pH 7,4). Estas muestras se mantuvieron en todo momento en un baño termostatizado a 37 °C. Inicialmente, y a una serie de intervalos se midió el espectro UV/visible de cada compuesto a unas longitudes de onda de entre 200 y 650 nm en una cubeta de cuarzo con ayuda de un espectrofotómetro. Los espectros obtenidos a lo largo del tiempo se analizaron para determinar la existencia de degradación de los compuestos en nanopartículas de oro, lo que se reflejaría en un pico de absorción a 500 nm.

3.2.2. Medida del coeficiente de reparto agua-octanol ($\log P_{7,4}$)

El cálculo de este parámetro permite dilucidar si los compuestos de estudio son de carácter hidrófilo o hidrófobo. Esto es importante con el fin de asegurar que poseen la suficiente hidrofobicidad para atravesar la membrana lipídica y así ejercer su efecto citotóxico en el interior celular. Para ello, se llevó a cabo el denominado método ‘shake-flask’ mediante el cual se puede determinar la afinidad de un compuesto en una mezcla constituida por una fase orgánica hidrofóbica y otra fase acuosa.

Para llevar a cabo dicha determinación se añadió cada complejo en forma sólida en un tubo Falcon. Posteriormente, este se disolvió en 4 ml de octanol saturado con la disolución acuosa de PBS y 4 ml de disolución acuosa (PBS + NaCl 0,9 % pH 7,4) saturado con la disolución de octanol, con el fin de generar dos fases en las que permanecerá cada compuesto en función de su carácter hidrófobo o hidrófilo. Tras mantenerse 10 minutos en incubación con ultrasonidos, se realizó una centrifugación durante 3 minutos, lo que permite distinguir la separación de las dos fases: el octanol queda en la parte superior y la disolución acuosa de PBS en la inferior. De cada muestra para cada uno de los compuestos, se recuperaron la fase de octanol y la acuosa por separado con ayuda de una pipeta Pasteur y se midió su espectro UV/visible a unas longitudes de onda de entre 200 y 650 nm con ayuda de un espectrofotómetro. El valor del parámetro $\log P_{7,4}$ se calculó con las concentraciones del compuesto en cada fase, correspondientes a los picos máximos de absorción. Cuanto mayor es el valor de parámetro mayor será su carácter hidrófobo y viceversa.

$$\log P_{7,4} = \log \frac{[\text{compuesto}]_{\text{octanol}}}{[\text{compuesto}]_{\text{fase acuosa}}} = \log \frac{Absmáx_{\text{octanol}}}{Absmáx_{\text{fase acuosa}}}$$

3.3. 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.

Con el fin de estudiar el efecto de dichos complejos metálicos sobre las células, se utilizó la línea celular de adenocarcinoma de colon humano Caco-2 como modelo de la barrera intestinal. En concreto se trata del clon TC7 que proviene de pasajes tardíos, lo que garantiza una mayor homogeneidad y estabilidad a lo largo de los pasajes. Dicha línea celular tiene la capacidad de diferenciarse espontáneamente al alcanzar la confluencia hacia enterocitos normales, que presentan las uniones adherentes y expresan las enzimas características del epitelio intestinal⁵⁸⁻⁵⁹. Por tanto, pueden utilizarse como modelo de la barrera intestinal.

Por otro lado, para determinar el efecto de los compuestos sobre células normales y determinar su índice de selectividad, se utilizaron fibroblastos epiteliales humanos de adulto (NHDF-Ad, Lonza[®]) cedidas por la Dra. Gracia Mendoza (CIBA). Estas células fueron suplementadas tanto en el cultivo como en el tratamiento con los compuestos con Suero Fetal Bovino, debido a que su ausencia afectaba en gran medida a su crecimiento.

Las células se mantienen en una estufa de CO₂ (Phcbi MCO-170AIC), en un ambiente a 37 °C, 95% de O₂ y 5% de CO₂. Estas se encuentran en botellas de 25 cm² suplementadas con un medio de cultivo Dulbecco modificado (DMEM) que contiene suero fetal bovino (SFB) al 20%, penicilina (1000U/ml) al 1%, estreptomycin (1000 µg/ml) al 1%, aminoácidos no esenciales al 1%, L-glutamina (200mM 100X) y anfotericina (250 U/ml) al 1%.

Para realizar los ensayos, se comprueba mediante un microscopio invertido que las células han llegado a la confluencia y se separan de la botella de cultivo mediante el proceso de tripsinización, en el que rompen las uniones que se han establecido con el soporte de plástico de la botella. Cada vez que se tripsiniza, se siembra una nueva botella de mantenimiento de 25 cm² con 300.000 células. Una vez separadas, se siembra una cantidad de 400.000 células en placas de 96 pocillos, con el fin de conseguir una densidad de 4000 células por pocillo. Tras 24 horas de crecimiento en dichas placas, se lleva a cabo su tratamiento con los complejos metálicos. Para ello, el medio completo de cultivo se retira mediante una pipeta de vidrio conectada a una bomba de aspiración y se añaden disoluciones de los compuestos preparadas en medio DMEM sin SFB para evitar interferencias con los compuestos metálicos.

Todas las manipulaciones se realizaban en una campana de flujo laminar (Telstar AV-100), con el fin de mantener las condiciones de esterilidad en todo momento. Del mismo modo, cada material que se introduce en ella es tratado con etanol al 70% para evitar posibles contaminaciones.

3.4. Estudio de viabilidad celular mediante ensayo MTT y cálculo de IC₅₀

Con el fin de determinar la toxicidad que ejercen los compuestos sobre las células, se realiza el ensayo MTT. Este se basa en la capacidad que tienen las células para reducir el

compuesto bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) a azul formazán. Esta reacción la llevan a cabo las enzimas succinato-deshidrogenasa mitocondriales. Por tanto, en el caso de que las células sean viables, su actividad mitocondrial normal les permitirá llevar a cabo dicha reacción, con la consiguiente formación de unos cristales coloreados. Así, se pueden distinguir cualitativamente las células capaces de proliferar, que serán proporcionales a la intensidad de color azul obtenida.

Inicialmente, se sembraron 400.000 células en una placa de 96 pocillos, dejándolas crecer durante 24 horas. Pasado este tiempo, se procedió con el tratamiento de cada compuesto a las concentraciones deseadas. Como control negativo, se utilizó DMSO disuelto en medio sin SFB, con el fin de evitar interacciones con los complejos metálicos. A continuación, la placa se mantuvo en incubación con los compuestos metálicos durante 72 horas.

Para realizar el ensayo, se añadió en cada pocillo 10 μ l de MTT (5 mg/ml) disuelto en PBS y se incubó en estufa durante 3 horas a 37 °C. Por último, se eliminó el medio mediante inversión de la placa y se añadían 100 μ l de DMSO por pocillo para disolver los cristales de azul formazán. Se leyó la absorbancia a una longitud de onda de entre 570 y 690 nm en un espectrofotómetro (SPECTROstar Nano, BMG LABTECH).

Con los datos de absorbancia obtenidos, y tomando como referencia la del control negativo (100% viabilidad), se calculó el porcentaje de viabilidad para cada compuesto en su rango de concentraciones. Mediante una representación gráfica de la viabilidad respecto a concentración se calculó el valor de IC₅₀, que correspondía a la concentración de compuesto a la que la viabilidad celular se reduce al 50%.

3.5. Estudio de apoptosis. Doble tinción con Anexina V y PI

Con el fin de determinar el tipo de muerte producida en las células por los compuestos, se llevaron a cabo técnicas de citometría de flujo. Para ello, se utilizó por un lado un marcaje con Anexina V unida al fluorocromo FITC para su detección. Esta presenta afinidad de unión por la fosfatidilserina, que en el proceso apoptótico se transloca a la membrana externa. Además, se lleva a cabo un marcaje adicional con el colorante fluorescente yoduro de propidio (PI), que posee afinidad por el ADN y que penetrará en células cuya membrana se encuentre dañada porque se encuentren en apoptosis o necrosis.

Inicialmente, se sembraron células Caco-2/TC7 en botellas de 75 cm² a una densidad de 600.000 células por botella y se mantuvieron en cultivo durante 48 h. Pasado ese tiempo se trataron con los compuestos a la concentración deseada durante 48 h. Tras el tratamiento, las células se recogieron y tiñeron con Anexina V-FITC según las instrucciones del fabricante. Después se añadieron a tubos de citometría de flujo y se lavaron con PBS dos veces, se resuspendieron 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 adicionaron 5 μ L de Anexina V y 5 μ L de PI a cada 100 μ L de muestra. A continuación, se dejaron incubando 15 minutos a temperatura ambiente en oscuridad y se añadieron 400 μ L de buffer de unión

a Anexina V. La intensidad de fluorescencia se midió durante una hora con el citómetro de flujo FACSARIA BD y la señal obtenida se analizó mediante el software FACSDIVA BD.

3.6. Determinación de la activación de caspasa 3 y p53

Como paso inicial, se sembraron 600.000 células en botellas de 75 cm² y se mantuvieron en cultivo durante 48 h. Después, se trataron con los complejos metálicos a la concentración deseada durante 48 h.

A continuación, las células se pusieron en formaldehído al 0,01% durante 5 minutos y se centrifugaron a 300 g a temperatura ambiente. El pellet celular obtenido se resuspendió en una solución de digitonina 0,5% v/v en PBS y se incubó en oscuridad durante 15 minutos. Después, se lavó con PBS con digitonina al 0,1%. Se añadió 5 µL de anticuerpo anti-caspasa 3 (Novus, Clon C92-605) y anti-p53 (Miltenyi Biotec) en 100 µL de suspensión celular y se mezcló e incubó 1 hora a temperatura ambiente.

Seguidamente, se centrifugó 5 minutos a 3000 rpm y se lavó dos veces con PBS. Tras esto, las células se resuspendieron en PBS. El análisis de la fluorescencia se realizó con un citómetro de flujo BECKMANN COULTER GALLIOS (Brea California) equipado con un láser sólido de diodo azul (488nm) y un láser sólido de diodo rojo (635nm). Para la determinación de caspasa 3 se fijó la longitud de onda en 488 nm y emisión a 525 nm y para el análisis de p53 una longitud de onda de 635 nm para excitación y 660 nm de emisión.

3.7. Estudio de ciclo celular. Tinción de DNA con yoduro de propidio

Este ensayo va a permitir determinar si los complejos derivados de bencenosulfonamidas ejercen su efecto antitumoral deteniendo en ciclo celular en fase G₀/G₁ o G₂/M. Para ello, se cuantifica mediante citometría de flujo, la cantidad de colorante fluorescente yoduro de propidio, que las células incorporan al DNA celular debido a su especificidad de unión. La fluorescencia de dicho colorante es detectable gracias a que emite a una longitud de onda de 620 nm. El grado de proliferación celular y, por tanto, el avance en las fases del ciclo será mayor cuanto más señal de fluorescencia emitan las células.

En primer lugar, se sembraron 600.000 células Caco-2/TC7 en botellas de 75 cm² y se mantuvieron en cultivo durante 48 h. Posteriormente, se trataron con los complejos de estudio durante 48 h. A continuación, las células se fijaron en etanol 70% enfriado con hielo y se almacenaron a 4°C durante 24 h. Después, se realizó una centrifugación y rehidratación con PBS, previa a la tinción con yoduro de propidio (50 µg/ml; solución final con RNasa a 100 µg/ml). El contenido de las células se analizó con un FACSARRAY BD equipado con un láser de iones de argón. El porcentaje de células presentes en cada fase se determinó mediante el software de verificación MODIFIT 3.

3.8. Determinación de potencial mitocondrial (ψ_m)

El ensayo se llevó a cabo sembrando células Caco-2/TC7 en botellas de 75 cm² a una densidad de 600.000 células por botella y se mantuvieron en cultivo durante 48h. Pasado ese tiempo se trataron con cada uno de los compuestos de interés a la concentración

deseada durante 48 horas. Después, se lavaron las células con PBS atemperado dos veces y se resuspendieron en PBS a una concentración de 10^6 células/mL. Tras esto, se procedió a la adición de la sonda catiónica yoduro de 1,1',3,3,3'-hexametiléndicarbo-cianina (DiIc1 10 μ M) y se incubó 15 minutos a 37°C con 5% de CO₂. A continuación, se añadió 400 μ L de PBS a la muestra y se analizó la fluorescencia mediante citometría de flujo con un FACSARRAY BD a una longitud de onda de excitación de 633 nm y emisión de 658 nm.

Desde el apartado 3.5 hasta el 3.8, los ensayos de citometría de flujo se llevaron a cabo en el Servicio de Citometría del Centro de Investigaciones Biomédicas de Aragón (CIBA).

3.9. Determinación de los niveles intracelulares de ROS

Con el objetivo de determinar si los compuestos en estudio estaban alterando el equilibrio redox celular, se procedió a determinar los niveles de especies reactivas de oxígeno mediante un ensayo basado en la emisión de fluorescencia.

Primero, se sembraron las células en una placa de 96 pocillos, donde se dejaron en crecimiento durante 48 horas. A continuación, se incubaron los compuestos en estudio durante un periodo de 1 y 3 h a 37 °C. Se retiró el medio por aspiración y se lavó con PBS con el fin de eliminar cualquier resto que pudiera interferir en las medidas de fluorescencia. Las células se incubaron en oscuridad con la sonda fluorescente diclorofluoresceína (DCFH-DA) durante 35 min, para permitir su paso a través de la membrana celular. En el interior celular dicha sonda es degradada por la enzima esterasa, uniéndose posteriormente al H₂O₂. Se retiró el contenido de los pocillos por aspiración y se lavó 2 veces con PBS para eliminar los restos de sonda que no hayan penetrado en las células. Por último, se determinaron los niveles de fluorescencia en unidades arbitrarias en un espectrofotómetro (FLUOstar Omega, BMG Labtech) con filtros de 485 nm (excitación) y 520 (emisión). Tomando como referencia los datos de fluorescencia de un control no tratado con los complejos, se determina el tanto por ciento de ROS generado por los complejos de estudio.

3.10. Medida de la actividad tiorredoxina reductasa en lisado celular

Con el fin de estudiar la inhibición de dicha enzima se sembraron las células en botellas de 75 cm² y se trataron durante 24 horas con los compuestos de interés a la concentración deseada. Las botellas se tripsinizaron y se centrifugó su contenido con el fin de obtener un pellet celular. A continuación, se añadió a cada pellet 450 μ L de buffer de lisis que consta de tampón Tris-EDTA-NaCl (pH 7,6, H₂O, NaCl 0,15 M), y que contiene un inhibidor de proteasas. Posteriormente, con el fin de proceder a su lisis, las células se sometieron a sonicación durante 5 ciclos de 10 segundos, dejando 30 segundos de descanso entre cada ciclo para evitar sobrecalentamiento. Ello tiene la finalidad de romper las membranas y liberar el interior del contenido celular. Después, se centrifugó 1 minuto a 13000 rpm. En el sobrenadante quedan los componentes celulares menos pesados, como las proteínas. Este se transfirió a otro eppendorf y se llevó a cabo la determinación de la cantidad de proteínas presentes en dicho lisado mediante el método de Bradford.

Una vez obtenidas las muestras, se utilizó un kit para la determinación de actividad de la enzima tiorredoxina reductasa (Sigma® CS0170).

En una placa de 96 pocillos, se utilizó como control positivo enzima tiorredoxina reductasa diluida en un tampón de ensayo. Se añadió, por un lado, las muestras procedentes del lisado por sí solas y junto con un inhibidor específico de dicha enzima. A todos los pocillos se añadió buffer de trabajo que contiene el NADPH que será reducido por la actividad enzimática de la tiorredoxina. Por último, se añadió como sustrato de la enzima 6 µL de DTNB 100mM (ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoico). Para determinar la actividad, se mide la absorbancia a 412 nm cada 30 segundos, durante 22 minutos.

3.11. Interacción *in vitro* con la enzima tiorredoxina reductasa

Con el fin de determinar cómo afectaba la interacción de los complejos metálicos en estudio a la actividad de la enzima tiorredoxina reductasa *in vitro* se utilizó un kit (Sigma® CS0170). Se realizaron ligeras modificaciones en el protocolo para adaptarlo a la interacción con la enzima humana recombinante TrxR1 (Sigma® SRP6081), que se trata de la isoforma citosólica.

La prueba se llevó a cabo en placas de 96 pocillos, que contenían un tampón de ensayo (PBS 500 mM pH 7.0, 50 mM EDTA) y un tampón de reacción de la misma composición que el anterior, con el añadido de NADPH. Los compuestos de estudio se incubaron a concentración de IC₅₀ con 2 µL de enzima (0,5 mg/mL) a 25⁰C. El contenido de cada pocillo se completó con 180 µL de tampón de reacción. Por último, para iniciar la reacción se añadió como sustrato de la enzima 6 µL de DTNB 100 mM (en DMSO puro). Para determinar la actividad, se midió la absorbancia a 412 nm en ciclos de 30 segundos durante 22 minutos.

3.12. Interacción *in vitro* con la enzima anhidrasa carbónica

El fundamento de este ensayo reside en la medida de la actividad esterasa de la enzima anhidrasa carbónica, siguiendo la transformación del sustrato 4-paranitrofenilacetato (4-NPA) a nitrofenol. El producto de esta reacción presenta absorbancia a 405 nm, por lo que mediante un espectrofotómetro se puede cuantificar el grado de inhibición que los compuestos de estudio ejercen sobre dicha enzima.

Con el fin de estudiar la posible interacción *in vitro* de los compuestos en estudio con la enzima anhidrasa carbónica se utilizó la isoforma IX recombinante (Sigma® SRP6483). El ensayo se llevó a cabo en placas de 96 pocillos, a los que se añadieron 4 µL de los compuestos en estudio y 4 µL de enzima (50 µg/mL). Se completó el volumen hasta 90 µL con tampón PBS pH 7,35 (Sigma® D1408). Los compuestos se mantuvieron en incubación junto con la enzima durante 5 minutos a 25 °C y se inició la reacción con la adición de 10 µL 4-NPA (0,5 mM en metanol). Se midió la absorbancia a una longitud de onda de 405 nm en ciclos de 30 segundos durante 1h.

Además, se utilizó como el estándar de referencia un inhibidor denominado indisulam (E7070) (N-(3-cloro-7-indolil)-1,4-bencenodisulfonamida) (Sigma® SML1225). Este

está dirigido a las isoformas IX y XII, cuyo incremento de actividad está relacionado con los procesos tumorales.

3.13. Análisis estadístico

Todos los ensayos se llevaron a cabo un mínimo de 3 veces y en las placas de 96 pocillos se utilizaron como mínimo 4 pocillos por condición. Con los datos obtenidos se calculó la media y desviación estándar, que aparece representada gráficamente. Para determinar la significancia estadística se realizó la prueba t de Student de dos colas, donde se consideraron significativos valores iguales o menores a 0,05.

4. Resultados

4.1. Estudios de las propiedades fisicoquímicas de los compuestos

4.1.1. Estabilidad en un medio fisiológico (PBS)

Como se ha comentado anteriormente en el apartado de materiales y métodos, este ensayo es de gran utilidad en el descubrimiento de nuevos fármacos, ya que permitirá comprobar si los complejos en estudio se mantienen estables en disolución a lo largo del tiempo. Para ello se analizaron disoluciones de los complejos en una solución acuosa con PBS (Phosphate Buffered Saline) por espectroscopía UV-visible a lo largo del tiempo, tras su incubación a 37 °C. La medida de los correspondientes espectros de absorción UV/visible a diferentes tiempos nos podrá determinar si el complejo sufre algún tipo de reacción en las condiciones de medida, por la aparición o desaparición de bandas de absorción, así como la posibilidad de su degradación en forma de nanopartículas de oro. El hecho de conservar su estructura le permitirá actuar de forma eficaz tanto con las enzimas *in vitro*, como en el ambiente celular⁶⁰.

La **figura 9** recoge un ejemplo de espectro por cada familia de complejos estudiados, mientras que el resto se incluyen en el anexo (**Figuras An1 y 2**).

En dichos espectros no se aprecia ningún cambio significativo en las bandas de los complejos, el perfil de las bandas de absorción no se modifica y no aparecen bandas nuevas. La descomposición de estos complejos haría que apareciese una banda en torno a 500 nm correspondiente a la formación de nanopartículas de oro. La ausencia de esta banda, incluso tras 24 horas de incubación en medio pseudofisiológico, demuestra la estabilidad de estos complejos en las condiciones experimentales del experimento. La disminución de la intensidad de la absorbancia a lo largo del tiempo puede indicar una disminución de la solubilidad del compuesto en estas condiciones.

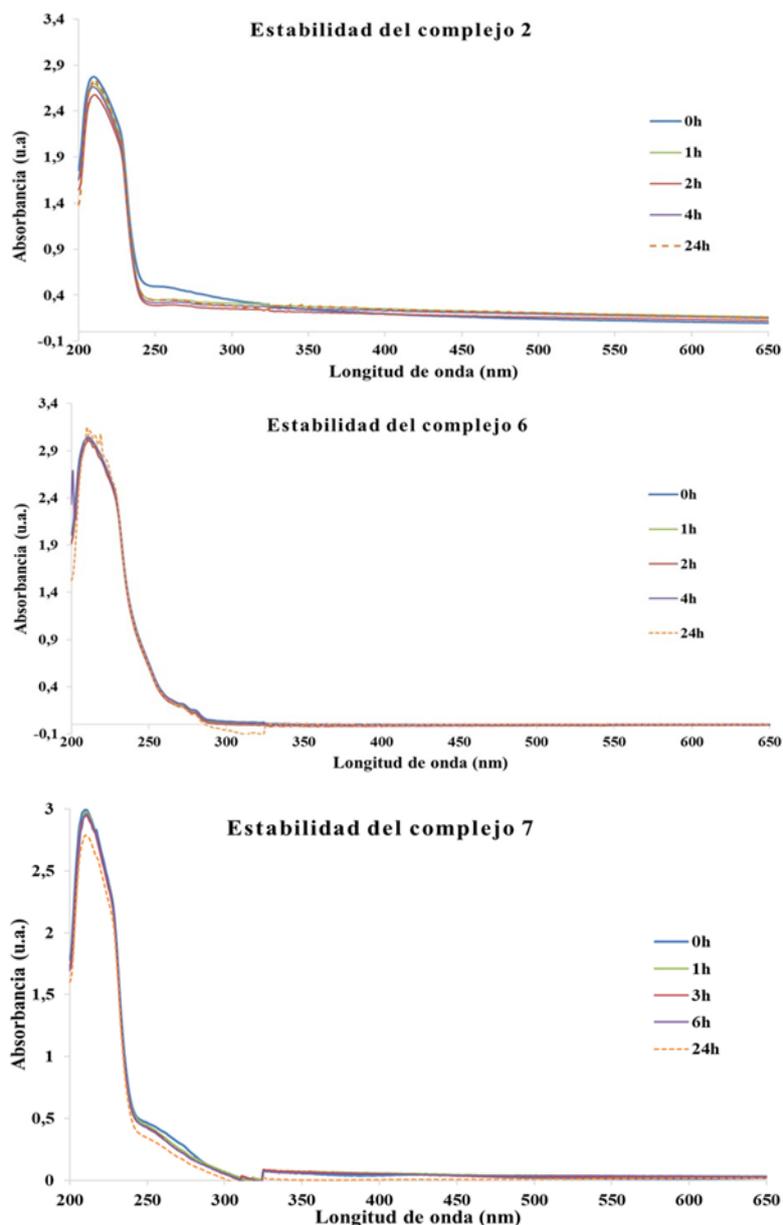


Figura 9. Gráficas de UV/visible obtenidas tras el estudio de estabilidad de los **complejos 2, 6 y 7** en PBS. Se recoge la evolución de la absorbancia con el tiempo en un rango de longitud de onda entre 200 y 650 nm.

4.1.2. Coeficiente de reparto ($\log P_{7,4}$)

La determinación del coeficiente de reparto es una forma sencilla de evaluar el carácter hidrófilo o hidrófobo de un compuesto químico. Esto es así porque el valor de este parámetro puede ser de utilidad para seleccionar aquellos candidatos que mejor atraviesen las membranas celulares para ejercer su acción.

Con el fin de lograr una adecuada absorción gastrointestinal, los fármacos deberían presentar un carácter moderadamente lipófilo, lo que se corresponde con un valor de $\log P_{7,4}$ comprendido entre 0 y 3. Valores por debajo de este rango o por encima

dificultarían su paso a través de las membranas celulares debido al excesivo carácter hidrófilo o hidrófobo⁶¹.

Como se puede observar en la **tabla 1**, todos los miembros de la familia de compuestos con ligando trifenilfosfina (**complejos 1 al 3**) tienen valores de $\log P_{7,4}$ positivos que se encuentran dentro del rango ideal. Tanto el **complejo 1** como el **2** presentan valores similares de este parámetro y en el **complejo 3** es ligeramente mayor. Puede que el cloro como sustituyente en la bencenosulfonamida incremente su lipofilidad. Por tanto, los miembros de esta familia de ligandos serían adecuados candidatos a futuros fármacos.

En cambio, todos los compuestos que portan la fosfina hidrosoluble trifenilfosfina-trisulfonada (TPPTS) (**complejos 4 al 6**) presentan valores negativos de $\log P_{7,4}$, lo que denota su hidrofiliidad. El **complejo 6** es el miembro que posee el mayor carácter hidrófilo ($\log P_{7,4}=-0,83$), siendo además el que posee esta característica más marcada de todos los compuestos ensayados.

Tabla 1. Valores del coeficiente de reparto agua-octanol ($\log P_{7,4}$) obtenidos para cada uno de los complejos en estudio.

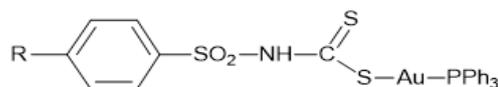
Compuesto	$\log P_{7,4}$
Complejo 1	0,75
Complejo 2	0,71
Complejo 3	0,91
Complejo 4	-0,40
Complejo 5	-0,78
Complejo 6	-0,83
Complejo 7	0,35
Complejo 8	-0,13
Complejo 9	0,42
Complejo 10	0,36

Respecto a la familia de compuestos con ligando carbeno, se obtienen valores similares de $\log P_{7,4}$ para tres de ellos (**Complejos 7, 9 y 10**) que se corresponden con un carácter moderadamente lipófilo y dentro del rango ideal para lograr una adecuada absorción. Destaca el caso del **complejo 8** cuyo valor de $\log P_{7,4}$, ligeramente negativo (-0,13), indica un cierto balance entre carácter lipófilo e hidrófilo.

4.2. Estudio de viabilidad celular mediante ensayo MTT y cálculo de IC_{50}

Con el objetivo de determinar si los compuestos en estudio ejercían un efecto citotóxico, se evaluó la concentración que era necesaria para disminuir la viabilidad celular al 50 %, mediante el cálculo del parámetro denominado IC_{50} . Para llevar a cabo dicho ensayo, se trataron células Caco-2/TC7 indiferenciadas con cada uno de los complejos metálicos y

se mantuvieron en incubación con ellos durante 72 h. Los resultados obtenidos quedan reflejados en las **tablas 2, 3 y 4** según el ligando que porta cada uno de los compuestos.

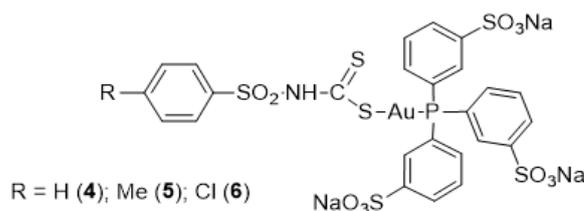


R = H (**1**); Me (**2**); Cl (**3**)

Figura 10. Estructura principal de los complejos con PPh_3 como ligando y sus distintos sustituyentes en la unidad bencenosulfonamida.

Tabla 2. Valores de IC_{50} obtenidos tras el tratamiento durante 72 h para los complejos de oro (I) que portan trifenilfosfina como ligando. Los **complejos 1, 2 y 3** se ensayaron a concentraciones de: 2,5-2-1,5-1-0,5 μM .

	Complejo 1	Complejo 2	Complejo 3
IC_{50} (μM)	1,14 \pm 0,25	1,25 \pm 0,35	1,70 \pm 0,15



R = H (**4**); Me (**5**); Cl (**6**)

Figura 11. Estructura principal de los complejos con TPPTS como ligando y sus distintos sustituyentes en la unidad bencenosulfonamida.

Tabla 3. Valores de IC_{50} obtenidos tras 72 h de tratamiento con los complejos de oro (I) que portan TPPTS como ligando. El **complejo 4** se ensayó a concentraciones de 40-35-30-20-15 μM . El **complejo 5** se ensayó en el rango de concentraciones 60-50-45-40-35 μM . El **complejo 6** se probó a concentraciones 50-40-30-20-10 μM .

	Complejo 4	Complejo 5	Complejo 6
IC_{50} (μM)	46,71 \pm 5,61	31,81 \pm 6,05	33,68 \pm 2,74

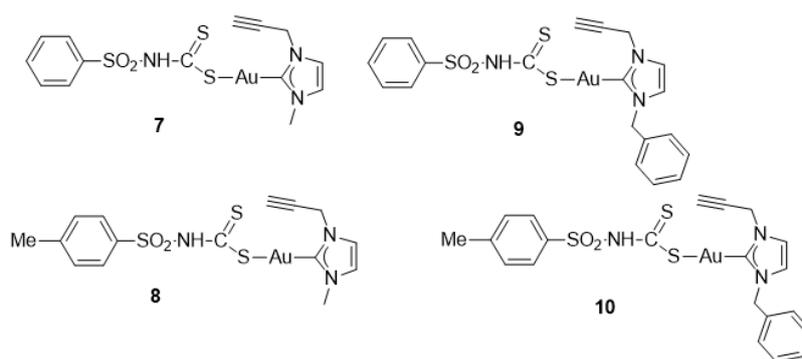


Figura 12. Estructura principal de los complejos con NHC como ligando y sus distintos sustituyentes en la unidad bencenosulfonamida y en el carbeno.

Tabla 4. Valores de IC_{50} obtenidos tras 72 h de tratamiento con los complejos de oro (I) que portan carbenos N-heterocíclicos como ligando. El **complejo 7** se ensayó en el rango 40-35-30-25-20 μM . El **complejo 8** se probó a las concentraciones 7,5-5-3,75-2,5-1,25 μM . El **complejo 9** se trató en el rango de concentraciones 12,5-10-7,5-5-2,5 μM . Por último, el **complejo 10** se trató con el rango 20-10-5-2,5-1,25 μM .

	Complejo 7	Complejo 8	Complejo 9	Complejo 10
IC₅₀ (μM)	33,27 \pm 5,01	7,22 \pm 0,38	8,56 \pm 1,68	13,15 \pm 3,34

De entre todos los complejos ensayados, la combinación de la unidad bencenosulfonamida los ligandos de trifenilfosfina (**Tabla 2**) parece ser la más efectiva desde el punto de vista de su citotoxicidad. Ello queda reflejado en que requieren la adición de menores concentraciones para reducir la viabilidad celular a la mitad. El más efectivo de todos es el **complejo 1**, seguido del resto de la familia que portan sustituyentes cloro y metilo en la unidad bencenosulfonamida (**complejos 2 y 3**, respectivamente). Precisamente estos complejos son los que presentan mayor carácter lipófilo con valores de $\log P_{7,4}$ próximos a 1. Entre estos tres miembros de la familia no se observan diferencias significativas en los valores de IC_{50} , lo que podría sugerir que la presencia de los sustituyentes metilo y cloro no incrementa su capacidad citotóxica.

Por otro lado, destaca el hecho de que la familia con la fosfina hidrosoluble trifenilfosfina-trisulfonada (TPPTS) presentan valores de IC_{50} mucho mayores, del rango 30 a 50 μM . (**Tabla 3**). De todos ellos, es el **complejo 4** el que posee un IC_{50} significativamente más alto, y no existen diferencias significativas entre el resto de los miembros de la familia (**complejos 5 y 6**).

En el caso de los complejos carbeno bencenosulfonamida, se observa que la presencia del sustituyente bencilo en anillo NHC (**complejo 9**) en lugar de metilo (**complejo 7**) mejora su citotoxicidad, como se puede observar en la **tabla 4**. Sin embargo, la combinación del sustituyente metilo tanto en el ligando bencenosulfonamida como en el carbeno

(**complejo 8**) es más efectiva que con la combinación metilo en la molécula de sulfonamida y bencilo en el carbeno (**complejo 10**). Ello se traduce en que se observen diferencias significativas de toxicidad entre estos compuestos. Otro aspecto por destacar es que el valor de IC₅₀ del **complejo 7** (33,27 μM) es significativamente mayor al resto de los miembros de la familia, a pesar de la similitud en su estructura.

Uno de los problemas que presentan los agentes quimioterápicos derivados de metales (como el cisplatino) y también muchos sin metales, es la falta de selectividad sobre células cancerosas respecto a las sanas, lo que puede derivar en efectos secundarios. Por ello, una vez determinados los valores de IC₅₀ en células Caco-2/TC7 indiferenciadas, se comprobó también su toxicidad en dos modelos de células sanas: fibroblastos epiteliales humanos y Caco-2/TC7 diferenciadas.

En primer lugar, se trataron fibroblastos humanos a la concentración de IC₅₀ obtenida anteriormente en Caco-2 indiferenciadas, incubándolas durante el mismo tiempo (72 h).

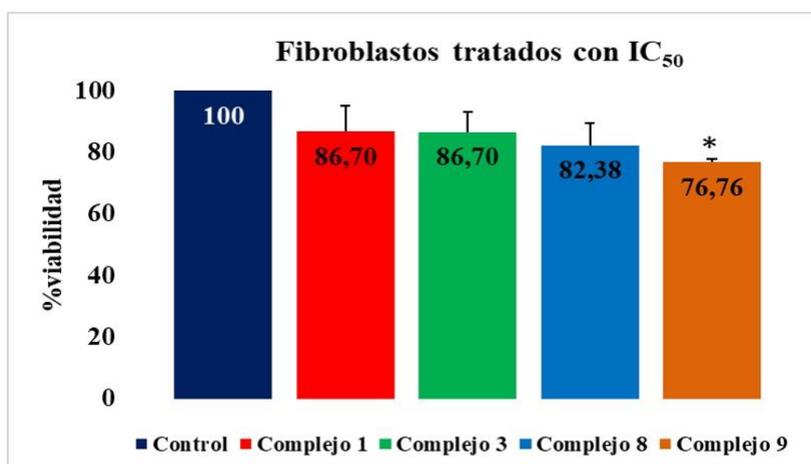


Figura 13. Porcentajes de viabilidad obtenidos tras el tratamiento de fibroblastos epiteliales con los complejos 1 (1,14 μM), 3 (1,7 μM), 8 (7,22 μM) y 9 (8,56 μM).

Como resultado se obtuvo que, de todos los compuestos ensayados, solamente el **complejo 9** era capaz de disminuir significativamente la viabilidad (aproximadamente un 23%). Además, los **complejos 1 y 3** eran los que mantenían los niveles más altos. En cuanto a la familia con ligandos carbenos, el **complejo 8** era el que mayor viabilidad mantenía.

Para reafirmar la ausencia de toxicidad de los complejos sobre células sanas, se optó de nuevo por el modelo de células Caco-2/TC7, pero en este caso aprovechando su capacidad de diferenciarse una vez que ha llegado a la confluencia. Cuando llegan a estas condiciones, adoptan la morfología y características propias de los enterocitos⁵⁸⁻⁵⁹.

En este sentido, y con el fin de comprobar la toxicidad de los complejos en células sanas, se trató las células Caco-2/TC7 diferenciadas con las concentraciones correspondientes al IC₅₀ obtenidas en indiferenciadas. De esta forma, se pretendió comprobar que, la

concentración obtenida en células cancerosas no sería capaz de afectar a la viabilidad de células sanas localizadas en tejidos circundantes al tumor.

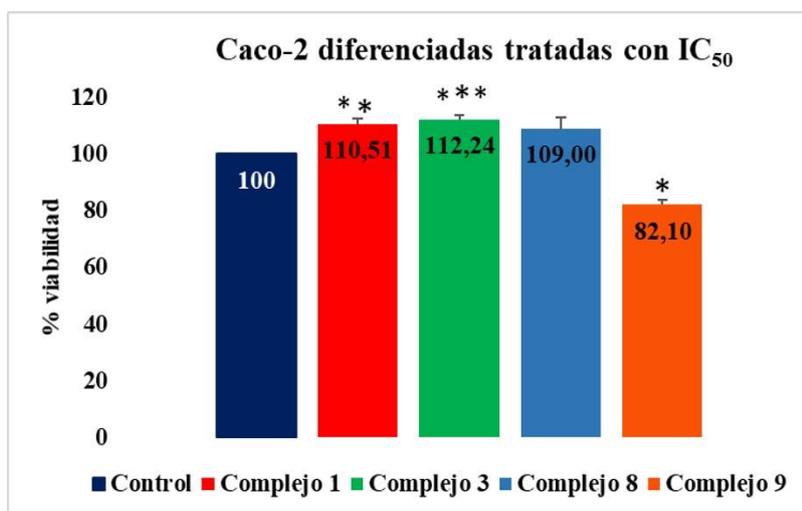


Figura 14. Porcentajes de viabilidad obtenidos tras el tratamiento de células Caco-2 diferenciadas con los **complejos 1** (1,14 μM), **3** (1,7 μM), **8** (7,22 μM) y **9** (8,56 μM). Los asteriscos indican los p-valores obtenidos tras realizar la prueba t de Student de dos colas a los datos obtenidos. (* $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$).

No se observa disminución significativa de la viabilidad para 3 de los compuestos ensayados (**complejo 1, 3 y 8**), incluso esta se encuentra ligeramente incrementada respecto al control. Por otro lado, en el caso del **complejo 9** sí se observa un significativo descenso de aproximadamente un 18% de viabilidad. Esto corrobora los resultados anteriores obtenidos con los fibroblastos (**Figura 13**), ya que tampoco disminuía en exceso la viabilidad.

Los ensayos en células Caco-2 diferenciadas también permitieron el cálculo del parámetro denominado índice de selectividad, como el cociente del IC_{50} obtenido en células sanas (diferenciadas) entre el IC_{50} obtenido en células cancerosas (**Tabla 5**). Este parámetro será de gran ayuda en la elección de los mejores candidatos como potenciales agentes antitumorales, siendo estos los que presenten el valor más alto de índice de selectividad. Todo ello se traduce en que, ante un posible uso terapéutico provocarán la muerte de las células cancerosas sin que esto afecte a las sanas, evitando posibles efectos secundarios.

Tabla 5. Valores de IC_{50} obtenidos en células Caco-2 diferenciadas junto con el cálculo de su índice de selectividad.

Compuesto	IC_{50} Caco-2 diferenciadas (μM)	Índice de selectividad
Complejo 1	12,72 \pm 0,47	11,2
Complejo 3	14,28 \pm 0,19	8,05
Complejo 8	46,62 \pm 3,26	6,46
Complejo 9	19,54 \pm 2,64	2,28

Por último, se quiso comprobar la toxicidad que presentaban dichos compuestos, utilizando tiempos de incubación menores (24 y 48 h). De esta forma, la **tabla 6** recoge los valores de IC_{50} obtenidos a estos tiempos. Por otro lado, las curvas dosis-respuesta de las **figuras 15 y 16** recogen la evolución de la viabilidad celular con respecto a la concentración y el tiempo.

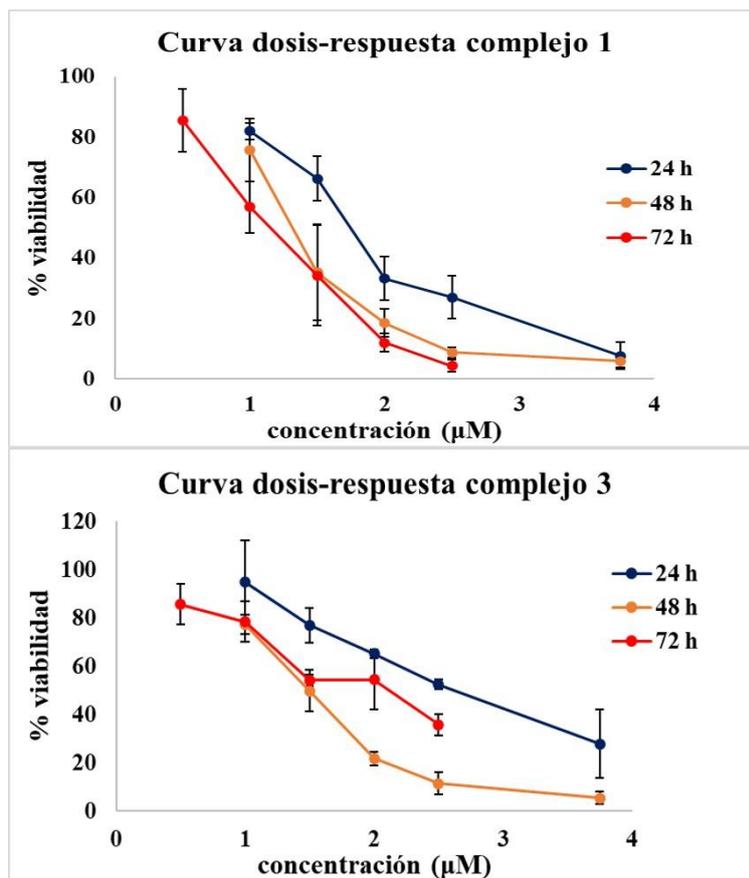
Los resultados obtenidos indicaban que en el caso de los **complejos 1 y 3** existen diferencias significativas para los valores de IC_{50} obtenidos a 24 h respecto a 48 y 72 h. En cambio, no se producen cambios significativos de viabilidad entre el tratamiento a 48 h y su prolongación hasta 72 h. Por tanto, a las 48 h alcanzan su máxima efectividad y a partir de ese momento esta deja de ser dependiente del tiempo que esté en contacto el compuesto con las células.

Como aspecto notable, el **complejo 8** es muy ineficaz a menores tiempos de incubación (48 h) donde sus valores son aproximadamente 5 veces mayores que para tratamientos de 72 h. Su ineficacia se hizo patente todavía más al acortar el tiempo a 24 h, donde no fue capaz de disminuir la proliferación celular a pesar de las altas concentraciones utilizadas (mayores de 50 μ M).

El **complejo 9** guarda similitud con los **complejos 1 y 3** en el incremento significativo de 24 a 48 h y 24 a 72 h de incubación. Se diferencia de los anteriores en que la ampliación de dicho tiempo de 48 a 72 h sí aumenta su toxicidad, lo que se traduce en un valor de IC_{50} un 55% menor.

Tabla 6. Valores de IC_{50} obtenidos tras el tratamiento con los **complejos 1, 3, 8 y 9** durante tiempos de incubación de 24, 48 y 72 h.

Compuesto	IC_{50} 24 h tratamiento (μ M)	IC_{50} 48 h tratamiento (μ M)	IC_{50} 72 h tratamiento (μ M)
Complejo 1	1,92 \pm 0,13	1,38 \pm 0,21	1,14 \pm 0,25
Complejo 3	2,48 \pm 0,14	1,51 \pm 0,10	1,70 \pm 0,15
Complejo 8	>50	37,41 \pm 7,48	7,22 \pm 0,38
Complejo 9	31,25 \pm 6,85	15,48 \pm 1,89	8,56 \pm 1,68



*Figura 15. Curvas dosis-respuesta en las que se muestra la evolución de la toxicidad de los **complejos 1 y 3** a tres tiempos de incubación distintos (24, 48 y 72 h). La desviación estándar de cada dato está representada con barras de error.*

Por otro lado, las curvas dosis-respuesta de la **figura 15** reflejan como en el caso del **complejo 1** la viabilidad va disminuyendo progresivamente conforme se van incrementando los tiempos de incubación. Además, para una misma concentración se confirman las ligeras diferencias de viabilidad que se obtienen con un tratamiento de 48 h respecto al de 72 h. Para el **complejo 3** el incremento de incubación hasta 48 h disminuye notablemente la viabilidad. Es remarcable que, incluso para las mayores concentraciones ensayadas, su toxicidad es mayor a 48 h que a 72 h de incubación.

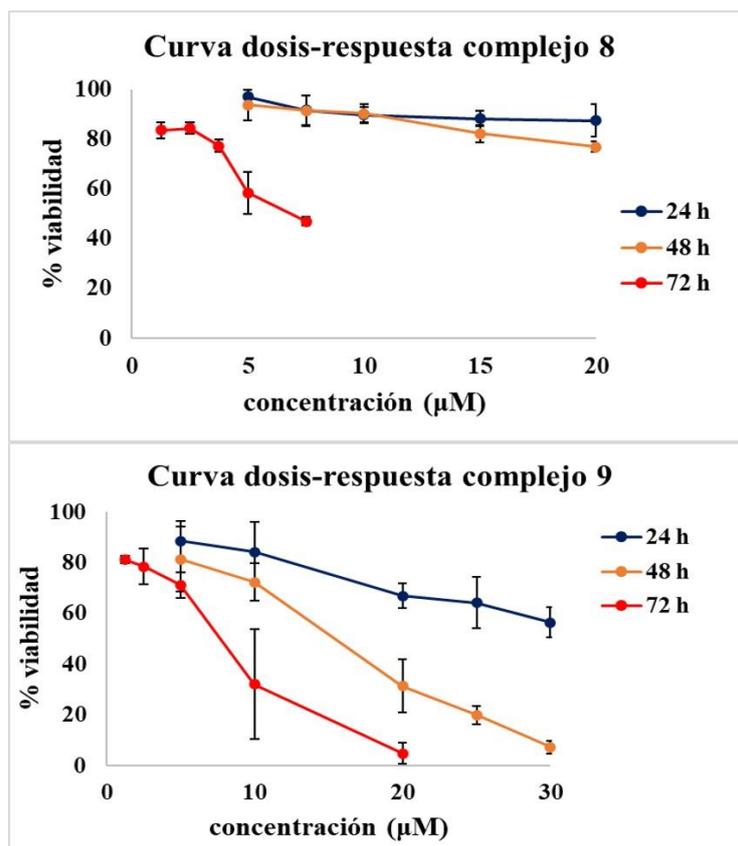


Figura 16. Curvas dosis-respuesta que muestran la toxicidad de los complejos 8 y 9 al tratar las células Caco-2/TC7 con tres tiempos de incubación (24, 48 y 72 h). La desviación estándar de cada dato está representada con barras de error.

La curva dosis-respuesta de la **figura 16** para el **complejo 8** refleja su ineficacia en el tratamiento a 24 y 48 h, como ya se veía antes con los altos valores de IC_{50} obtenidos en la **tabla 6**. También se observa un marcado descenso de viabilidad al incrementar el tiempo de incubación hasta 72 h. Esto refleja que su actuación es la más lenta de todas, y requiere un periodo de activación y de un mayor tiempo en contacto con las células para disminuir su crecimiento.

Por último, la curva del **complejo 9** muestra la progresiva disminución de viabilidad conforme aumenta el tiempo de incubación. En su caso, su toxicidad incrementa de forma gradual con el tiempo, alcanzando su máximo a las 72 h de incubación.

Los resultados obtenidos tras todos los ensayos de toxicidad, determinaron que los compuestos que presentaban mayor índice de selectividad y que mantenían mejor la viabilidad al tratar con la concentración de IC_{50} en células sanas eran los **complejos 1 y 3**. No obstante, se eligieron aquellos que poseían mayor selectividad de cada familia para posteriores ensayos (**Complejo 1** como fosfina ditiocarbamato y **complejo 8** como

carbeno ditiocarbamato), con el objetivo de comprobar posibles diferencias de efectividad entre los dos tipos de ligandos trifenilfosfina y carbeno (**Figura 17**).

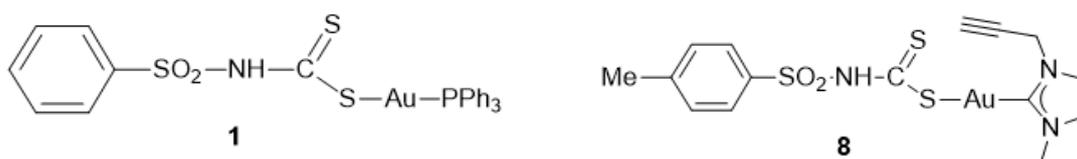


Figura 17. Estructura de los complejos elegidos para profundizar en ellos con estudios biológicos adicionales: **complejo 1** (fosfina ditiocarbamato) y **2** (carbeno ditiocarbamato).

4.3. Estudio de apoptosis

Una vez que se ha comprobado la capacidad de los compuestos en estudio de disminuir la población celular se evaluará el tipo de muerte que estos son capaces de provocar. Durante el proceso de apoptosis o muerte celular programada, las células experimentan una serie de cambios morfológicos. Uno de ellos es la translocación de la fosfatidilserina desde la cara interna de la membrana plasmática a la externa.

Gracias a la afinidad que presenta la proteína Anexina V hacia la fosfatidilserina, y su conjugación con el fluorocromo FITC, es posible determinar el porcentaje de células que se mantienen viables y aquellas que han entrado en apoptosis. La adición de yoduro de propidio (PI) para conseguir un doble marcaje permitirá distinguir una segunda señal de fluorescencia. Esta se corresponde con aquellas células cuya membrana plasmática ha perdido la integridad, por encontrarse en fases tardías de apoptosis o en necrosis.

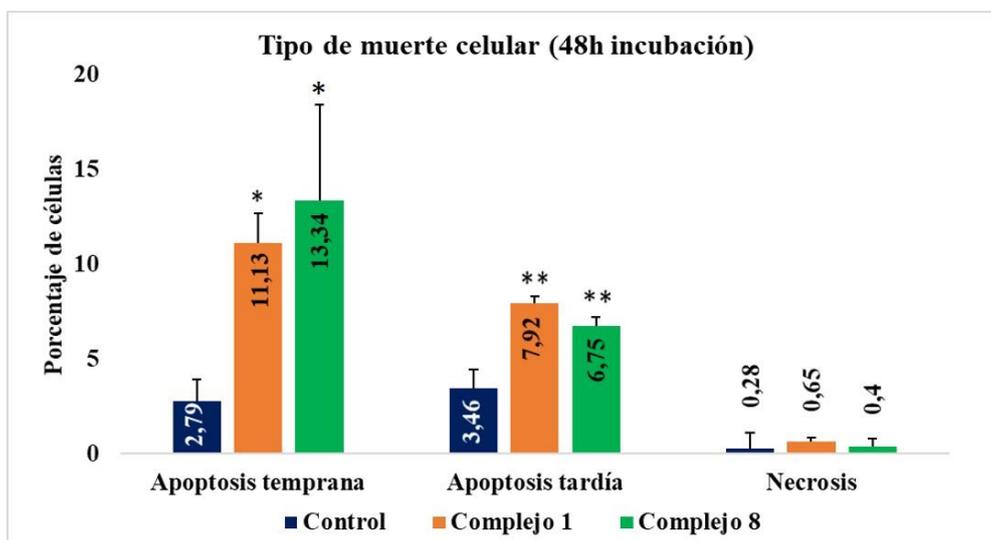


Figura 18. Porcentaje de células que se encuentran en la etapa de apoptosis temprana y tardía o en necrosis tras el tratamiento durante 48 h con el **complejo 1** (1,14 μ M) y **8** (14,44 μ M). Dicho porcentaje se compara con un control tratado durante el mismo tiempo con DMSO. P-valores (* $p < 0,05$ ** $p < 0,01$).

Como se observa en la **figura 18**, para ambos compuestos existe un incremento significativo del porcentaje de células en apoptosis temprana y tardía respecto al control tratado con DMSO. A pesar de ello, mientras que para ello el **complejo 1** requiere una concentración de IC_{50} , el **complejo 8** necesita un incremento hasta $2IC_{50}$. El **complejo 1** es capaz de mantener en apoptosis temprana aproximadamente 4 veces más células que el control y 2 veces más células en apoptosis tardía. Para el **complejo 8** el aumento es de casi 5 veces más en temprana y casi 2 veces más en tardía.

Cabe recalcar que en los dos casos se mantienen unos bajos porcentajes de células en necrosis, sin observarse diferencias significativas respecto al control tratado con DMSO (**Figura 16**). Por tanto, estos resultados son los deseables con el fin de evitar un proceso inflamatorio, ante una posible aplicación terapéutica.

Ante estos resultados, se puede deducir que ambos compuestos en estudio (**complejo 1 y 8**) son capaces de provocar la muerte por apoptosis en las células Caco-2/TC7. Para confirmar este hecho se analizará la activación de la proteína caspasa 3, que se encuentra implicada en dicho proceso.

4.4. Activación de caspasa 3

La enzima cisteín-proteasa caspasa 3 ejerce un papel clave en el proceso apoptótico. Ello se debe a que se encuentra entre las proteínas ejecutoras que, finalmente desencadenarán todos los cambios morfológicos y estructurales que acabarán con la muerte celular.

Se puede observar en la **figura 19** que, tras 48 horas de tratamiento, tanto el **complejo 1** como el **8** provocan un incremento significativo de caspasa 3 activada respecto al control. Dicho aumento se refleja en aproximadamente el triple porcentaje de células con dicha cisteín-proteasa activada en ambos casos.

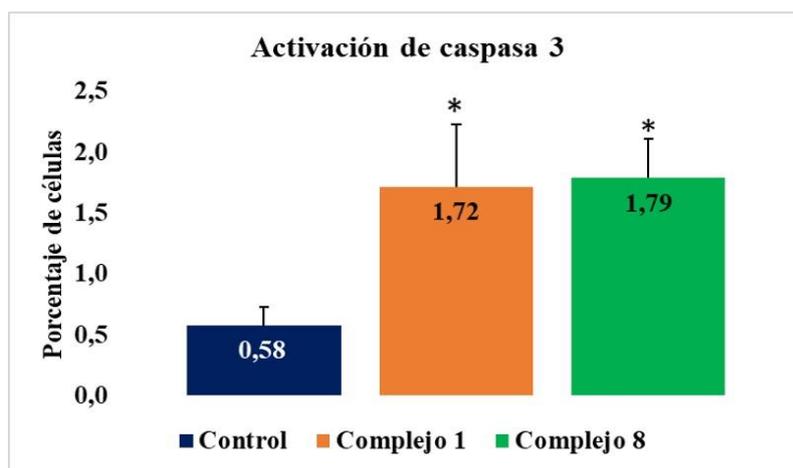


Figura 19. Porcentaje de células que poseen caspasa 3 activada tras el tratamiento durante 48 h con el **complejo 1** ($1,14\mu M$) y **8** ($14,44\mu M$). Los valores estadísticamente significativos ($p < 0,05$) obtenidos en la prueba *t* de Student se indican con un asterisco.

4.5. Determinación del potencial mitocondrial (ψ_m)

En este ensayo se utiliza la sonda fluorescente catiónica DilC1, que es capaz de acumularse en el interior de las mitocondrias cuyo potencial (ψ_m) se encuentra inalterado. En el caso de que se produzca un estrés o daño celular, como el provocado por los compuestos en estudio, se desencadena la vía intrínseca de la apoptosis. En ella, se activan proteínas como Bax y Bak que generan poros en la membrana mitocondrial, liberando la sonda DilC1. Por tanto, la intensidad de fluorescencia determinada por citometría de flujo será proporcional a nivel de potencial mitocondrial que se encuentra intacto.

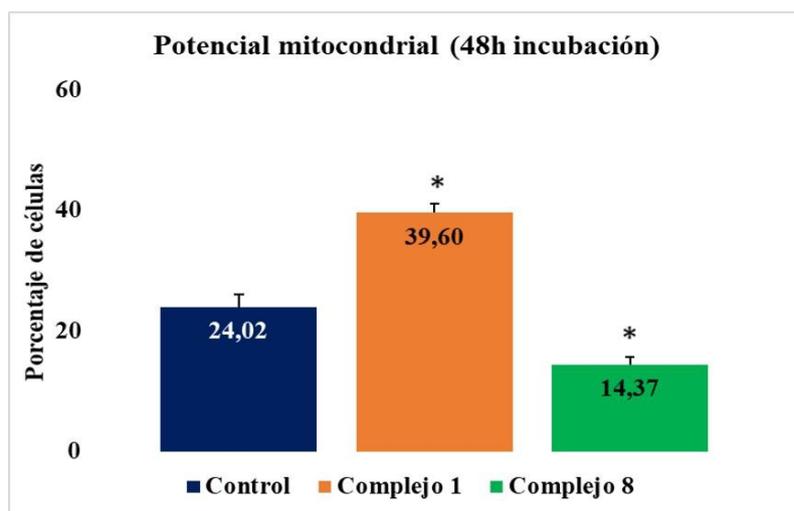


Figura 20. Porcentaje de células que poseen el potencial mitocondrial (ψ_m) alterado tras 48h de tratamiento con el **complejo 1** (1,14 μ M) y el **complejo 8** (14,44 μ M). Los valores estadísticamente significativos ($p < 0,05$) obtenidos en la prueba *t* de Student se indican con un asterisco.

Los resultados obtenidos indican que el **complejo 1** es capaz de alterar significativamente el potencial mitocondrial (ψ_m) de las células como una de las vías para provocar su muerte. Por otro lado, el **complejo 8** no solo es incapaz de ello, sino que la tendencia observada correspondía a niveles menos alterados que los del control. Esta ausencia de modificaciones en la mitocondria podría indicar que este compuesto sigue una vía distinta a la intrínseca para provocar la muerte celular.

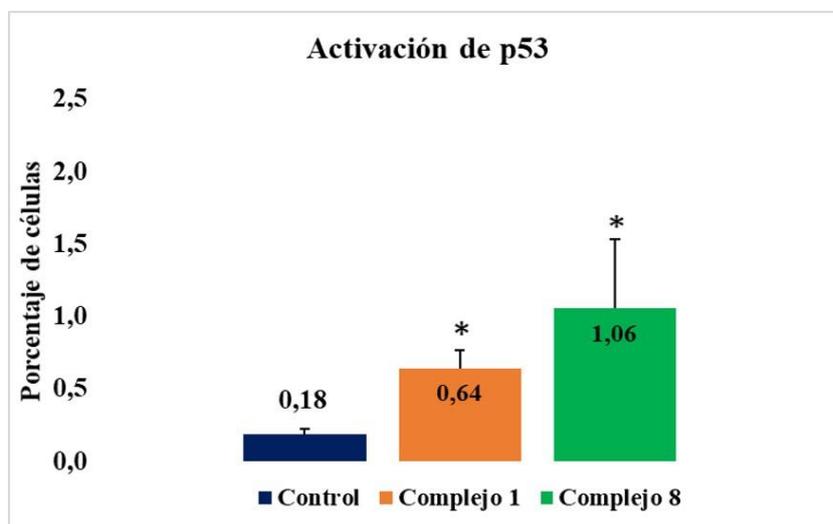
4.6. Activación de p53

La activación de la proteína supresora de tumores p53 ocurre ante un daño externo en el material genético de la célula (como el que podría provocar un fármaco), con el fin de detener la progresión del ciclo celular. Por ello, al conseguir su activación se podría retener las células cancerosas en alguna fase del ciclo celular, evitando su proliferación incontrolada.

En la **figura 21** aparecen los resultados que confirman un aumento significativo de la proteína p53 activada respecto al control, para ambos compuestos. Este es ligeramente

más notable en el caso del **complejo 8** (6 veces mayor que el control) que para el **complejo 1** (aproximadamente 3,5 veces mayor que el control).

Los posteriores ensayos de citometría permitirán dilucidar si en efecto se produce una detención del ciclo celular, así como el porcentaje de células que queda retenida en cada fase.



*Figura 21. Porcentaje de células que poseen p53 activado tras el tratamiento durante 48 h con el **complejo 1** (1,14 μ M) y **8** (14,44 μ M). Los valores estadísticamente significativos ($p < 0,05$) obtenidos en la prueba t de Student se indican con un asterisco.*

4.7. Estudio de ciclo celular

Anteriormente se ha visto como otros compuestos que portan unidades de bencenosulfonamida son capaces de afectar al ciclo en líneas celulares cancerosas²⁴. Por ello, se pretende comprobar si los compuestos en estudio que combinan las sulfonamidas con oro(I) y distintos ligandos, actúan de la misma forma.

Dado que tanto el **complejo 1** como el **8** eran los más eficaces de cada familia en disminuir la población de células Caco-2/TC7, se estudió su capacidad de detener el ciclo celular. Para ello, se realizó la tinción con la sonda fluorescente PI que tiene afinidad por el ADN celular y se llevaron a cabo técnicas de citometría de flujo. El hecho de que en la fase S se duplique el material genético permitirá distinguir las células que se encuentran en fase G₂/M, ya que presentarán la mitad de fluorescencia que las que se encuentran en fase G₀/G₁.

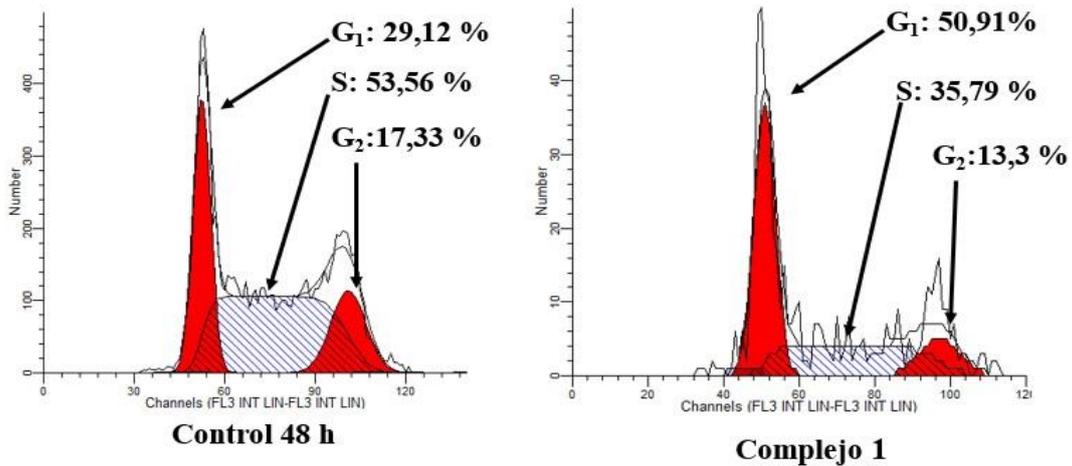


Figura 22. Gráfica de citometría obtenida tras la determinación del ciclo para el **complejo 1**. En ella se indica el porcentaje de células que se encuentran en cada fase del ciclo: G₁, S y G₂. Las células se mantuvieron en tratamiento con el **complejo 1** (1,14 μM) durante 48 h y se utilizó como control negativo células tratadas durante el mismo tiempo con DMSO.

Como muestra la **figura 22**, el **complejo 1** fue capaz de detener el ciclo en fase G₁, manteniendo aproximadamente el doble de células en esta fase respecto al control, tras 48 h de incubación. Por otro lado, el **complejo 8** parecía que actuaba de forma más lenta y a las 48 h de tratamiento no era capaz de detener el ciclo. El incremento de los tiempos de incubación hasta 72 h, reduciendo su concentración a IC₅₀ respecto a los otros ensayos de citometría, fue suficiente para provocar una detención de aproximadamente el doble de células en la fase G₂ (**Figura 23**). De esta forma, no impidió la duplicación de su material genético, aunque sí evitó que se produjera la división por mitosis.

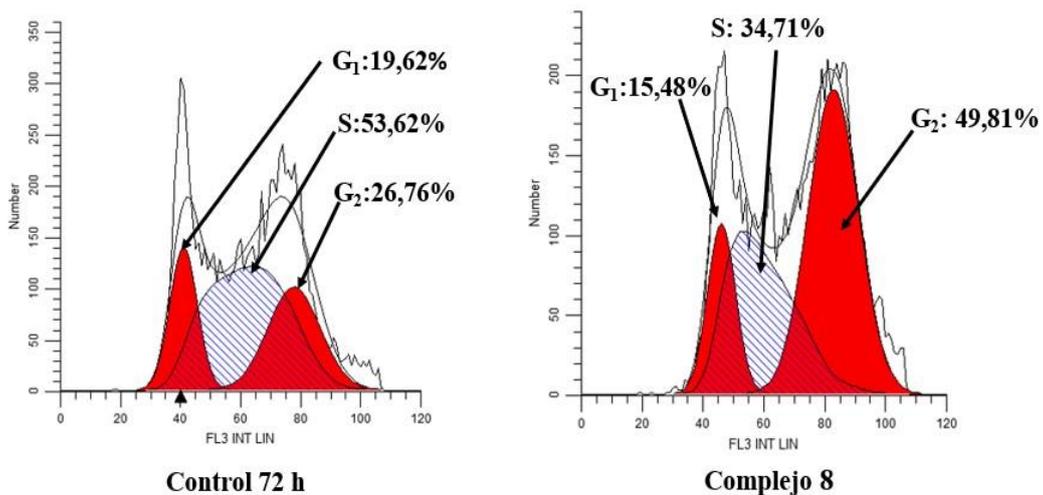


Figura 23. Gráfica de citometría obtenida tras la determinación del ciclo para el **complejo 8**. En ella se indica el porcentaje de células que se encuentran en cada fase del ciclo: G₁, S y G₂. Las células se mantuvieron en tratamiento con el **complejo 8** (7,22 μM) durante 72 h y se utilizó como control negativo células tratadas durante el mismo tiempo con DMSO.

4.8. Determinación de niveles intracelulares de ROS

Una vez evaluados los efectos de los compuestos sobre la muerte celular, se quiso comprobar si este hecho se encontraba relacionado con un incremento de los niveles de ROS intracelulares. Para ello, se utilizó la sonda fluorescente DCFH-DA, que es capaz de unirse al peróxido de hidrógeno.

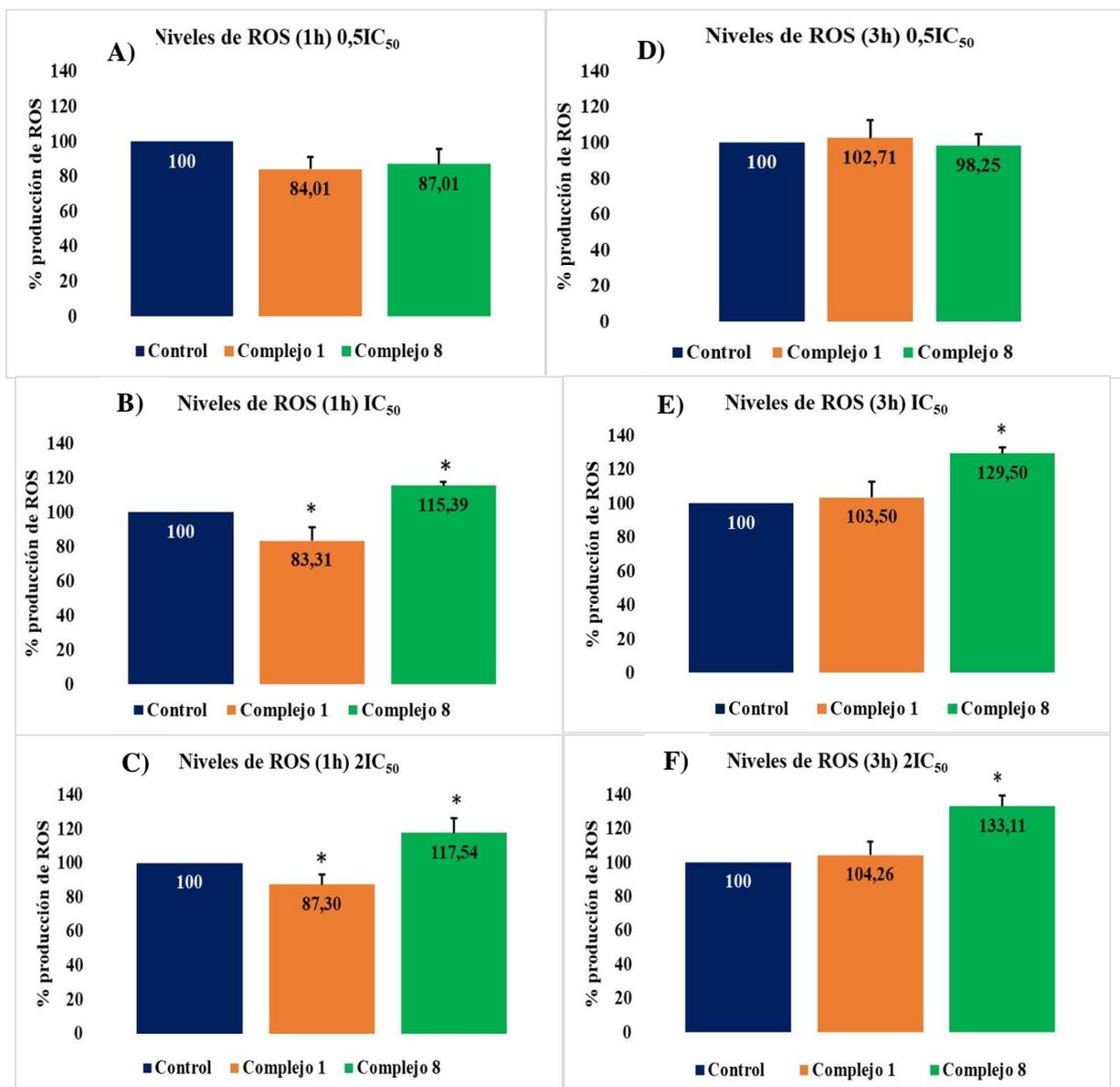


Figura 24. Determinación de los niveles de ROS intracelulares tras el tratamiento de las células Caco-2/TC7 con: A) **Complejo 1** (0,57 μ M) y **complejo 8** (3,61 μ M) durante 1 hora; B) **Complejo 1** (1,14 μ M) y **complejo 8** (7,22 μ M) durante 1 hora; C) **Complejo 1** (2,28 μ M) y **complejo 8** (14,44 μ M) durante 1 hora; D), E) y F) Se corresponden con las mismas concentraciones aplicadas en A), B) y C) respectivamente, pero con su tratamiento durante 3 horas.

En la **figura 24** se observa que, para tiempos de incubación de 1 hora, el **complejo 1** no es capaz de producir un efecto prooxidante en todas las concentraciones ensayadas, ni siquiera con la concentración más elevada equivalente a 2IC₅₀ (2,28 μ M). Incluso al

incrementar las concentraciones se da el efecto contrario, antioxidante. Por otro lado, en el caso del **complejo 8** sí se observa un aumento estadísticamente significativo de ROS al tratar a una concentración correspondiente a su IC_{50} ($7,22 \mu M$), ocurriendo lo mismo al incrementarla hasta el equivalente a $2IC_{50}$ ($14,44 \mu M$).

El incremento de los tiempos de incubación a 3 horas provoca un ligero aumento de la cantidad de ROS generada por el **complejo 1**, aunque este nunca llega ser estadísticamente significativo respecto al control. Esto podría indicar que la generación de ROS no se encuentra dentro del mecanismo de acción de dicho complejo de oro(I).

Respecto al **complejo 8** se observa una elevación estadísticamente significativa de ROS respecto a los tiempos de incubación de 1 h para las mismas concentraciones, salvo en la más baja correspondiente a $0,5IC_{50}$ ($3,61 \mu M$). En el caso de las concentraciones de IC_{50} ($7,22 \mu M$) y $2IC_{50}$ ($14,44 \mu M$), se produce un incremento de los niveles significativo respecto al control. Esto sugiere la posibilidad de que este complejo actúe a través del mecanismo que implica un incremento de ROS, para provocar un desequilibrio redox. Destaca que para ambos tiempos de incubación ensayados (1 y 3 h) no hay cambios significativos entre las concentraciones de IC_{50} y $2IC_{50}$, por lo que se deduce que su mecanismo de acción por esta vía no es dependiente de la concentración.

4.9. Interacción *in vitro* con la enzima tiorredoxina reductasa

La enzima tiorredoxina reductasa (TrxR) es una de las enzimas implicadas en el metabolismo redox. Por ello, su inhibición es interesante ya que podría provocar una elevación de ROS, y provocar la muerte de las células cancerosas. Además, el hecho de que sea una de las dianas de complejos de oro, suscitó el estudio de su actividad en un lisado celular. Sin embargo, no se pudieron obtener resultados significativos y por ello se optó por determinar la interacción únicamente entre enzima y compuesto *in vitro*. Ello permitiría evaluar si los **complejos 1** y **8** que se habían seleccionado eran capaces de inhibir dicha enzima y reducir sus niveles de actividad.

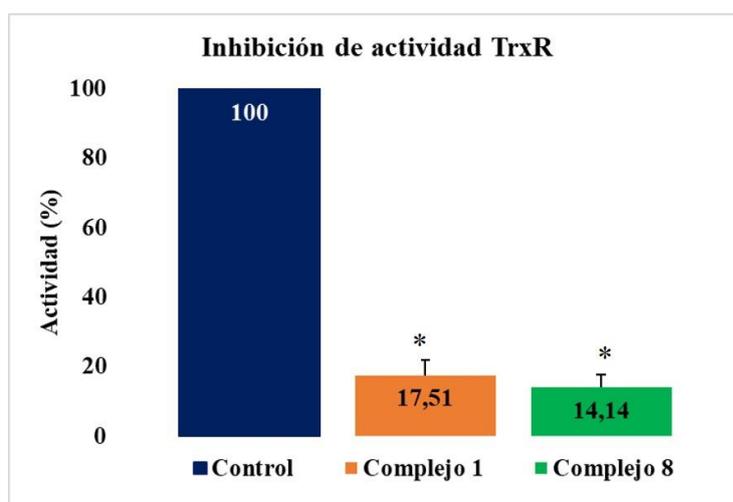


Figura 25. Determinación de la actividad reductasa de la TrxR1 recombinante tras la incubación *in vitro* con el **complejo 1** ($1,14 \mu M$) y el **complejo 8** ($7,22 \mu M$) durante 5 minutos.

Los resultados recogidos en la **figura 25**, muestran que ambos compuestos son capaces de interaccionar *in vitro* con la enzima tioredoxina reductasa a las concentraciones correspondientes a su IC₅₀. Ello se traduce en descensos significativos de su actividad: 82,49% para el **complejo 1** y un 85,86% de disminución para el **complejo 8**. Esto era de esperar debido a la afinidad intrínseca de algunos metales (entre ellos el oro), por la unión a los residuos de selenocisteína de esta enzima.

4.10. Interacción *in vitro* con enzima anhidrasa carbónica IX

El hecho de los complejos de oro(I) en estudio porten unidades de bencenosulfonamida, sugiere que la enzima anhidrasa carbónica podría ser una diana adicional a la que podrán dirigirse. Concretamente, la isoforma AC IX es aquella cuya expresión es más específica en tejido tumoral, en comparación con el tejido normal. Por ello, se quiso comprobar si los **complejos 1 y 8** eran capaces de interaccionar *in vitro* con esta enzima, disminuyendo su actividad. Además, se utilizó como referencia indisulam, que es un inhibidor conocido de dicha isoforma.

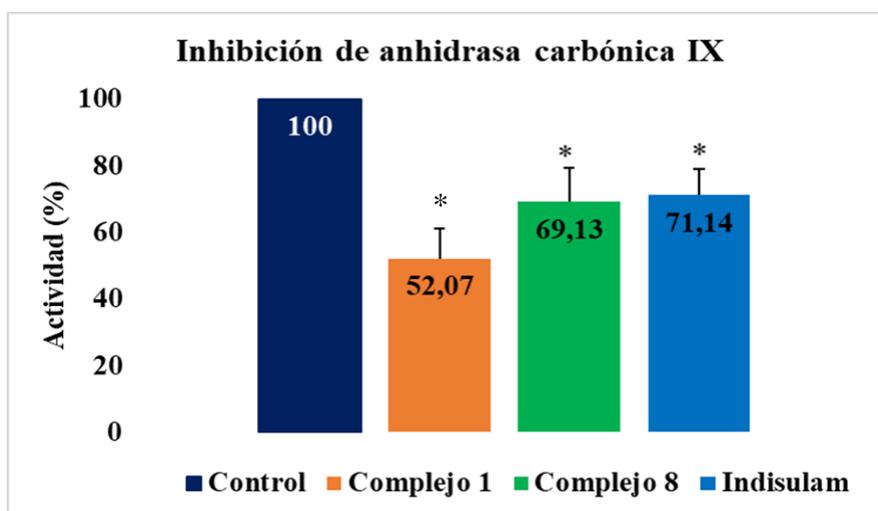


Figura 26. Determinación de la actividad esterasa de la enzima anhidrasa carbónica IX tras 5 minutos de incubación con el **complejo 1 y 8** (30µM) e indisulam (60µM).

Los resultados de la **figura 26** indican una reducción significativa de la actividad esterasa de la anhidrasa carbónica para ambos compuestos. El **complejo 1** fue capaz de disminuirla aproximadamente un 48% a una concentración de 30 µM, convirtiéndolo en un mejor inhibidor que el **complejo 8**, ya que a la misma concentración este complejo solo la reducía en un 31%. Destaca que el inhibidor indisulam requirió el doble de concentración (60 µM) para lograr una inhibición similar a la del **complejo 8**. Por tanto, ambos compuestos son capaces de inhibir la isoforma AC IX, además de conseguirlo a menores concentraciones que el inhibidor de referencia indisulam.

5. Discusión

En este trabajo se han testado 10 complejos de oro(I) con dos ligandos diferentes: un ditiocarbamato derivado de la unidad bencenosulfonamida con una molécula de fosfina (liposoluble PPh₃ o hidrosoluble TPPTS) (**complejos 1-6**) y un ligando del tipo carbeno N-heterocíclico con diferentes sustituyentes (**complejos 7-10**) frente a células cancerosas Caco-2/TC7. Además, se han estudiado los posibles mecanismos a través de los cuales son capaces de provocar la muerte de las células cancerosas.

Inicialmente, se llevó a cabo una evaluación de sus propiedades fisicoquímicas. Estas son fundamentales en el diseño de futuros fármacos ya que características como la lipofilia influirán en su correcta absorción, distribución y metabolización en el organismo. Para ello, se calculó el coeficiente de reparto LogP_{7,4}, basándose en la diferente afinidad de cada complejo por una bifase constituida por agua y n-octanol. Este último simula la bicapa lipídica de la membrana debido a la analogía de su estructura con los fosfolípidos. Además, el agua y el octanol tienen grupos hidroxilo que permiten interacciones polares con los compuestos⁶².

Los valores de LogP_{7,4} obtenidos para los **complejos 1-3** y **7-10** indicaban un carácter ligeramente lipófilo (**Tabla 1**), siendo los **complejos 1-3** los que presentaban los valores más altos de este parámetro. Destaca que dicho parámetro en los **complejos 4-6** denotaba su naturaleza hidrófila, impidiendo su correcto paso a través de la membrana plasmática. Una hipótesis que podría explicar dicho carácter hidrófilo es la presencia del ligando TPPTS, que se añade en el proceso de síntesis para favorecer la recuperación del producto en fase acuosa.

Adicionalmente, se estudió si los complejos eran capaces de mantener su estabilidad en un medio fisiológico sin degradarse. En ninguno de ellos se apreciaba una alteración de su espectro UV/visible (**Figura 9 y An1 y 2**), por lo que se podía esperar que en las disoluciones realizadas para los ensayos no se produjera ni la aparición de nuevas especies en disolución, ni una descomposición generando nanopartículas de oro que pudieran alterar los resultados.

Una vez verificadas las características fisicoquímicas de los compuestos, se evaluó su capacidad de inhibir el crecimiento de células cancerosas. Todos los compuestos tenían valores de IC₅₀ del orden de micromolar (**Tablas 2-4**), siendo los más efectivos la familia con la fosfina PPh₃ como ligando (**complejos 1 al 3**), seguidos de los **complejos 8 al 10**, con carbenos N-heterocíclicos. Estos últimos presentan unos valores de IC₅₀ dentro del rango micromolar, similares a complejos carbeno NHC de oro (I) previamente publicados frente a otra línea celular (HT-29) de cáncer de colon⁶³. Además, la citotoxicidad de estos compuestos se correlacionaba con que eran los que presentaban los valores de logP_{7,4} más elevados (**Tabla 1**), ya que su lipofilia les facilitaba la entrada a través de la membrana celular.

En la bibliografía científica se recogen ejemplos de moléculas con la unidad bencenosulfonamida (sin coordinar a un centro metálico). Algunos de ellos han sido

ensayados frente a la línea celular de cáncer de colon Caco-2, pero es de destacar que los valores de IC_{50} observados⁶⁴, son mayores que los obtenidos en los complejos de oro (I) de este estudio. Esto puede indicar que la combinación de un grupo sulfonamida junto con el centro metálico ayuda a incrementar sus propiedades citotóxicas.

Destacan los elevados valores de IC_{50} de los **complejos 4-6**, lo que podría deberse a su carácter hidrófilo, reflejado en los valores negativos de $\log P_{7,4}$ (**Tabla 1**). El hecho de que esta familia posea el ligando TPPTS con este comportamiento hidrófilo podría impedir su paso a través la membrana celular, evitando la actuación como agentes anticancerígenos del oro y el grupo sulfonamida. Otra posible hipótesis en base a anteriores estudios realizados con complejos de oro (I) que portaban este ligando⁶⁵, sugiere que su presencia aumentaba la densidad electrónica del enlace Au-P. Esto dificultaría su rotura, lo cual obstaculizaría la acción del oro para ejercer su actividad biológica.

Los **complejos 1 y 8** se seleccionaron para los siguientes estudios debido a que se trataban de los miembros de cada familia que presentaban mayor citotoxicidad sobre células cancerosas, sin afectar en gran medida a células sanas. Esto se traducía en mayores valores del parámetro índice de selectividad (**Tabla 5**), útil a la hora de seleccionar entre candidatos a futuros fármacos.

Una vez determinado que estos complejos eran capaces de detener la proliferación celular, se quiso comprobar si ello se debía a la inducción de la muerte celular programada o apoptosis. Se obtuvo un resultado positivo, con la mayoría de las células muertas en apoptosis temprana (**Figura 18**), lo que se correlaciona con anteriores estudios en los que se empleaban derivados de sulfonamidas⁶⁶⁻⁶⁷. Destaca que para el mismo tiempo de incubación (48h) el **complejo 1** requería una concentración equivalente a su IC_{50} , mientras que el **complejo 8** requería mayores concentraciones ($2IC_{50}$). Esto se debe quizás a que la actuación de este compuesto era más lenta, como se vio en las curvas dosis-respuesta (**Figura 16**) y su IC_{50} a 48h (**Tabla 6**). Por tanto, requería de mayores tiempos de incubación o incrementar su dosis para provocar el mismo efecto que el otro complejo seleccionado.

Para corroborar la inducción de apoptosis se estudió si los complejos eran capaces de activar la caspasa 3, que desencadena este proceso. Los resultados indicaban un resultado positivo, con un incremento significativo y similar para ambos complejos (**Figura 19**). Este hecho confirmaba la capacidad de los complejos en estudio para inducir la muerte de las células cancerosas.

El proceso de apoptosis provoca la activación de proteínas que forman poros en la membrana mitocondrial, afectando esto a su potencial (ψ_m). Por ello, se determinó si los complejos eran capaces de provocar una despolarización en la membrana y alterar los niveles de potencial. Los resultados de la **figura 20** indicaban que el **complejo 1** era capaz de incrementar significativamente el porcentaje de células en las que se encontraba alterado (39,6%), lo que sugiere que está provocando apoptosis por vía intrínseca. El tratamiento con el **complejo 8** causaba el efecto contrario: un porcentaje de 14,37 % de

células con el potencial alterado respecto al 24,02 % del control. Esto se podría deber a que está provocando la apoptosis por una vía diferente, como la extrínseca. Para confirmarlo, sería necesario determinar la activación de proteínas que inician este proceso, como la caspasa 8.

Otro aspecto para tener en cuenta es que el tratamiento de células cancerosas con fármacos puede inducir un estrés en ellas, lo que provoca la activación de la proteína p53, que es uno de los supresores de tumores más importantes. Normalmente se encuentra mutado en el 50% de los cánceres, mientras que para el resto en la mayoría de los casos está inactivado por distintos mecanismos⁶⁸. La activación de p53 tiene varios efectos: por un lado, induce la expresión de genes que codifican para proteínas implicadas en distintas etapas del proceso apoptótico, como Bax y Bak, receptores de muerte y proteínas ejecutoras (Apaf-1 y caspasa 6)⁶⁹. Por otra parte, también provoca una detención del ciclo celular para reparar el daño ocasionado antes de que se produzca la mitosis. Concretamente p53 se encontraba activado tanto para el **complejo 1** como para el **8**, siendo mayor en este último caso (**Figura 21**).

Los efectos de la activación de p53 sobre el ciclo celular pueden seguir distintas vías: si se produce la activación transcripcional de p21, este se une a Cdk2 y Cdk4 y provoca la detención del ciclo en fase G₁. Por otro lado, si p53 actúa sobre la proteína 14-3-3σ implicada en regulación, se induce la detención del ciclo en fase G₂/M⁶⁹. El **complejo 1** es capaz de retener las células en fase G₁ tras un tratamiento durante 48 h (**Figura 22**) y el **complejo 8** requiere de tiempos más largos de incubación (72h) para detenerlo, pero a diferencia del anterior lo hace en fase G₂ (**Figura 23**). Estos contrastes se podrían deber a que cada compuesto active una vía distinta de p53 para detener el ciclo en cada fase.

Otro aspecto que hay que tener en cuenta cuando se buscan nuevos agentes para el tratamiento del cáncer es la alteración de los niveles de ROS en células tumorales con respecto a las normales. Por tanto, el uso de fármacos que induzcan la generación de estas especies es útil debido a la mayor susceptibilidad de las células cancerosas a ellas, pudiendo provocar su muerte⁷⁰⁻⁷¹. Como refleja la **figura 24**, el **complejo 1** no es capaz de provocar un efecto prooxidante, con las concentraciones y los tiempos de incubación ensayados. Sin embargo, no debemos descartar un incremento en la actividad de otras enzimas redox (como glutatión reductasa) en las células cancerosas, para contrarrestar los altos niveles de ROS y así permitir su supervivencia. Otra hipótesis plausible podría basarse en el hecho de que la proteína p53 también puede influir en la respuesta redox, siendo esta antioxidante o prooxidante según la persistencia del estrés al que esté sometido la célula. Si los niveles de estrés son bajos, actúa promoviendo una respuesta antioxidante y deteniendo el ciclo para reparar los daños causados por el agente en cuestión. Sin embargo, si un estrés de mayor intensidad es mantenido en el tiempo, p53 desencadena una respuesta prooxidante promoviendo la activación de proteínas proapoptóticas como Bax y Bak con el fin de eliminar las células afectadas^{70,72}.

Por otro lado, el **compuesto 8** presenta un efecto prooxidante y este es dependiente tanto del tiempo como de la concentración (**Figura 24B, C, E y F**). Esto se traduce en que,

cuando las concentraciones son IC_{50} (7,22 μ M) y $2IC_{50}$ (14,44 μ M), hay un incremento significativo de los niveles de ROS entre los tiempos de incubación de 1 y 3 h.

Una vez que se había comprobado la capacidad que presentaba el **complejo 8** para elevar los niveles de ROS, se determinó si esto se podía deber a la inhibición de la enzima redox tioredoxina reductasa en lisado celular. Sin embargo, al llevar a cabo el ensayo no se observaban diferencias significativas entre el control y el tratamiento con los compuestos. Esto llevó a estudiar alternativamente la interacción *in vitro* con la isoforma citosólica TrxR1 recombinante. Los resultados recopilados en la **figura 25** indican que el **complejo 1** tiene la capacidad de reducir un 82,5% la actividad enzimática. Por otro lado, el **complejo 8** es capaz de provocar una inhibición de actividad reductasa ligeramente mayor, un 86% aproximadamente. Es sorprendente el hecho de que el **complejo 1** sea capaz de inhibir esta enzima redox, ya que en los ensayos con células no conseguía incrementar los niveles de ROS. Sin embargo, esta se trata de una interacción única entre enzima y complejo metálico en ausencia de cualquier otra interferencia propia del medio intracelular. Debido a ello, la unión *in vitro* se producirá en mayor o menor medida, debido a la afinidad intrínseca que existe entre los metales nobles como es el oro y los residuos de selenocisteína de dicha enzima^{44,46}. Por tanto, los bajos niveles de ROS en el ambiente celular puede que estuviesen asociados a un incremento de actividad de otras enzimas redox, como glutatión reductasa⁷³. Estos resultados nos llevaron a plantearnos las hipótesis citadas anteriormente. Futuros estudios en esta línea serán necesarios para dilucidar este mecanismo.

Finalmente, se evaluó la capacidad de inhibir la actividad de la enzima anhidrasa carbónica AC IX para confirmar si los potenciales fármacos en estudio tenían un efecto multidiana. Para llevar a cabo el ensayo, se eligió la isoforma IX debido a su expresión específica en tumores. Los requerimientos de hipoxia para la expresión de esta isoforma imposibilitaron el análisis de su inhibición en las condiciones de cultivo en que se encontraban las células Caco-2. Por lo tanto, se optó por estudiar la interacción *in vitro* de los complejos con la enzima humana recombinante.

Como resultado se obtuvo que, el **complejo 1** era capaz de reducir significativamente la actividad esterasa de la anhidrasa carbónica un 47,93%, mientras que el **complejo 8** era capaz de disminuirla significativamente un 30,87% (**Figura 26**). La mayor capacidad de inhibición del **complejo 1** se relaciona con el hecho de que es un complejo este que presenta mayor citotoxicidad y selectividad sobre las células cancerosas. Además, el inhibidor de referencia indisulam requería el doble de concentración para reducir la actividad hasta un porcentaje similar al **complejo 8** (71,14%). De estos datos se puede deducir que ambos complejos serían capaces de inhibir la anhidrasa carbónica, como ya se ha confirmado anteriormente para otros compuestos con unidades de bencenosulfonamida⁷⁴⁻⁷⁶. La inhibición de esta enzima impediría la regulación del pH, provocando su muerte debido a la acidez del ambiente en el que se encontrarían. La ausencia de estas condiciones pudo propiciar que se requirieran mayores concentraciones de cada compuesto para lograr una correcta inhibición. Esto se debe a que los inhibidores solo se pueden unir al sitio activo de la anhidrasa IX en condiciones de hipoxia²⁷. Por

tanto, sería interesante comprobar su efecto en las condiciones lo más cercanas posibles a la realidad, como en líneas celulares que expresaran dicha enzima en hipoxia.

6. Conclusiones

1. Los diez complejos de oro (I) ejercen un efecto citotóxico sobre la línea Caco-2/TC7, siendo los ditiocarbamato derivados con PPh₃ (**complejos 1-3**) los más efectivos. Destaca la baja toxicidad de los complejos con la fosfina hidrosoluble TPPTS (**complejos 4-6**), debido a que su carácter hidrófilo podría dificultar su paso a través de la membrana.

2. Los **complejos 1** ([Au(S₂CNHSO₂C₆H₅)(PPh₃)] y **8** ([Au(S₂CNHSO₂-*p*-Me-C₆H₄)(NHC)]); NHC = 1-metil-3-(2-propin-1-il)-imidazol), son capaces de desencadenar el proceso apoptótico en células cancerosas, lo que provoca la activación de la caspasa 3. El **complejo 1** tiene la capacidad de afectar al potencial mitocondrial, lo que sugiere una muerte celular por apoptosis mediante la vía intrínseca. Por otro lado, el **complejo 8** al no ser capaz de alterarlo, es muy probable que actúe a través de la vía extrínseca.

3. Ambos complejos seleccionados (**1 y 8**), generan un estrés celular que provoca la activación de la proteína p53. Esto desencadena una detención del ciclo en fase G₁ para el **complejo 1** y G₂ para el **complejo 8**.

4. El **complejo 1** no es capaz de incrementar los niveles de ROS intracelulares, probablemente debido al incremento de actividad de otras enzimas redox como glutatión reductasa, de forma compensatoria. Sin embargo, el **complejo 8** actúa de forma prooxidante, lo que se relacionaría con la capacidad de inhibir la enzima tiorredoxina reductasa citosólica (TrxR1).

5. Los **complejos 1 y 8** son capaces de interactuar con la anhidrasa carbónica IX, inhibiendo su actividad esterasa.

6. Conclusions

1. The ten gold (I) complexes exert a cytotoxic effect on colon cancer cells Caco-2/TC7, being dithiocarbamates with PPh₃ (**complexes 1-3**) the most effective. It is remarkable the low toxicity of the complexes with TPPTS ligand (**complexes 4-6**), because their hydrophilic nature could difficult its crossing through cellular membrane.

2. **Complexes 1** ([Au(S₂CNHSO₂C₆H₅)(PPh₃)] and **8** ([Au(S₂CNHSO₂-*p*-Me-C₆H₄)(NHC)]); NHC = 1-methyl-3-(2-propyn-1-yl)-imidazole) are capable of exert apoptotic process, which activates caspase 3. **Complex 1** can disrupt mitochondrial potential due to the triggering of intrinsic apoptosis. On the other hand, **complex 8** is not able to disrupt mitochondrial potential, probably because it activates extrinsic apoptosis.

3. Both selected complexes (**1 and 8**), provoke a cellular stress that activates p53 protein. That trigger a cell cycle arrest in G₁ phase (**complex 1**) and G₂ phase (**complex 8**).

4. **Complex 1** does not elevate intracellular ROS levels, probably due to an increasing activity of others redox enzymes like glutathione reductase as a compensatory

mechanism. However, **complex 8** acts in a prooxidant way, which would be related to the inhibition of cytosolic thioredoxin reductase (TrxR1).

5. **Complexes 1 and 8** can interact with carbonic anhydrase IX, inhibiting its esterase activity.

7. Bibliografía

1. Hagggar FA, Boushey RP. Colorectal Cancer Epidemiology: Incidence, Mortality, Survival, and Risk Factors. *Clin Colon Rectal Surg.* **2009**;22(4):191-7.
2. Mármol I, Sánchez-de-Diego C, Pradilla Dieste A, Cerrada E, Rodríguez Yoldi MJ. Colorectal Carcinoma: A General Overview and Future Perspectives in Colorectal Cancer. *Int J Mol Sci.* **2017**;18(1):197.
3. Dekker E, Tanis PJ, Vleugels JLA, Kasi PM, Wallace MB. Colorectal cancer. *The Lancet.* **2019**;394(10207):1467-80.
4. Brenner H, Kloor M, Pox CP. Colorectal cancer. *The Lancet.* **2014**;383(9927):1490-502.
5. Thanikachalam K, Khan G. Colorectal Cancer and Nutrition. *Nutrients.* **2019**; 11(1):164.
6. Lichtenstern CR, Ngu RK, Shalapour S, Karin M. Immunotherapy, Inflammation and Colorectal Cancer. *Cells.* **2020**; 9(3):618.
7. Binefa G, Rodríguez-Moranta F, Teule À, Medina-Hayas M. Colorectal cancer: From prevention to personalized medicine. *World J Gastroenterol.* **2014**; 20(22):6786-808.
8. Rosenberg B. Some biological effects of platinum compounds: new agents for the control of tumours. *Platinum Metals Rev,* **1971**, 15 (2), 42-51.
9. Ghosh S. Cisplatin: The first metal based anticancer drug. *Bioorg Chem.* **2019**; 88:102925.
10. Dasari S, Tchounwou PB. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *Eur J Pharmacol.* **2014**; 740:364-78.
11. 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.
12. Dominelli B, Correia JDG, Kühn FE. Medicinal Applications of Gold(I/III)-Based Complexes Bearing N-Heterocyclic Carbene and Phosphine Ligands. *J Organomet Chem.* **2018**; 866:153-64.
13. Casini A, Sun RW-Y, Ott I. Medicinal Chemistry of Gold Anticancer Metallodrugs. *Met Ions Life Sci.* **2018**,18:199-217
14. Yeo CI, Ooi KK, Tiekink ERT. Gold-Based Medicine: A Paradigm Shift in Anti-Cancer Therapy? *Molecules.* **2018**;23(6):1410.
15. Porchia M, Pellei M, Marinelli M, Tisato F, Del Bello F, Santini C. New insights in Au-NHCs complexes as anticancer agents. *Eur J Med Chem.* **2018**; 146:709-46.
16. Mármol I, Quero J, Rodríguez-Yoldi MJ, Cerrada E. Gold as a Possible Alternative to Platinum-Based Chemotherapy for Colon Cancer Treatment. *Cancers.* **2019**;11(6):780.
17. Oehninger L, Rubbiani R, Ott I. N-Heterocyclic carbene metal complexes in medicinal chemistry. *Dalton Trans.* **2013**;42(10):3269-84.
18. Sadler, P. J.; VanEldik. *Medicinal Chemistry R.*, Eds. **2020**;(75):121-148
19. A Patil S, P Hoagland A, A Patil S, Bugarin A. N-heterocyclic carbene-metal complexes as bio-organometallic antimicrobial and anticancer drugs, an update (2015–2020). *Future Med Chem.* **2020**;12(24):2239-75.

20. Kim JH, Reeder E, Parkin S, Awuah SG. Gold(I/III)-Phosphine Complexes as Potent Antiproliferative Agents. *Sci Rep.* **2019**;9(1):12335.
21. Mirzadeh N, Reddy TS, Bhargava SK. Advances in diphosphine ligand-containing gold complexes as anticancer agents. *Coord Chem Rev.* **2019**; 388:343-59.
22. Drews J. Drug Discovery: A Historical Perspective. *Science.* **2000**; 287(5460):1960-4.
23. Supuran CT, Casini A, Mastrolorenzo A, Scozzafava A. COX-2 selective inhibitors, carbonic anhydrase inhibition and anticancer properties of sulfonamides belonging to this class of pharmacological agents. *Mini Rev Med Chem.* **2004**; 4(6):625-32.
24. Abbate F, Casini A, Owa T, Scozzafava A, Supuran CT. Carbonic anhydrase inhibitors: E7070, a sulfonamide anticancer agent, potently inhibits cytosolic isozymes I and II, and transmembrane, tumor-associated isozyme IX. *Bioorg Med Chem Lett.* **2004**;14(1):217-23.
25. Hande KR, Hagey A, Berlin J, Cai Y, Meek K, Kobayashi H, et al. The Pharmacokinetics and Safety of ABT-751, a Novel, Orally Bioavailable Sulfonamide Antimitotic Agent: Results of a Phase 1 Study. *Clin Cancer Res.* **2006**;12(9):2834-40.
26. Apaydın S, Török M. Sulfonamide derivatives as multi-target agents for complex diseases. *Bioorg Med Chem Lett.* **2019**; 29(16):2042-50.
27. Carta F, Supuran CT, Scozzafava A. Sulfonamides and their isosters as carbonic anhydrase inhibitors. *Future Med Chem.* **2014**; 6(10):1149-65.
28. Krasavin M, Kalinin S, Sharonova T, Supuran CT. Inhibitory activity against carbonic anhydrase IX and XII as a candidate selection criterion in the development of new anticancer agents. *J Enzyme Inhib Med Chem.* **2020**; 35(1):1555-61.
29. Salmon AJ, Williams ML, Innocenti A, Vullo D, Supuran CT, Poulsen S-A. Inhibition of carbonic anhydrase isozymes I, II and IX with benzenesulfonamides containing an organometallic moiety. *Bioorg Med Chem Lett.* **2007**; 17(18):5032-5.
30. Loughrey BT, Williams ML, Healy PC, Innocenti A, Vullo D, Supuran CT, et al. Novel organometallic cationic ruthenium (II) pentamethylcyclopentadienyl benzenesulfonamide complexes targeted to inhibit carbonic anhydrase. *J Biol Inorg Chem.* **2009**; 14(6):935-45.
31. Salmon AJ, Williams ML, Wu QK, Morizzi J, Gregg D, Charman SA, et al. Metallocene-Based Inhibitors of Cancer-Associated Carbonic Anhydrase Enzymes IX and XII. *J Med Chem.* **2012**; 55(11):5506-17.
32. Kenny RG, Marmion CJ. Toward Multi-Targeted Platinum and Ruthenium Drugs—A New Paradigm in Cancer Drug Treatment Regimens? *Chem Rev.* **2019**; 119(2):1058-137.
33. Kemp SA, Prior TJ, Savoie H, Boyle RW, Murray BS. The Application of Reversible Intramolecular Sulfonamide Ligation to Modulate Reactivity in Organometallic Ruthenium (II) Diamine Complexes. *Molecules.* **2020**;25(2):244.
34. Sava G, Bergamo A, Dyson PJ. Metal-based antitumour drugs in the post-genomic era: what comes next? *Dalton Trans.* **2011**;40(36):9069-75.
35. Rami M, Cecchi A, Montero J-L, Innocenti A, Vullo D, Scozzafava A, et al. Carbonic Anhydrase Inhibitors: Design of Membrane-Impermeant Copper (II) Complexes of

- DTPA-, DOTA-, and TETA-Tailed Sulfonamides Targeting the Tumor-Associated Transmembrane Isoform IX. *ChemMedChem*. **2008**; 3(11):1780-8.
36. Ozdemir UO, Ozbek N, Genc ZK, İlbiz F, Gündüzalp AB. New bioactive silver(I) complexes: Synthesis, characterization, anticancer, antibacterial and anticarbonic anhydrase II activities. *J Mol Struct*. **2017**; 1138:55-63.
 37. Huseynova M, Medjidov A, Taslimi P, Aliyeva M. Synthesis, characterization, crystal structure of the coordination polymer Zn (II) with thiosemicarbazone of glyoxalic acid and their inhibitory properties against some metabolic enzymes. *Bioorg Chem*. **2019**; 83:55-62.
 38. Dilworth JR, Pascu SI, Waghorn PA, Vullo D, Bayly SR, Christlieb M, et al. Synthesis of sulfonamide conjugates of Cu (II), Ga (III), In (III), Re(V) and Zn (II) complexes: carbonic anhydrase inhibition studies and cellular imaging investigations. *Dalton Trans*. **2015**;44(11):4859-73.
 39. Puccetti L, Fasolis G, Vullo D, Chohan ZH, Scozzafava A, Supuran CT. Carbonic anhydrase inhibitors. Inhibition of cytosolic/tumor-associated carbonic anhydrase isozymes I, II, IX, and XII with Schiff's bases incorporating chromone and aromatic sulfonamide moieties, and their zinc complexes. *Bioorg Med Chem Lett*. **2005**;15(12):3096-101.
 40. Bian M, Fan R, Zhao S, Liu W. Targeting the Thioredoxin System as a Strategy for Cancer Therapy. *J Med Chem*. **2019**;62(16):7309-21.
 41. Ghareeb H, Metanis N. The Thioredoxin System: A Promising Target for Cancer Drug Development. *Eur J Chem*. **2020**;26(45):10175-84.
 42. Berners-Price SJ, Filipovska A. Gold compounds as therapeutic agents for human diseases. *Metallomics*. **2011**;3(9):863-73.
 43. Mohammadi F, Soltani A, Ghahremanloo A, Javid H, Hashemy SI. The thioredoxin system and cancer therapy: a review. *Cancer Chemother Pharmacol*. **2019**;84(5):925-35.
 44. Bindoli A, Rigobello MP, 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):1692-707.
 45. 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.
 46. Zhang J, Zhang B, Li X, Han X, Liu R, Fang J. Small molecule inhibitors of mammalian thioredoxin reductase as potential anticancer agents: An update. *Med Res Rev*. **2019**;39(1):5-39.
 47. Omata Y, Folan M, Shaw M, Messer RL, Lockwood PE, Hobbs D, et al. Sublethal concentrations of diverse gold compounds inhibit mammalian cytosolic thioredoxin reductase (TrxR1). *Toxicol In Vitro*. **2006**;20(6):882-90.
 48. Singh S, Lomelino CL, Mboge MY, Frost SC, McKenna R. Cancer Drug Development of Carbonic Anhydrase Inhibitors beyond the Active Site. *Molecules*. **2018**;23(5):1045
 49. Kumar S, Rulhania S, Jaswal S, Monga V. Recent advances in the medicinal chemistry of carbonic anhydrase inhibitors. *Eur J Med Chem*. **2021**; 209:112923.

50. Alterio V, Di Fiore A, D'Ambrosio K, Supuran CT, De Simone G. Multiple Binding Modes of Inhibitors to Carbonic Anhydrases: How to Design Specific Drugs Targeting 15 Different Isoforms? *Chem Rev.* **2012**;112(8):4421-68.
51. Mboge MY, Mahon BP, McKenna R, Frost SC. Carbonic Anhydrases: Role in pH Control and Cancer. *Metabolites.* **2018**;8(1):19.
52. Pastorek J, Pastorekova S. Hypoxia-induced carbonic anhydrase IX as a target for cancer therapy: From biology to clinical use. *Semin Cancer Biol.* **2015**; 31:52-64.
53. Pastorekova S, Gillies RJ. The role of carbonic anhydrase IX in cancer development: links to hypoxia, acidosis, and beyond. *Cancer Metastasis Rev.* **2019**;38(1):65-77.
54. Green DR, Llambi F. Cell Death Signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* **2015**;7(12).
55. Elmore S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol.* **2007**;35(4):495-516.
56. D'Arcy MS. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biol Int.* **2019**;43(6):582-92.
57. Nirmala JG, Lopus M. Cell death mechanisms in eukaryotes. *Cell Biol Toxicol.* **2020**;36(2):145-64.
58. Sambuy Y, De Angelis I, Ranaldi G, Scarino ML, Stammati 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.
59. Meunier V, Bourrié M, Berger Y, Fabre G. The human intestinal epithelial cell line Caco-2; pharmacological and pharmacokinetic applications. *Cell Biol Toxicol.* **1995**;11(3-4):187-94.
60. Kerns EH, Di L. Chapter 13 - Solution Stability. Drug-like Properties: Concepts, Structure Design and Methods. *San Diego: Academic Press*; **2008**. p. 178-86.
61. Kerns EH, Di L. Chapter 5 - Lipophilicity. Drug-like Properties: Concepts, Structure Design and Methods. *San Diego: Academic Press*; **2008**. p. 43-7.
62. Rutkowska E, Pajak K, Józwiak K. Lipophilicity--methods of determination and its role in medicinal chemistry. *Acta Pol Pharm.* **2013**;70(1):3-18.
63. Rubbiani R, Can S, Kitanovic I, Alborzina H, Stefanopoulou M, Kokoschka M, et al. Comparative in Vitro Evaluation of N-Heterocyclic Carbene Gold(I) Complexes of the Benzimidazolylidene Type. *J Med Chem.* **2011**;54(24):8646-57.
64. Eldehna WM, Abo-Ashour MF, Nocentini A, Gratteri P, Eissa IH, Fares M, et al. Novel 4/3-((4-oxo-5-(2-oxoindolin-3-ylidene)thiazolidin-2-ylidene)amino) benzenesulfonamides: Synthesis, carbonic anhydrase inhibitory activity, anticancer activity and molecular modelling studies. *Eur J Med Chem.* **2017**; 139:250-62.
65. Gavara R, Aguiló E, Schur J, Llorca J, Ott I, Rodríguez L. Study of the effect of the chromophore and nuclearity on the aggregation and potential biological activity of gold(I) alkynyl complexes. *Inorganica Chim Acta.* **2016**; 446:189-97.
66. Koyuncu I, Gonel A, Durgun M, Kocyigit A, Yuksekdog O, Supuran CT. Assessment of the antiproliferative and apoptotic roles of sulfonamide carbonic anhydrase IX inhibitors in HeLa cancer cell line. *J Enzyme Inhib Med Chem.* **2018**;34(1):75-86.
67. Koyuncu I, Gonel A, Kocyigit A, Temiz E, Durgun M, Supuran CT. Selective inhibition of carbonic anhydrase-IX by sulphonamide derivatives induces pH and

- reactive oxygen species-mediated apoptosis in cervical cancer HeLa cells. *J Enzyme Inhib Med Chem.* **2018**;33(1):1137-49.
68. Mirgayazova R, Khadiullina R, Mingaleeva R, Chasov V, Gomzikova M, Garanina E, et al. Novel Isatin-based activator of p53 transcriptional functions in tumor cells. *Mol Biol Res Commun.* **2019**;8(3):119-28.
69. Chen J. The Cell-Cycle Arrest and Apoptotic Functions of p53 in Tumor Initiation and Progression. *Cold Spring Harb Perspect Med.* **2016**;6(3).
70. Gorrini C, Harris IS, Mak TW. Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy. *Nat Rev Drug Discov.* **2013**;12(12):931-47.
71. Yang H, Villani RM, Wang H, Simpson MJ, Roberts MS, Tang M, et al. The role of cellular reactive oxygen species in cancer chemotherapy. *J Exp Clin Cancer Res.* **2018**;37(1):266.
72. Vousden KH, Ryan KM. p53 and metabolism. *Nat Rev Cancer.* **2009**;9(10):691-700.
73. Couto N, Wood J, Barber J. The role of glutathione reductase and related enzymes on cellular redox homeostasis network. *Free Radic Biol Med.* **2016**; 95:27-42.
74. Liu L, Wang W, Huang J, Zhao Z, Li H, Xu Y. Novel benzoyl thioureido benzene sulfonamides as highly potent and selective inhibitors of carbonic anhydrase IX: optimization and bioactive studies. *Medchemcomm.* **2018**;9(12):2100-5.
75. Zakšauskas A, Čapkauskaitė E, Jezepčikas L, Linkuvienė V, Paketurytė V, Smirnov A, et al. Halogenated and di-substituted benzenesulfonamides as selective inhibitors of carbonic anhydrase isoforms. *Eur J Med Chem.* **2020**; 185:111825.
76. Vullo D, Franchi M, Gallori E, Pastorek J, Scozzafava A, Pastorekova S, et al. Carbonic anhydrase inhibitors: inhibition of the tumor-associated isozyme IX with aromatic and heterocyclic sulfonamides. *Bioorg Med Chem Lett.* **2003**;13(6):1005-9.