



Universidad
Zaragoza

Trabajo Fin de Grado

Biotecnología

Estudio de las propiedades anticancerígenas
de nuevos compuestos de platino frente al
cáncer de colon

Study of the anticancer properties of new
platinum compounds against colon cancer

Autora

Laura Gómez López

Directores

Laura Grasa López

Andrea Bellés Miralles

Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza

Departamento de Farmacología, Fisiología y
Medicina Legal y Forense

Curso 2022/2023

ÍNDICE

1.	RESUMEN	1
2.	ABSTRACT	1
3.	ANTECEDENTES	2
3.1	EL APARATO DIGESTIVO Y EL COLON	2
3.1.1	FUNCIONES DEL APARATO DIGESTIVO.....	2
3.1.2	ANATOMÍA E HISTOLOGÍA DEL COLON	2
3.2	EPIDEMIOLOGÍA, ETIOLOGÍA Y DESARROLLO DEL CÁNCER DE COLON	3
3.2.1	EPIDEMIOLOGIA DEL CÁNCER DE COLON	3
3.2.2	ETIOLOGÍA DEL CÁNCER DE COLON	3
3.2.3	DESARROLLO DEL PROCESO TUMORAL.....	4
3.3	TRATAMIENTO.....	4
3.4	DESARROLLO DE NUEVOS FÁRMACOS BASADOS EN RUTENIO	5
4.	OBJETIVOS	5
5.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	6
5.1	MODELO EXPERIMENTAL: LÍNEA CELULAR CACO-2/TC7	6
5.1.1	CULTIVO DE LA LÍNEA CELULAR CACO-2/TC7.....	6
5.1.2	EQUIPOS	6
5.1.3	MEDIO DE CULTIVO	7
5.1.4	MANTENIMIENTO Y SIEMBRA DE LA LINEA CELULAR CACO-2.....	7
5.1.5	TRATAMIENTO DE LAS CELULAS.....	8
5.2	COMPUESTOS DERIVADOS DE RUTENIO Y PLATINO TESTADOS	8
5.3	ESTUDIO DE LA CITOTOXICIDAD DE LOS COMPUESTOS MEDIANTE MTT.....	8
5.3.1	CÁLCULO DE IC ₅₀	10
5.4	ESTUDIO DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE GENES RELACIONADOS CON EL CÁNCER	10
5.4.1	EXTRACCIÓN DE RNA.....	10
5.4.2	CONCENTRACIÓN Y CALIDAD DEL RNA	11
5.4.3	SÍNTESIS DE cDNA.....	11
5.4.4	PCR CUANTITATIVA A TIEMPO REAL	12
5.5	ANÁLISIS DE DATOS Y HERRAMIENTAS INFORMÁTICAS	13

6.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	14
6.1	ESTUDIOS DE VIABILIDAD CELULAR Y DETERMINACIÓN DE IC ₅₀	14
6.1.1	COMPUESTOS DERIVADOS DEL RUTENIO	14
6.1.2	COMPUESTOS DERIVADOS DEL PLATINO	18
6.1.3	COMPARACIÓN ENTRE LOS COMPUESTOS DE PLATINO Y LOS DE RUTENIO	20
6.2	ESTUDIO DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE CIERTOS GENES	20
6.2.1	GENES IMPLICADOS EN LA MUERTE CELULAR PROGRAMADA: APOPTOSIS.....	20
7.	CONCLUSIONES	23
9.	BIBLIOGRAFÍA	24
10.	ANEXOS.....	26

1. RESUMEN

El cáncer colorrectal, el tipo de cáncer más frecuentemente diagnosticado en España, carece actualmente de un fármaco eficaz. El tratamiento actual se basa en el uso del compuesto metálico oxaliplatino, el cual genera gran cantidad de efectos secundarios. Por ello, se está llevando a cabo una búsqueda de fármacos efectivos que se basen en complejos metálicos como el platino y el rutenio.

En este estudio, se ha evaluado la citotoxicidad de diferentes compuestos derivados de rutenio y de platino, tanto en células de tejido intestinal sanas como en células del cáncer colorrectal, con el objetivo de encontrar un posible agente antitumoral para el cáncer de colon. Además, se han identificado posibles dianas génicas sobre las cuales actúan los complejos de platino que tienen la capacidad de reducir la viabilidad celular de células tumorales.

Para lograr los objetivos planteados, se emplearon células de la línea celular Caco-2/TC7, y en ellas se llevaron a cabo ensayos de viabilidad celular utilizando la técnica del MTT y, además, se evaluaron los niveles de expresión génica mediante PCR (reacción en cadena de la polimerasa) cuantitativa.

Los resultados obtenidos demostraron que los compuestos de rutenio C112, C87 y C163 presentan potencial como posibles agentes antitumorales, al igual que los compuestos de platino C227, C239 y C242. Estos últimos compuestos podrían ejercer su actividad antitumoral al incrementar la expresión de la caspasa-9 y reducir la expresión de la caspasa-3. Adicionalmente, el compuesto C242 también induce una sobreexpresión de los genes Bcl-2, caspasa-9 y PARP-1.

2. ABSTRACT

Colorectal cancer, the most frequently diagnosed cancer type in Spain, currently lacks an effective drug. The present treatment is based on the use of the metallic compound oxaliplatin, which generates a significant number of side effects. Therefore, a search is underway for effective drugs based on metallic complexes such as platinum and ruthenium.

In this study, the cytotoxicity of different ruthenium and platinum compounds has been evaluated in healthy intestinal tissue cells and colorectal cancer cells, with the aim of finding a potential antitumor agent for colon cancer. Additionally, potential gene targets were identified, on which platinum complexes act to reduce the viability of tumor cells.

To achieve the proposed objectives, the Caco-2/TC7 cell line was used, and cell viability assays were carried out using the MTT technique. Furthermore, gene expression levels were evaluated through quantitative PCR (polymerase chain reaction).

The obtained results indicate that the ruthenium compounds C112, C87, and C163 show potential as possible antitumor agents, like the platinum compounds C227, C239 and C242. These last compounds could exert their antitumor activity by increasing the expression of caspase-9 and reducing the expression of caspase-3. Moreover, compound C242 also induces an overexpression of the genes Bcl-2, caspase-9, and PARP-1.

3. ANTECEDENTES

3.1 EL APARATO DIGESTIVO Y EL COLON

3.1.1 FUNCIONES DEL APARATO DIGESTIVO

El aparato digestivo juega un papel crucial en el mantenimiento de la homeostasis del cuerpo, al ser el encargado de transportar agua, electrolitos y nutrientes desde el medio externo al medio interno. El proceso de digestión consta de 5 etapas: ingestión, digestión, absorción, motilidad y excreción (1).

Los alimentos entran en el sistema digestivo a través de la cavidad oral, que incluye la boca y la faringe, y pasan al estómago a través del esófago. Dentro del estómago, se almacenan y van pasando gradualmente al intestino delgado. En esta parte del sistema digestivo ocurren la mayor parte de los procesos de digestión y la absorción de los nutrientes. El páncreas y el hígado también contribuyen a este proceso al secretar enzimas pancreáticas y bilis, respectivamente.

Los residuos no absorbidos del alimento pasan al intestino grueso, donde se produce la reabsorción del agua y de los electrolitos, lo que da lugar a la formación de las heces. Finalmente, las heces se excretan a través del ano mediante la defecación.

3.1.2 ANATOMÍA E HISTOLOGÍA DEL COLON

La investigación realizada se ha enfocado en el tratamiento del cáncer de colon, razón por la cual se profundizará específicamente en esta área del sistema digestivo.

El intestino grueso está formado por 4 partes principales, el ciego, el colon, el recto y el canal anal. Por tanto, el colon es una parte del intestino grueso y su función principal es la absorción de agua.

La pared del colon se compone de cuatro capas: la mucosa, la submucosa, una capa de músculo liso y la serosa (Fig. 1).

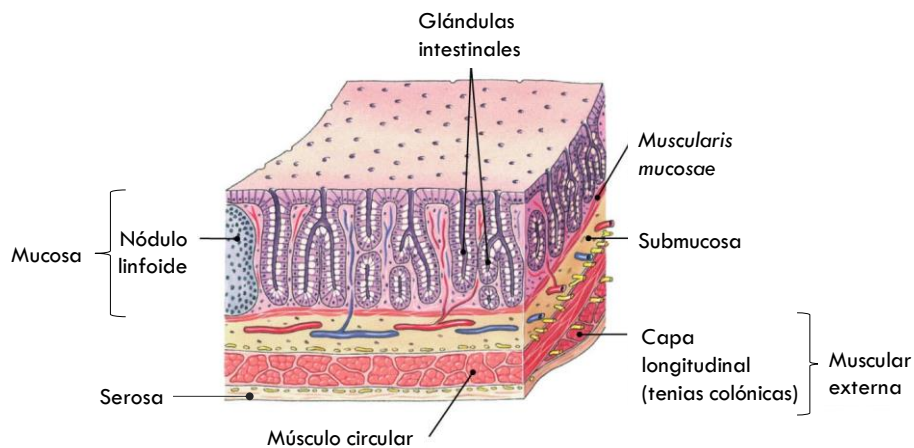


Figura 1. Esquema del corte transversal de la pared del colon. Las capas que componen la pared del colon de la parte interna a la externa son: la mucosa, la submucosa, el músculo liso y la serosa (1).

La capa de mucosa del colon es la más interna y gruesa. Está compuesta por tejido epitelial columnar simple y contiene células caliciformes que producen moco, células endocrinas que liberan hormonas y células madre basales, así como células absortivas, denominadas colonocitos, con un borde apical en forma de cepillo. Bajo la capa epitelial se encuentra la lámina propia formada por tejido conectivo y pequeños nódulos linfáticos de tejido linfoide. La *muscularis mucosae* es una capa delgada de músculo liso que separa la mucosa de la submucosa. Cabe destacar que es en la mucosa, y

específicamente en las células epiteliales, donde se origina el proceso canceroso, objeto de estudio de esta investigación.

La submucosa está compuesta por tejido conectivo y es rica en vasos sanguíneos y linfáticos de gran tamaño. Además, contiene el plexo submucoso o de Meissner, una de las dos redes nerviosas principales del Sistema Nervioso Entérico, implicado en la coordinación de la función digestiva.

Debajo de la submucosa se encuentra la capa muscular, compuesta por dos capas de células musculares lisas, la capa longitudinal que es la más externa y la circular que es la interna. Estas células musculares permiten la función de motilidad en el intestino grueso.

Finalmente, la capa serosa es la capa más externa y está compuesta por dos capas finas, una de tejido epitelial escamoso y la otra de tejido conjuntivo. Su función principal es lubricar la superficie del intestino grueso y protegerlo de la fricción con órganos, músculos y huesos circundantes (1).

3.2 EPIDEMIOLOGÍA, ETIOLOGÍA Y DESARROLLO DEL CÁNCER DE COLON

3.2.1 EPIDEMIOLOGÍA DEL CÁNCER DE COLON

El cáncer colorrectal es una de las neoplasias más frecuentes a nivel mundial. Ocupa el tercer lugar en la lista de los cánceres más comunes en hombres y el segundo lugar en mujeres (2). En España, es el tipo de cáncer más diagnosticado y el segundo que más fallecimientos provoca (Fig. 2).

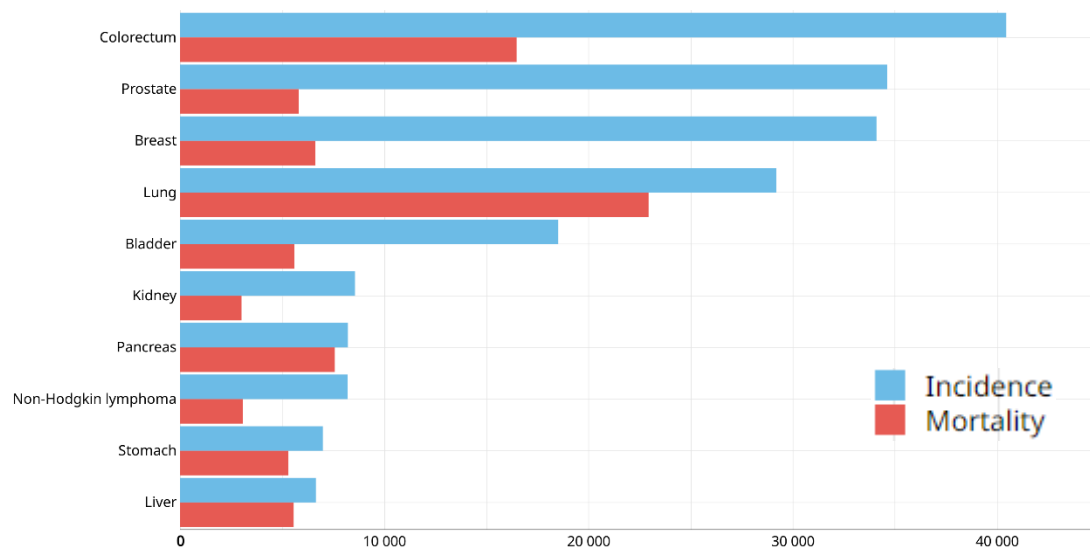


Figura 2. Incidencia (azul) y mortalidad (rojo) del cáncer en España en el año 2020 incluyendo ambos sexos y todas las edades (3).

3.2.2 ETIOLOGÍA DEL CÁNCER DE COLON

El colon humano reemplaza alrededor de 10^{10} células diariamente mediante la regulación precisa de la proliferación, diferenciación y muerte de las células epiteliales (4). Este proceso continuo de regeneración celular hace que el colon sea vulnerable a mutaciones malignas que pueden causar tumores (5).

El inicio del proceso tumoral se produce con el cambio en una sola célula. Este cambio puede ser causado por factores externos, como sustancias carcinógenas, o por factores genéticos heredados. Aunque, la mayor parte de los cánceres diagnosticados están asociados con factores nutricionales y/o ambientales, el cáncer colorrectal (CCR) está vinculado con ciertas mutaciones genéticas hereditarias. Solo un pequeño porcentaje de los casos de CCR se debe exclusivamente a estas mutaciones, ya que

el estilo de vida también influye en el desarrollo del CCR (6). Algunos de los factores que aumentan el riesgo de padecer este tipo de cáncer son el consumo de tabaco y alcohol, el bajo consumo de vegetales, la obesidad y el sedentarismo. Por otro lado, los fármacos antiinflamatorios no esteroideos y la ingesta elevada de calcio se asocian con un riesgo reducido (7).

3.2.3 DESARROLLO DEL PROCESO TUMORAL

En la mayoría de los tumores colorrectales esporádicos, la progresión del adenocarcinoma sigue una serie de eventos controlados. Estos eventos empiezan con la mutación del gen *APC* (adenomatous polyposis coli), la cual es detectable en el 63% de los adenocarcinomas (8). El gen *APC* es un supresor tumoral que provoca la degradación por fosforilación de la β -catenina mediante la formación de un complejo citoplasmático constituido por dos proteínas adaptadoras, entre las que se encuentra la proteína *APC*, y dos quinasas implicadas en la fosforilación. Sin embargo, si el gen *APC* está mutado, no se puede formar el complejo, por lo que la β -catenina por defecto estará activa. Como resultado de esto, se produce una mayor proliferación celular y una disminución en la muerte celular programada. De esta forma, las células mutadas comienzan a multiplicarse de manera exponencial, provocando la transformación de una célula normal del epitelio a un pólipo. Con el tiempo, los pólipos desarrollarán características malignas e invadirán el tejido, momento en el cual se los considerarán adenocarcinomas o tumores (9).

Además del gen *APC*, la proteína *P53* también desempeña un papel crucial, siendo responsable del 40-50% de los tumores esporádicos. La proteína *P53* es un factor de transcripción implicado en el control del ciclo celular, en la integridad del DNA y en la supervivencia de las células expuestas a agentes dañinos para el DNA (10). Cuando el DNA se ve afectado, la proteína *P53* se activa y provoca la parada del ciclo celular o, alternativamente, induce apoptosis en la célula para mantener la integridad del DNA. Por lo tanto, el buen funcionamiento de *P53* disminuye la inestabilidad genética de las células (11).

3.3 TRATAMIENTO

El cáncer de colon carece de un fármaco efectivo, por lo que se recurre a utilizar combinaciones de varios quimioterápicos agresivos. Además, estos tratamientos se centran en inhibir la proliferación de las células tumorales existentes en lugar de prevenir la formación del tumor.

Una de las combinaciones más utilizadas para tratar el cáncer de colon en los últimos años es el FOLFOX, compuesto por 5-Fluorouracilo/Leucovorina y oxaliplatino. De hecho, el oxaliplatino es el único compuesto metálico que se sigue utilizando (12).

El hecho de que actualmente sólo se utilice este derivado de platino (Pt) se debe a sus graves efectos secundarios, y no a problemas de efectividad, aunque algunas líneas tumorales están desarrollando resistencia a este tipo de complejos.

No obstante, los compuestos de platino son un gran ejemplo de cómo una molécula pequeña puede interferir de manera efectiva en la replicación celular. Estos compuestos son considerados profármacos, debido a que se administran en forma inactiva y se activan dentro del organismo. En el caso del cisplatino, forma dos enlaces estables con el DNA. Esto provoca la alteración de la estructura tridimensional del DNA, errores en la transcripción y la imposibilidad de que las cadenas se separen para la replicación (13), como resultado, se desencadena la apoptosis (*Fig. 3*).

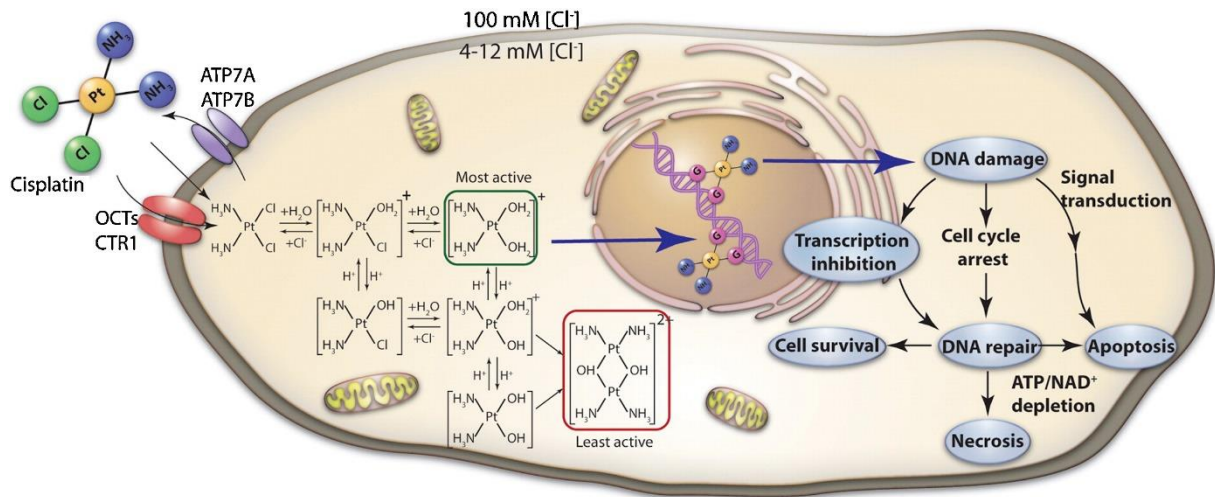


Figura 3. Mecanismo de acción del cisplatino. El cisplatino se internaliza en las células cancerosas por difusión pasiva y a través del transportador de cobre 1 (CTR1). Debido a la disminución de la concentración de cloruro en el interior de la célula (4-12 mM) respecto de la cantidad que hay en el exterior de las células (100 mM), el cisplatino evoluciona al complejo diaqua mayoritariamente, lo cual posibilita la interacción con el DNA nuclear, bloqueando la replicación e induciendo la apoptosis (13).

La eficacia de los complejos de Pt ha motivado a los científicos a buscar fármacos más selectivos con el fin de reducir los efectos secundarios asociados a la quimioterapia y superar la resistencia que algunos tipos de tumores están desarrollando a los derivados de Pt. De hecho, existe un gran interés en el desarrollo de nuevos complejos metálicos que puedan servir como fármacos antineoplásicos. En este sentido, otro de los metales más prometedores para el desarrollo de fármacos antitumorales es el rutenio (14). Por ello, nuestro trabajo se ha centrado en testar las propiedades anticancerígenas de compuestos con centros metálicos de platino o rutenio.

3.4 DESARROLLO DE NUEVOS FÁRMACOS BASADOS EN RUTENIO

El rutenio (Ru) es un metal de transición del grupo 8 de la tabla periódica, al igual que el platino. En general, el uso de compuestos de rutenio en comparación con el cisplatino se caracteriza por una menor toxicidad, un menor número de efectos secundarios y una mayor eficacia (15). La razón más importante es su capacidad para formar una amplia variedad de complejos de coordinación y su mayor propensión para sufrir reacciones redox. Además, el entorno hipóxico de los tumores favorece la reducción del rutenio (III) inerte a rutenio (II) activo, disminuyendo así los efectos secundarios en células normales (16).

4. OBJETIVOS

En el presente Trabajo de Fin de Grado se han planteado dos objetivos:

1. Evaluar la actividad citotóxica de nuevos compuestos de platino y rutenio en células tumorales utilizando la línea celular de carcinoma de colon humano (Caco-2/TC7). Este objetivo permitirá determinar la citotoxicidad de los compuestos de platino y rutenio para células normales y cancerígenas, calcular las IC₅₀ y comparar la efectividad de los diferentes compuestos testados.
2. Determinar las dianas génicas sobre las que actúan los compuestos de platino que presenten la mejor efectividad frente a las células cancerosas.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

Los experimentos biológicos descritos en este trabajo se realizaron en la Unidad de Fisiología de la Facultad de Veterinaria (Universidad de Zaragoza).

5.1 MODELO EXPERIMENTAL: LÍNEA CELULAR CACO-2/TC7

Los experimentos se llevaron a cabo en la línea celular inmortalizada de adenocarcinoma de colon humano (Caco-2/TC7), establecida por Fogh et al en 1974 (17). La característica principal de esta línea celular es su capacidad de experimentar diferenciación espontánea a enterocito en condiciones de cultivo normales cuando las células alcanzan la confluencia, es por ello por lo que se utilizan como modelo de epitelio intestinal (18).

Inicialmente, las células tienen una morfología indiferenciada, la cual se mantiene durante toda la fase de crecimiento exponencial, que dura 5 días. Por ello, en esta fase las células se pueden considerar cancerígenas. Sin embargo, una vez que las células alcanzan la confluencia, se diferencian y mantienen una morfología constante durante su fase estacionaria. Después de 15 días o más de cultivo, estas células adherentes forman una monocapa de células polarizadas, ya que desarrollan las microvellosidades en el borde apical y los transportadores en la membrana basal. Por tanto, adquieren así la morfología que tienen las células intestinales sanas en condiciones fisiológicas.

Por su naturaleza tumoral, la línea celular Caco-2 es un buen modelo para estudios de toxicidad en células cancerígenas de colon. Además, es adecuada para estudios de toxicidad en tejido intestinal sano, ya que presenta características de tejido intestinal cuando alcanza la diferenciación celular.

Para la realización de los experimentos de este trabajo se utilizó el clon TC7, derivado de la línea parental Caco-2. El clon TC7 debido a su elevado grado de diferenciación morfológica y funcional de tipo enterocitario es una herramienta ideal para realizar estudios de transporte a través de la barrera intestinal y para evaluar el papel del intestino en la biotransformación de los fármacos (19,20).

5.1.1 CULTIVO DE LA LÍNEA CELULAR CACO-2/TC7

Para garantizar condiciones estériles durante el cultivo celular, se realizó el experimento en una sala limpia equipada con una campana de flujo laminar de clase II (Telstar AV-100). Además, para minimizar el riesgo de contaminación del cultivo celular, se siguieron algunas pautas generales:

- La esterilización de la campana con radiación UV durante 30 minutos antes de cada uso, y la activación del flujo de aire para que fuera estable al comienzo de la manipulación.
- La desinfección del área de trabajo con etanol al 70% antes y después del uso.
- Se mantuvieron los materiales y reactivos en condiciones estériles y se utilizó material de plástico desechable siempre que fue posible.

Las células se mantuvieron en cultivo en una estufa de CO₂ (PHCBI MCO-170AICUV-PE), a temperatura constante (37°C) y en una atmósfera humidificada con un 95% de aire y un 5% de CO₂.

5.1.2 EQUIPOS

Además de la campana y de la estufa de incubación, se utilizaron otros equipos para realizar los experimentos celulares:

- Un baño termostático (Digiterm 100 Selecta): los medios de cultivo deben ser atemperados a 37°C para evitar un choque térmico a las células cultivadas.
- Pipeteador electrónico para usar con pipetas de plástico desechables.

- Microscopio invertido (Olympus CK2) para examinar el tapiz celular de las cajas de cultivo, así como para realizar el recuento de células en suspensión antes de una nueva siembra.
- Cámara de Neubauer de vidrio para realizar el recuento de células en el medio.
- Centrifugadora con accesorio para Eppendorf y tubos cónicos (Eppendorf 5810R) para poder obtener el precipitado celular.

5.1.3 MEDIO DE CULTIVO

El medio de cultivo utilizado fue el Medio Esencial Mínimo de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), con alta concentración de glucosa (4.5 g/l), suplementado con un 10% de suero fetal bovino (SFB) previamente descomplementado por calentamiento a 56°C durante 30 min. El SFB proporciona factores de crecimiento y adhesión, hormonas, lípidos, etc. Además, el medio de cultivo fue completado con 2% de L-glutamina 200 mM, un aminoácido con un papel clave en la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos; 1% de aminoácidos no esenciales (AANE) 10 mM para promover el crecimiento celular y viabilidad; y 1% de disolución antibiótica (Penicilina 1000 UI/mL + Estreptomina 10 mg/mL) para prevenir la proliferación de bacterias que podrían interrumpir el crecimiento normal de las células, con una acción combinada frente a bacterias Gram positivas y Gram negativas.

5.1.4 MANTENIMIENTO Y SIEMBRA DE LA LINEA CELULAR CACO-2

Las células Caco-2 crecen en monocapa adheridas a una superficie, por tanto, su crecimiento está limitado por la superficie disponible. Para evitar la confluencia, es importante establecer un programa de siembra. Semanalmente se lleva a cabo la tripsinización del tapiz celular cuando las células alcanzan el 80-90% de confluencia, siguiendo el protocolo descrito a continuación.

En primer lugar, se elimina el medio de cultivo aspirándolo con una bomba de vacío. Luego, se añaden 5 mL de una disolución de PBS para lavar las células. Este paso se repite dos veces para garantizar la eliminación completa del medio de cultivo. A continuación, se adiciona 1 mL de disolución tripsina/EDTA (tripsina al 0.25%/EDTA a 1 mM) en PBS sobre el tapiz celular, y se incuban las células en la estufa durante 10-15 minutos a 37°C. Después del tiempo de incubación, se dan unos golpecitos en la parte inferior de la caja para ayudar a separar las células adheridas al fondo. Las células se extraen utilizando 5 mL de medio de cultivo, pipeteando varias veces para desagregar los grumos que puedan complicar el conteo celular.

Finalmente, para determinar la densidad celular, se mezclan 50 µl de la suspensión de células con 100 µl de azul tripán (dilución 1:3) en un tubo Eppendorf. El azul tripán es un colorante que tiñe selectivamente las células muertas de color azul, ya que penetra a través de la membrana de estas células, mientras que las células viables como no tienen la membrana dañada, esta no permite la entrada del colorante. Esto permite diferenciar las células vivas y muertas al microscopio. Para ello, se depositan 10 µl de la suspensión de células teñidas en una cámara de Neubauer y utilizando un microscopio invertido se cuentan el número de células vivas (sin teñir) presentes en los cuatro cuadrantes de la cámara de Neubauer, y se calcula el promedio de células contadas por cuadrícula. La cuadrícula central de la cámara de Neubauer al poner el cubreobjetos puede contener un volumen total de 0.1 mm³, equivalente a 0.1 µl, por lo que la densidad celular puede determinarse mediante el cálculo:

$$\frac{N^{\circ} \text{ de células}}{\text{ml}} = \frac{\text{Células vivas totales}}{4 (\text{n}^{\circ} \text{ de cuadrantes})} \times 3 (\text{factor de dilucion}) \times 10^4 (\text{factor de conversión})$$

Ecuación 1. Fórmula para la estimación de la densidad celular utilizando la cámara de Neubauer.

Una vez se conoce la densidad celular, se procede a calcular el volumen de suspensión celular requerido para la siembra. El número de células a sembrar depende del tipo de experimento que se va a llevar a cabo (*Tabla 1*).

Tabla 1. Número de células Caco-2 sembradas para la realización de cada tipo de experimento.

	MTT	Siembra para mantenimiento
Soporte	Placa 96 pocillos	Caja de 25 cm ²
Experimentos con células cancerígenas (5 días)	2·10 ⁴ células/pocillo	2.5·10 ⁵ células/caja
Experimentos con células normales (15 días)	4·10 ³ células/pocillo	2.5·10 ⁵ células/caja

Para el mantenimiento de la línea celular, es necesario cambiar el medio de cultivo cada 2-3 días, ajustándose a la tasa de crecimiento celular. A medida que las células crecen, acidifican el medio al generar ácido láctico, por lo que debido a la presencia del indicador rojo fenol en el medio, es visible el cambio de color de rosa a naranja-amarillento.

5.1.5 TRATAMIENTO DE LAS CELULAS

El medio de tratamiento utilizado es un medio de cultivo DMEM preparado según se ha descrito anteriormente, pero sin SFB. Con este medio es con el que se han preparado las disoluciones a distintas concentraciones de los compuestos de Pt y Ru testados.

5.2 COMPUESTOS DERIVADOS DE RUTENIO Y PLATINO TESTADOS

La síntesis de los compuestos de rutenio ha sido realizada por el Dr. Antonio Romerosa del grupo de investigación Química de Coordinación, Organometálica y Fotoquímica de la Universidad de Almería. Por razones de confidencialidad, al ser resultados no publicados, no se detalla la estructura de los compuestos y nos referiremos a ellos solo por el código del compuesto. En concreto, se testaron dos lotes de compuestos de rutenio. El primer lote incluye los compuestos C1, C2, C3, C4, C57, C63 y C65, y el segundo lote incluye los compuestos C102, C112, C146, C87, C162 y C163.

La síntesis de los compuestos de platino fue realizada por el grupo de investigación del Dr. Fabian Mohr de la Universidad de Wuppertal de Alemania. Al igual que en los compuestos de rutenio, nos referiremos a estos compuestos solo por su código. En este caso, el lote incluye los compuestos C227, C239, C241, C242, C244 y C245.

5.3 ESTUDIO DE LA CITOTOXICIDAD DE LOS COMPUESTOS MEDIANTE MTT

Con el objetivo de estudiar el efecto de los complejos de Pt y Ru en la viabilidad celular y determinar su valor de IC₅₀ se han llevado a cabo ensayos de MTT en células de la línea celular Caco-2. Estos experimentos se realizaron a 5 y 15 días después de la siembra, con el fin de evaluar la selectividad de los compuestos por las células cancerígenas y no por las células normales. De esta forma, se pretende seleccionar los compuestos que disminuyan la viabilidad de las células cancerígenas y no modifiquen la viabilidad de las células normales.

El MTT es un ensayo colorimétrico estándar ampliamente utilizado para evaluar la actividad metabólica celular. Este ensayo se basa en la reducción metabólica del MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio), una sal de color amarillo que puede atravesar la membrana mitocondrial de las células viables. En estas células, la enzima succinato deshidrogenasa mitocondrial

reduce el MTT (amarillo) a cristales de formazán que tienen un color azul-violeta (1-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-3,5-difenilformazan). Cabe destacar que estos cristales no son solubles en agua, pero sí en DMSO.

Como la reducción del MTT solo la llevan a cabo las células viables, el color y la cantidad de cristales de formazán en cada pocillo estará relacionada con la actividad metabólica. Mediante este método no se mide muerte celular, sino actividad metabólica, y aunque no todas las células tienen la misma cantidad de enzima, se supondrá que el número de células es equivalente a la actividad metabólica.

Respecto al protocolo, en cada placa de 96 pocillos se han testado 4 compuestos diferentes, a 5 concentraciones distintas: 0, 1, 5, 10, 15 y 20 μM y por triplicado cada una de ellas (Fig. 4). La concentración de 0 μM se utilizó como control, representando células no tratadas. Cabe destacar que el primer lote de rutenio se testó a concentraciones diferentes: 0, 10, 20, 30, 40 y 50 μM , ya que en estudios previos se habían probado concentraciones más bajas, pero no se había observado ningún efecto. Después de aplicar el tratamiento, las placas se incubaron durante 72 horas a 37°C en la estufa. Además, cada compuesto se testó en 3 pasajes de células diferentes.

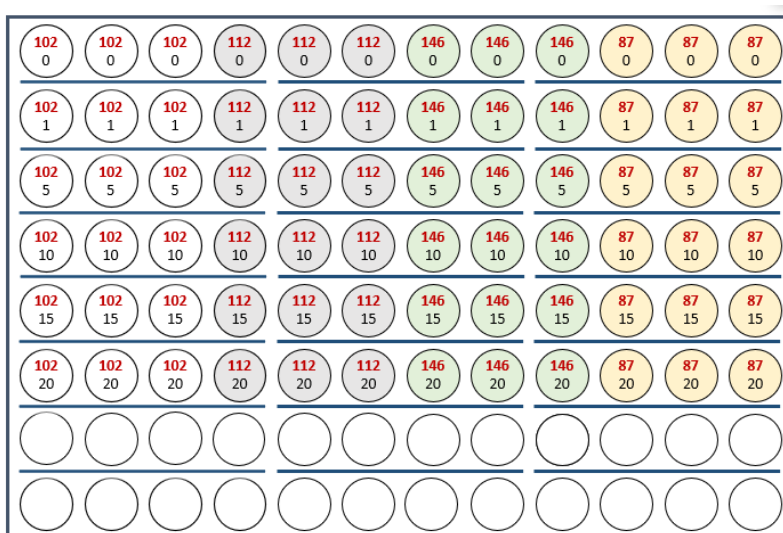


Figura 4. Esquema del diseño de una placa de 96 pocillos para un experimento de MTT. Cada color representa la incubación con un compuesto de Pt o Ru distinto, de forma que en cada placa se testaban hasta 4 compuestos. En cada pocillo se indica en color negro la concentración (μM) utilizada, además del compuesto testado en rojo. En concreto, en esta placa se testaron 4 compuestos de Ru: 102, 112, 146 y 87.

Tras las 72 h de tratamiento, se añaden 10 μl del reactivo MTT (5 mg/mL) a cada pocillo y se deja incubar durante 2 horas y 30 minutos en la estufa a 37°C. A continuación, se elimina el medio de cultivo invirtiendo la placa sobre un papel. Luego, se añaden 100 μl de DMSO por pocillo y se agita la placa durante 4 min para disolver los cristales de formazán. Por último, se mide la absorbancia de los pocillos utilizando un lector de placas (SPECTROstar^{Nano}, BMG LABTECH) a una longitud de onda de 560 nm.

El valor de absorbancia obtenido está directamente relacionado con la viabilidad celular (Ecuación 2), por lo que un mayor número de células viables se reflejara en una mayor absorbancia. Para calcular el porcentaje de viabilidad celular, se considera el 100% de viabilidad el valor de absorbancia media obtenido en la medición de las células control (0 μM). Seguidamente, se calcula la absorbancia media de los triplicados correspondientes a cada concentración y se compara con la absorbancia del control, calculando así el porcentaje de viabilidad relativa.

$$Viabilidad\ celular\ (\%) = \frac{Abs_{control}}{Abs_{pocillo\ con\ tratamiento}} \times 100$$

Ecuación 2. *Expresión para el cálculo de la viabilidad celular. La absorbancia control es la media de las absorbancias de los pocillos sin tratamiento (0 μM). La absorbancia de los pocillos con tratamiento es la absorbancia media del triplicado de cada concentración testada.*

5.3.1 CÁLCULO DE IC₅₀

Una vez se ha calculado la viabilidad celular, se representa en una gráfica el porcentaje de viabilidad respecto a la concentración de cada compuesto y se determina la IC₅₀ (concentración inhibitoria 50). Este parámetro representa la concentración necesaria de un compuesto para inhibir el 50% de la viabilidad celular, y se ha utilizado para determinar la efectividad de los complejos testados.

5.4 ESTUDIO DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE GENES RELACIONADOS CON EL CÁNCER

5.4.1 EXTRACCIÓN DE RNA

Valorando los resultados de viabilidad, se determinaron que los compuestos de platino selectivos frente al cáncer de colon eran C227, C239 y C242. Una vez seleccionados los compuestos, con el objetivo de estudiar la expresión de los genes implicados en el proceso de carcinogénesis colorrectal, se trataron 3 cajas de 25 cm² con cada compuesto a concentración 20 μM durante 72 horas. Para comparar las diferencias en el nivel de expresión, se ha realizado el mismo experimento con el cisplatino como control positivo, y con el DMSO como control negativo, ya que los compuestos derivados de platino están disueltos en DMSO y a esta concentración no tiene efecto sobre la viabilidad de células Caco-2 tumorales ni sobre las células Caco-2 normales (21). Tras las 72 horas de tratamiento, se lavaron las cajas con PBS y se congelaron hasta la extracción del RNA. Finalmente, se realizó la extracción del RNA de las 15 muestras mediante el kit NZYTotal RNA isolation kit (NZYTech).

Antes de iniciar el protocolo, es importante limpiar con etanol la superficie y el material de trabajo, además de utilizar guantes para asegurarnos de no introducir ninguna RNasa durante el proceso de purificación.

En segundo lugar, se prepara hielo para mantener las muestras en él y las disoluciones que se van a utilizar durante la extracción de RNA. A continuación, se añade directamente el β-mercaptoetanol y el buffer de lisis (buffer NR), que contiene tiocinato de guanidina, sobre el tapiz celular de las cajas de 25 cm² para inducir la lisis de las células e inactivar las RNasas celulares. En concreto, se adicionan 350 μL del buffer NR y 3.5 μL de β-mercaptoetanol a cada caja de 25 cm². Luego, con la micropipeta hay que tratar de retirar todo el tapiz celular y llevarlo a un Eppendorf.

Una vez realizada la lisis de la muestra, hay que eliminar por precipitación los contaminantes y filtrar el lisado. Para ello, se traspasa el contenido del Eppendorf a una columna de homogenización NZYSpin (anillo morado) colocada en un tubo colector de 2 mL y se centrifuga durante un minuto a 11000 g (Centrifuge 5810R Eppendorf). A continuación, se desecha la columna morada y se transfiere el sobrenadante a un Eppendorf de 1.5 mL estéril donde se añaden 350 μL de etanol 70% y se mezcla mediante pipeteo.

Seguidamente, se produce la unión del RNA a la columna y la digestión del DNA. Para ello, se añade el lisado a la columna de unión ZYSpin (anillo azul) y se centrifuga a 11000 g durante 30 segundos. En este caso, se desecha el sobrenadante y se añaden 350 μL de Buffer NI sobre la columna. De nuevo, se centrifuga a 11000 g durante 30 segundos y se desecha el sobrenadante. A continuación, para evitar

la contaminación con DNA, se añaden 95 µL del Digestion Mix, el cual contiene DNasa I, al centro de la columna de unión NZYSpin (azul) y se incuba durante 15 minutos a temperatura ambiente.

Posteriormente, se lleva a cabo el lavado y secado de la membrana. En primer lugar, se añaden 200 µL de Buffer NWR1 y se centrifuga durante 1 minuto a 11000 g. Luego, se desecha el sobrenadante y se añaden 600 µL de Buffer NWR2 repitiendo el mismo proceso de centrifugación y eliminación del sobrenadante. Este lavado se repite, pero con 250 µL del Buffer NWR2, se vuelve a centrifugar y se desecha el sobrenadante. Destacar que, en este caso, el paso de centrifugación se realiza dos veces para secar la membrana.

Finalmente, una vez descartado el tubo colector, la columna se coloca sobre un Eppendorf estéril de 1.5 mL y se añaden 25 µL de agua libre de RNasas directamente a la membrana de la columna para que, tras una centrifugación de un minuto a 11000 g, se eluya el RNA. Este paso se llevó a cabo dos veces, por lo que el volumen final de RNA recogido fue de 50 µL.

Este RNA se conserva en el hielo para evitar su degradación mientras se mide la concentración y calidad, y posteriormente se almacena a -80°C.

5.4.2 CONCENTRACIÓN Y CALIDAD DEL RNA

La concentración y calidad del RNA se evaluaron utilizando el espectrofotómetro (SPECTROstar^{Nano}, BMG LABTECH) y la placa LVis (BMG LABTECH).

En primer lugar, se sometió a la placa Lvis a un control de limpieza, a continuación, se realizó un blanco con la solución utilizada para extraer el RNA. Finalmente, se midió la absorbancia de 2 µL de cada muestra por duplicado. El propio programa te muestra la concentración de RNA en ng/µL. Los cálculos que realiza se basan en una variación de la ley de Beer-Lambert que utiliza el valor de absorbancia de ácidos nucleicos corregido.

Para evaluar la pureza, se tuvo en cuenta la relación de las absorbancias 260/280 y 260/230. Por un lado, se considera que la muestra de RNA es pura cuando el ratio 260/280 da un valor entre 2.0 y 2.2. Por otro lado, el ratio 260/230 ideal es un valor de 2 o ligeramente superior (22).

5.4.3 SÍNTESIS DE cDNA

Tras determinar la concentración y calidad del RNA obtenido en la extracción, se procede a sintetizar el DNA complementario (cDNA) mediante el kit NZY First-Strand cDNA Synthesis Kit (NZYTech).

En cada tubo de 0.2 mL almacenado en hielo se añaden en el siguiente orden el NZYRT Master Mix (2x), el NZYRT Enzyme Mix, el agua libre de RNasas y la muestra de RNA, obteniéndose un volumen final de 20 µL (*Tabla 2*). Considerando que la concentración de RNA necesaria para llevar a cabo la reacción es de 1 µg, se calcula el volumen necesario de muestra y de agua libre de RNasas.

Tabla 2. Volumen de reactivos y de RNA para la síntesis del cDNA de cada muestra

REACTIVOS	VOLUMEN	CONCENTRACIÓN FINAL
NZYRT Master Mix (2x)	10 µL	1x
NZYRT Enzyme Mix	2 µL	
RNA	X µL	1 µg
Agua libre de RNasas	Hasta llegar a un volumen total de 20 µL	

A continuación, la muestra se mezcla con cuidado mediante pipeteo, se traslada al termociclador Bio-Rad DNA y se incuba en las siguientes condiciones: 10 minutos a 25°C, 30 minutos a 50°C y 5

minutos a 85°C para inactivar la reacción. Luego, se saca del termociclador y se mantiene en hielo para añadir 1 µL de NYZ RNase H, enzima responsable de la degradación del cebador de RNA. Se vuelve a colocar el Eppendorf en el termociclador y se incuba la muestra durante 20 minutos a 37°C.

Una vez acabado el proceso, cada muestra de cDNA se diluye 1:5 con agua libre de RNasas y se almacena a -20°C para evitar la degradación del cDNA.

5.4.4 PCR CUANTITATIVA A TIEMPO REAL

Para valorar los niveles de expresión de genes clave relacionados con el proceso de carcinogénesis colorrectal, se aplica la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real (RT-PCR) denominada PCR cuantitativa, la cual permite amplificar y cuantificar el cDNA de forma simultánea tras cada ciclo. Para ello, se utiliza el kit NZYSpeedy qPCR Green Master Mix (2x), ROX plus (NZYTech).

Antes de iniciar el protocolo es importante limpiar con etanol toda la superficie, así como el material de trabajo puesto que el cDNA es muy sensible. Además, se debe de tener hielo para asegurar que las muestras estén a una temperatura en torno a los 5°C.

En cada pocillo de la placa, se debe de poner en este orden 18 µL de cada Master Mix (NYZSpeedy ROX plus), que incluye el primer forward, el reverse y el agua libre de RNasas. Adicionalmente, en el pocillo hay que añadir 2 µL del cDNA, lo que resulta en un volumen total de 20 µL (*Tabla 3*). Para poder realizar controles negativos en las placas, en los pocillos finales vacíos se añaden 18 µL del Master Mix y los 2 µL de cDNA se sustituyen por 2 µL de agua libre de RNasas.

Tabla 3. Volumen de reactivos y de muestra necesarios para llevar a cabo la PCR.

REACTIVOS	VOLUMEN POR POCILLO (µL)	CONCENTRACIÓN FINAL
NZYSupreme qPCR Green Master Mix (2x), ROX Plus	10	1x
10 µM primer FW	0.8	400 nM
10 µM primer RV	0.8	400 nM
Muestra	2	
Agua libre de RNasas	6.4	

Una vez pipeteados todos los pocillos, se sella la placa con un film protector y se centrifuga para homogeneizar los componentes antes de llevar a cabo la lectura de la placa en el termociclador a tiempo real Applied Biosystems SetpOne™. El termociclador lleva a cabo los diferentes ciclos de temperatura para permitir la amplificación del DNA. En primer lugar, realiza un ciclo a 95°C durante 2 minutos para separar las hebras del DNA, a continuación, efectúa 40 ciclos en los que está 5 segundos a 95°C, y después, baja a 60°C durante 25 segundos para garantizar la desnaturalización y el annealing, es decir, la unión de los cebadores al DNA molde. Finalmente, a 72°C se produce la etapa de extensión realizada por la polimerasa.

5.4.4.1 SELECCIÓN DE GENES Y DISEÑO DE PRIMERS

Los genes analizados y los primers utilizados fueron seleccionados en base a la bibliografía existente (23). En concreto, se evaluó la abundancia relativa de BIRC-5, APC, Bcl-2, caspasa-9, caspasa-3, caspasa-8, P53 y PARP-1 (*Tabla 4*). Además, se evaluaron los genes B2M y GAPDH, dos genes housekeeping usados como referencia durante el análisis de los resultados.

Tabla 4. Secuencia de los cebadores humanos utilizados para el análisis de PCR en tiempo real de la expresión de genes involucrados en la tumorigénesis en células Caco-2/TC7

GEN	SECUENCIA DE CEBADORES
BIRC-5	Forward primer (5'-3'): GCCTGGCAGCCCTTTCTCAA Reverse primer (5'-3'): TCCCAGCCTTCCAGCTCCTT
APC	Forward primer (5'-3'): AAAACGAGCACAGCGAAGAATAGC Reverse primer (5'-3'): TCGTGTAGTTGAACCTGACCAT
Bcl-2	Forward primer (5'-3'): ATCGCCCTGTGGATGACTG Reverse primer (5'-3'): GCCTCAGCCCAGACTCAC
Caspasa-9	Forward primer (5'-3'): GCAGGCTCTGGATCTCGGC Reverse primer (5'-3'): GCTGCTTGCCTGTTAGTTCGC
Caspasa-3	Forward primer (5'-3'): ATGGTTTGAGCCTGAGCAGA Reverse primer (5'-3'): GGCAGCATCATCCACACATAC
Caspasa-8	Forward primer (5'-3'): ACCTTGTGTCTGAGCTGGTCT Reverse primer (5'-3'): GCCCACTGGTATTCCCTCAGGC
P53	Forward primer (5'-3'): CACTGCCCAACAACACCAGTCCCT Reverse primer (5'-3'): GTCTGAGTCAGGCCCTTCTGTCTTG
PARP-1	Forward primer (5'-3'): CCTGATCCCCACGACTTT Reverse primer (5'-3'): GCAGGTTGTCAAGCATTC
B2M	Forward primer (5'-3'): CAGCATCATGGAGGTTTGAA Reverse primer (5'-3'): TGGAGACAGCACTCAAAGTA
GAPDH	Forward primer (5'-3'): CATGACCACAGTCCATGCCATCACT Reverse primer (5'-3'): TGAGGTCCACCACCTGTTGCTGTA

5.5 ANÁLISIS DE DATOS Y HERRAMIENTAS INFORMÁTICAS

Los datos que se obtuvieron de cada ensayo se registraron y procesaron con el programa Microsoft Excel de Microsoft Office. Una vez realizado el tratamiento matemático, se empleó el programa de análisis estadísticos Prism 5.02 de Graphpad Software.

Para los estudios de viabilidad celular, se realizó un test ANOVA de 1 vía y se aplicó un post-análisis Bonferroni para evaluar diferencias entre la viabilidad celular y la dosis administrada de los complejos de platino y rutenio. Asimismo, se realizaron análisis lineales no regresivos para calcular la IC₅₀.

Por otro lado, para determinar las dianas génicas sobre las que actúan los compuestos de platino, se realizó una prueba T de Student o T-test no pareada que comparaba cada uno de los tratamientos realizados con los complejos de Pt frente a muestras control sin tratar. Para ello, se obtuvo de cada muestra su Ct, el número de ciclos de amplificación que fueron necesarios para poder detectar el gen. Este valor es inversamente proporcional a la cantidad de gen detectado. A continuación, para obtener el ΔCt se calculó la diferencia entre cada Ct y el Ct medio de los dos genes housekeeping, y se halló la media del valor de ΔCt de las muestras control. Seguidamente, el ΔCt medio del control se restó al ΔCt de cada muestra y se obtuvo el $\Delta\Delta Ct$. Finalmente, para hallar el nivel de expresión de cada gen, el $\Delta\Delta Ct$ de cada muestra se expresó como una potencia de base 2 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$). De hecho, dado que las muestras se evaluaron por triplicado, el nivel de expresión de cada gen se obtuvo como la media de los 3 triplicados.

Finalmente, como lo que nos interesa es la expresión relativa, es decir, la diferencia entre las células tratadas y las células control, se divide el nivel de expresión del gen en el grupo de interés entre el nivel de expresión del gen en el grupo control. De nuevo, como las muestras se evaluaron por triplicado, se calcula la media de expresión relativa y la desviación estándar.

El promedio de la expresión relativa de cada gen y la desviación estándar fueron los datos introducidos en el programa Prism 5.02 de Graphpad Software para valorar estadísticamente los resultados. Se efectuó una prueba T de Student para determinar si existían diferencias significativas entre las células control y las células tratadas con los distintos compuestos anticancerígenos, y los resultados se representaron mediante un gráfico de barras. De esta manera, considerando un nivel de confianza del 95% ($p < 0.05$), se evaluaron las diferencias en la expresión de los genes después de la administración de los compuestos. Los resultados se expresaron como media \pm desviación estándar.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 ESTUDIOS DE VIABILIDAD CELULAR Y DETERMINACIÓN DE IC₅₀

El método utilizado para evaluar la viabilidad celular ha sido el ensayo de MTT. Mediante este método se ha determinado el efecto de los compuestos de rutenio y platino sobre la viabilidad de células tumorales, pero además para el correcto desarrollo de un nuevo fármaco es conveniente comprobar que este no presenta toxicidad alguna sobre células normales. Por ello, se han realizado de forma paralela dos experimentos de MTT en distintos estados de confluencia.

El primer experimento se ha llevado a cabo cuando las células presentan un 80% de confluencia. En concreto, se han tratado con los compuestos 48 horas después de la siembra de las células Caco-2/TC7. En este momento, las células se consideran cancerígenas.

El segundo experimento se ha realizado cuando las células alcanzan una confluencia del 100%, dado que en este punto presentan una morfología similar a la del epitelio intestinal, por lo que se pueden considerar células normales. Con el fin de garantizar que las células muestran el 100% de confluencia, el tratamiento se ha realizado 12 días después de su siembra.

En ambos experimentos, siguiendo el protocolo establecido para el MTT (*ver apartado 5.3*), las células Caco-2 se incubaron durante 72 horas con los compuestos de Ru y Pt a diferentes concentraciones. En el caso del primer lote de rutenio las concentraciones estudiadas fueron: 0, 10, 20, 30, 40 y 50 μ M, mientras que en el resto de los compuestos se testaron las concentraciones: 0, 1, 5, 10, 20, 30 μ M. Las diluciones se realizaron con DMSO, ya que la mayoría de los compuestos no son solubles en agua a excepción de los compuestos C102, C112, C146, C87, C162 y C163 que sí que se disolvieron en agua.

Para facilitar el análisis de los resultados y poder evaluar y comparar la actividad de los complejos testados, se ha seleccionado el *cisPt* como control positivo debido a que es un quimioterápico frente al cáncer de colon ampliamente utilizado.

6.1.1 COMPUESTOS DERIVADOS DEL RUTENIO

Inicialmente, se realizó una prueba en células sanas (15 días) para verificar la selectividad de los compuestos frente a las células tumorales. En este estudio, se observó que la viabilidad de estas células no se ve afectada por el tratamiento con C1, C2, C3, C4, C57 y C63 (*Anexo I, Fig. S1A-F*), independientemente de la concentración testada (0, 10, 20, 30, 40 y 50 μ M). Sin embargo, al tratar las células con el compuesto C65, se observó una reducción en la viabilidad celular a concentraciones elevadas. Específicamente, la viabilidad promedio al aplicar una concentración de 40 μ M del compuesto C65 fue del $72.98 \pm 23.09\%$, mientras que con una concentración de 50 μ M, la viabilidad promedio fue del $71.94 \pm 21.44\%$. Esta disminución en la viabilidad celular fue estadísticamente

significativa ($p < 0.05$) en comparación con la cantidad de células vivas que hay en el grupo control (Anexo I, Fig. S1G).

Posteriormente, se llevó a cabo el mismo ensayo en células tumorales (5 días). En este caso, se observó que ninguno de los compuestos C1, C2, C3, C4, C57 y C63 reduce significativamente la viabilidad de las células tumorales (Fig. 5A-F), excepto el compuesto C65 (Fig. 5G). Específicamente, la viabilidad promedio a una concentración de 10 μM del compuesto C65 fue del $55.58 \pm 23.38\%$, a 20 μM del $55.47 \pm 37.45\%$ y a 30 μM del $58.61 \pm 23.45\%$. En estas tres concentraciones, la disminución en la viabilidad celular fue estadísticamente significativa ($p < 0.05$). Además, la viabilidad celular a 40 μM fue del $53.06 \pm 24.645\%$ y la de 50 μM del $51.07 \pm 15.80\%$, mostrando ambos resultados una significancia estadística aún mayor ($p < 0.01$). Por tanto, a una concentración de 10 μM , la viabilidad celular cae de manera brusca, llegando prácticamente al 50% de viabilidad, pero a partir de este punto, la viabilidad celular se mantuvo estable, independientemente de la dosis utilizada. En comparación con el control positivo (cisplatino), en este se observó una reducción significativa ($p < 0.05$) en la viabilidad celular a una concentración de 1 μM ($69,73 \pm 16,09\%$).

Al realizar el cálculo del IC_{50} del compuesto C65, se obtuvo un valor de $24.67 \pm 1.13 \mu\text{M}$, lo cual implica que se requiere una concentración mayor para inhibir el 50% de la viabilidad celular en comparación con el cisPt ($12.45 \pm 0.46 \mu\text{M}$) (Tabla 5). En conclusión, se puede afirmar que el cisPt es más efectivo que el C65.

Tabla 5. Valores de IC_{50} (μM) del compuesto C65 de rutenio y del cisPt en células tumorales. Los datos se expresan como la media \pm desviación estándar del log IC_{50} .

COMPUESTO	IC_{50} EN CÉLULAS TUMORALES (μM)
C65	24.67 ± 1.13
cisPt	12.45 ± 0.46

A pesar de que el compuesto C65 reduce la viabilidad de las células tumorales, su toxicidad en las células normales lo descarta como una opción viable para su uso como fármaco anticancerígeno debido a la falta de selectividad.

En consecuencia, se concluye que ninguno de los compuestos de rutenio testados es buen candidato para su aplicación como antitumoral. Una de las posibles razones que podría explicar la falta de efecto de los compuestos C1, C2, C3, C4, C57 y C63 es su incapacidad para penetrar en el interior de las células Caco-2/TC7 debido a su bajo coeficiente de reparto.

En el contexto farmacéutico, el índice de reparto o coeficiente de partición ($\text{Log } P_{ow}$) es una medida fundamental para evaluar la distribución de un fármaco entre la sangre y los tejidos. El coeficiente de reparto es importante, ya que influye en la distribución de un fármaco en el organismo, afectando su absorción, distribución, metabolismo y eliminación. Un fármaco con un coeficiente de reparto alto tendrá una mayor afinidad por los tejidos lipídicos, lo que le permitirá distribuirse mejor en el organismo. Por otro lado, un fármaco con un coeficiente de reparto bajo se retendrá principalmente en la fase acuosa, como la sangre (24). Por ello, para que un fármaco se pueda biodistribuir adecuadamente, es fundamental que presente un equilibrio entre estas dos propiedades. Así, los valores óptimos de coeficiente de reparto oscilan entre $-1 < \text{Log } P_{ow} < 3$.

También es importante tener en cuenta que, el coeficiente de reparto es una medida simplificada que no considera otros factores relevantes como la unión a proteínas plasmáticas, la interacción con transportadores o la penetración en compartimentos específicos dentro del organismo. Por lo tanto, aunque estos fármacos pudieran acceder al interior de las células en un organismo completo, su falta

de eficacia en los cultivos celulares utilizados en los estudios preclínicos impide su progreso hacia etapas posteriores de investigación en entidades biológicas completas.

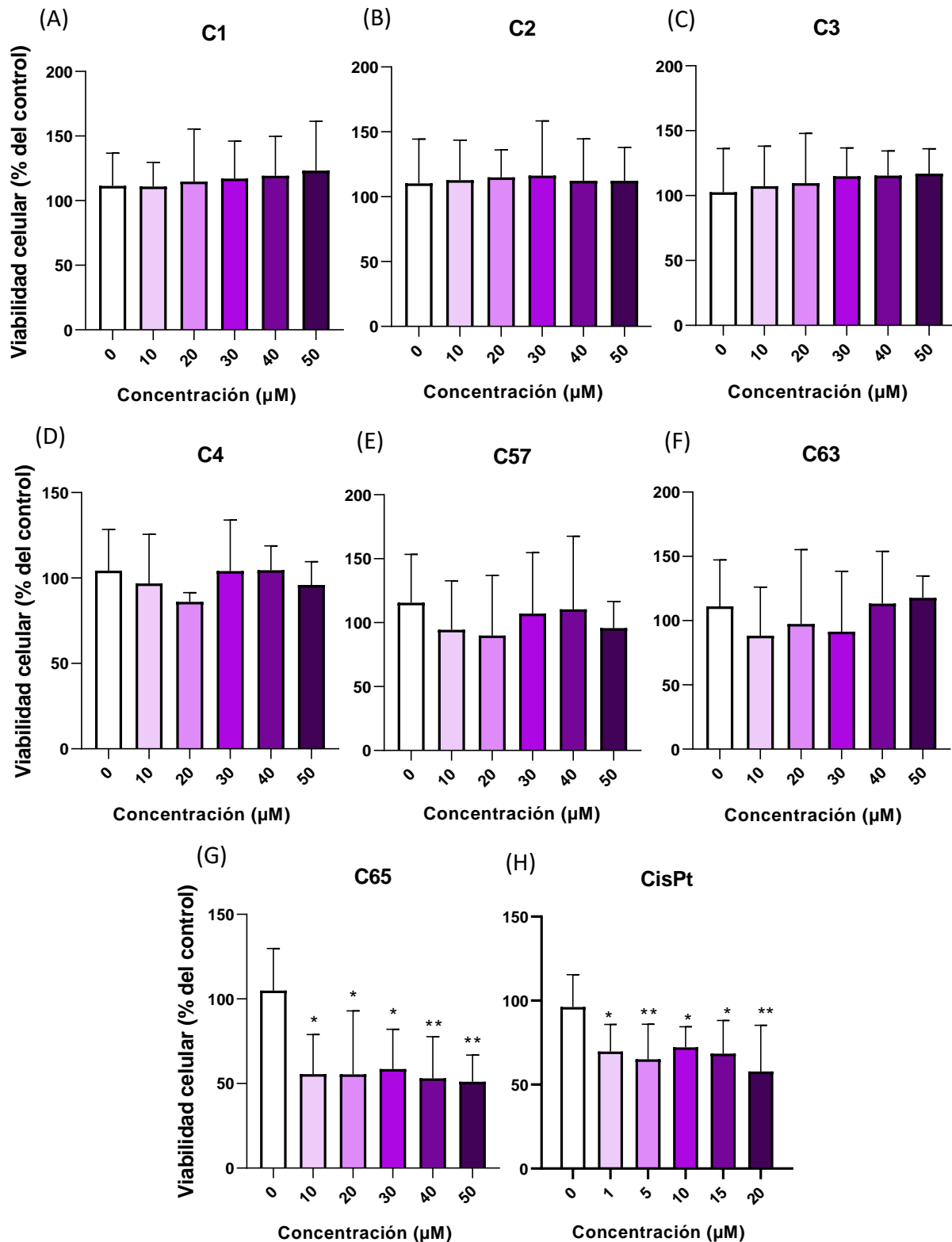


Figura 5. Gráficos del efecto dosis-respuesta de los compuestos derivados del rutenio (C1, C2, C3, C4, C57, C63 y C65) y del cisPt en células Caco-2 tumorales (5 días). Los datos se expresan como la media \pm desviación estándar ($n \geq 3$ experimentos). Se utilizó un test ANOVA de 1 vía y un post-análisis de comparación múltiple Bonferroni para comparar los efectos de las diferentes concentraciones de los compuestos respecto del control (* $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$).

De la misma forma se procedió con el segundo lote de compuestos derivados de rutenio. En primer lugar, se realizó la prueba en células normales. En esta ocasión, se observó que ninguno de los compuestos de rutenio C102, C112, C146, C87, C162 ni C163 (Anexo II, Fig. S2A-F) afectaba a la viabilidad de células sanas, independientemente de la concentración utilizada (0, 1, 5, 10, 15 y 20 μM).

En segundo lugar, se llevó a cabo el mismo ensayo en células tumorales. Por un lado, el tratamiento con los compuestos C102, C146 y C162 no tuvo ningún impacto significativo en la viabilidad de las células tumorales (Fig. 6A, C y E, respectivamente). Por el contrario, los compuestos C112, C87 y C163 sí que mostraron una reducción en la viabilidad de células tumorales. El compuesto C112 (Fig. 6B) disminuyó la viabilidad de manera significativa ($p < 0.01$) a partir de la concentración de 10 μM , alcanzando un valor de viabilidad celular del $65.92 \pm 29.49\%$, obteniéndose valores similares para las concentraciones de 15 y 20 μM .

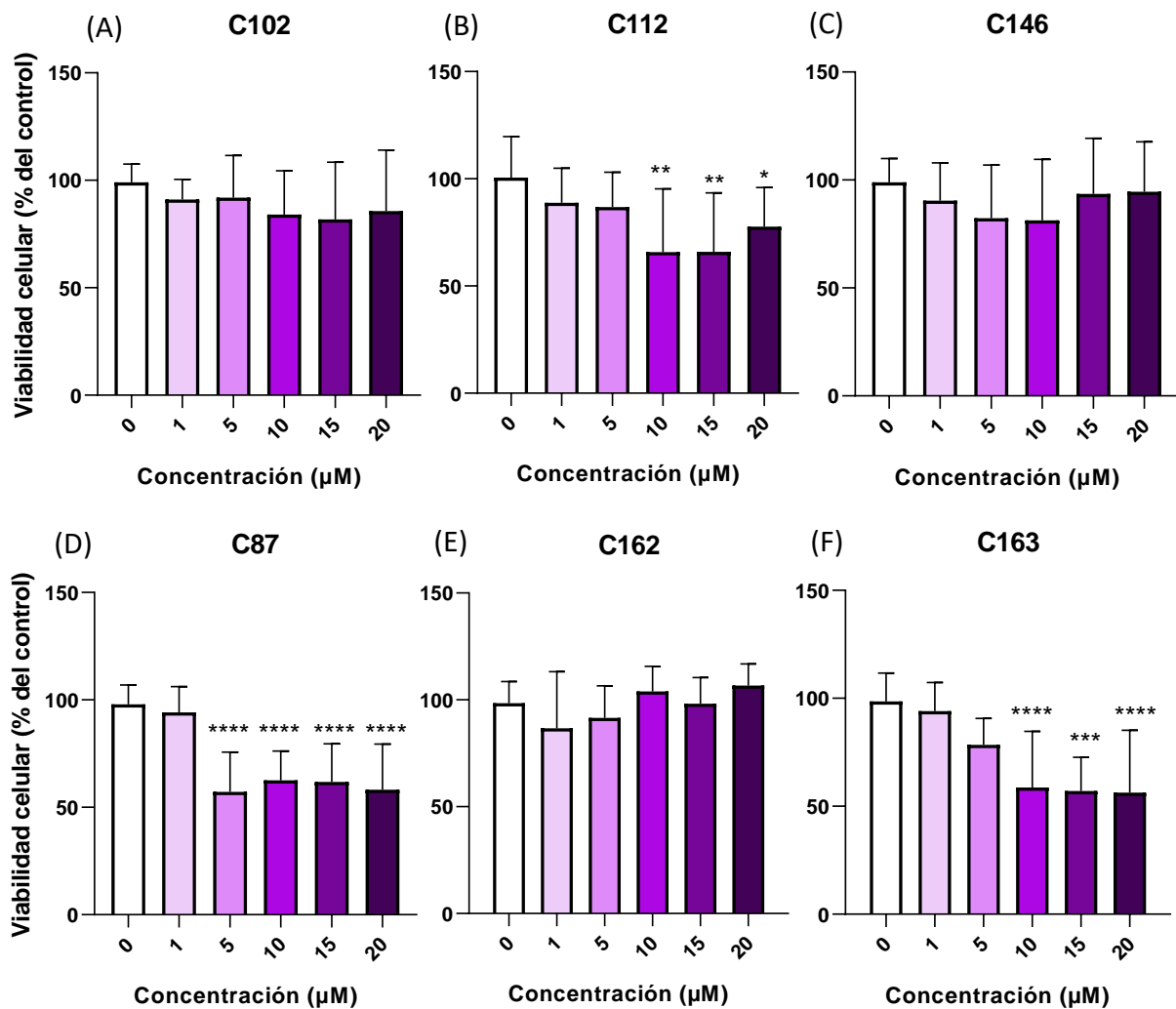


Figura 6. Gráficos del efecto dosis-respuesta de los compuestos derivados del rutenio (C102, C112, C146, C87, C162 y C163) en células Caco-2 tumorales (5 días). Los datos se expresan como la media \pm desviación estándar ($n \geq 4$ experimentos). Se utilizó un test ANOVA de 1 vía y un post-análisis de comparación múltiple Bonferroni para comparar los efectos de las diferentes concentraciones del compuesto respecto del control (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ y **** $p < 0.0001$).

En cuanto al compuesto C87 (Fig. 6D) se observó una disminución significativa en la viabilidad celular ya a una concentración de 5 μM . El valor de viabilidad se mantuvo constante a partir de 5 μM

independientemente de la dosis, en concreto, la viabilidad celular a 5 μM es del $57.24 \pm 18.50\%$ y a 20 μM continuó siendo del $58.24 \pm 21.23\%$.

En relación con el compuesto C163 (*Fig. 6F*), la disminución de la viabilidad celular fue dependiente de la dosis, de forma que a una concentración de 10 μM esta disminución fue estadísticamente significativa, con un valor de $58.65 \pm 26.00\%$. Esta reducción se mantuvo constante hasta 20 μM ($56.31 \pm 28.85\%$), mostrando en todos los casos una gran significancia estadística ($p < 0.001$).

Por tanto, la selectividad de los compuestos de este segundo lote mejora respecto a los compuestos del primer lote, ya que los complejos C112, C87 y C163 afectan a la viabilidad de las células tumorales, pero ninguno de ellos tiene efecto citotóxico sobre células epiteliales normales.

El complejo de rutenio C87 presentó la mayor actividad, demostrada por el valor de su IC_{50} $2.01 \pm 0.19 \mu\text{M}$ (*Tabla 6*). Al comparar los valores de IC_{50} de los compuestos C112 ($5.98 \pm 0.32 \mu\text{M}$), C87 ($2.01 \pm 0.19 \mu\text{M}$) y C163 ($3.63 \pm 0.19 \mu\text{M}$) (*Tabla 6*) con el IC_{50} del cisplatino ($12.45 \pm 0.46 \mu\text{M}$) (*Tabla 5*), se observa que los compuestos derivados de rutenio tienen mayor capacidad antiproliferativa que el cisplatino. Además, destaca la selectividad de estos complejos, puesto que no son citotóxicos en las células normales incluso a concentraciones superiores a su IC_{50} .

Tabla 6. Valores de IC_{50} (μM) del segundo lote de compuestos de rutenio en células tumorales. Los datos se expresan como la media \pm desviación estándar del log IC_{50} .

COMPUESTO	IC_{50} EN CÉLULAS TUMORALES (μM)
C112	5.98 ± 0.32
C87	2.01 ± 0.19
C163	3.63 ± 0.19

Por todo ello, los compuestos C112, C87 y C163 se podrían considerar candidatos para su aplicación como antitumorales. Sin embargo, los compuestos C1, C2, C3, C4, C57, C63, C102, C146 y C162 se descartan, ya que no influyen en la viabilidad de las células tumorales.

6.1.2 COMPUESTOS DERIVADOS DEL PLATINO

Por otra parte, se evaluó la capacidad antitumoral de compuestos derivados del platino. En cuanto a los ensayos realizados en células normales, ninguno de los compuestos C227, C239, C241, C242, C244 ni C245 modificaron la viabilidad de las células normales (*Anexo III, Fig. S3A-F*). La viabilidad se mantuvo cercana al 100% independientemente de la concentración utilizada (0, 1, 5, 10, 15 y 20 μM).

A continuación, al evaluar estos mismos compuestos y concentraciones en células tumorales se pudo observar que los compuestos C241, C244 y C245 no disminuyeron significativamente la viabilidad celular (*Fig. 7C, E y F*). Sin embargo, el tratamiento con los compuestos C227, C239 y C242 sí que afectó a las células tumorales, disminuyendo su viabilidad de forma dosis dependiente. En concreto, en los tres casos, la viabilidad celular se vio disminuida de manera significativa a partir de una concentración de 15 μM , aunque el nivel de significancia variaba. En el caso del compuesto C227 (*Fig. 7A*), el descenso en la viabilidad mostró una alta significancia estadística ($p < 0.0001$) tanto a 15 μM ($57.17 \pm 8.54\%$) como a 20 μM ($65.42 \pm 7.65\%$). El compuesto C239 (*Fig. 7B*) redujo la viabilidad de las células tumorales a 15 y 20 μM , siendo la concentración de 20 μM con la que obtuvo un valor de viabilidad celular mínimo de $50.61 \pm 16.61\%$. Finalmente, el compuesto C242 también disminuyó la viabilidad celular (*Fig. 7D*). Más concretamente, a una concentración de 10 μM se obtuvo un valor de viabilidad celular de $55.35 \pm 19.45\%$ y a 20 μM de $44.61 \pm 22.53\%$, siendo esta última la viabilidad más baja registrada.

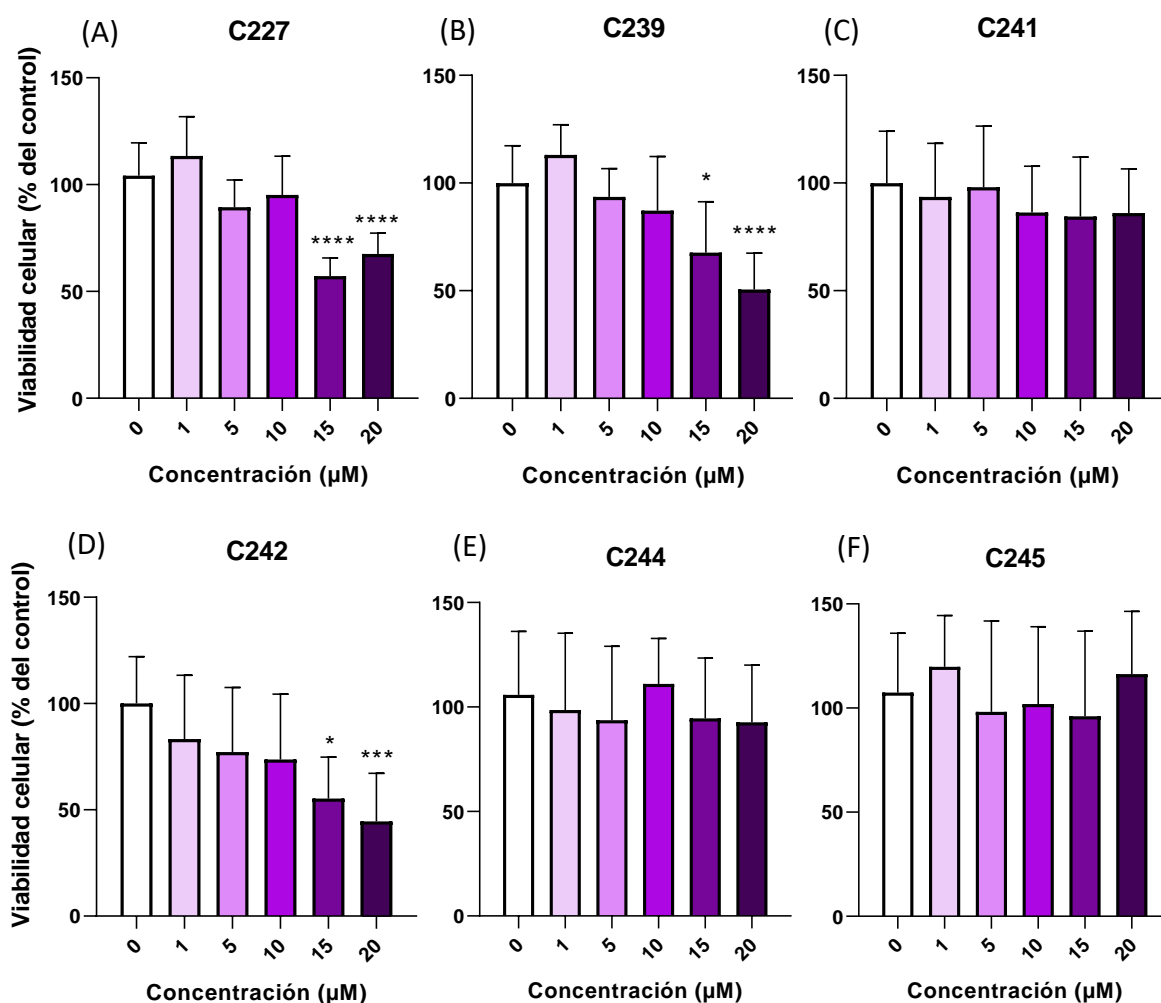


Figura 7. Gráficos del efecto dosis-respuesta de los compuestos derivados de platino (C227, C239, C241, C242, C244 y C245) en células Caco-2 tumorales (5 días). Los datos se expresan como la media \pm desviación estándar ($n \geq 4$ experimentos). Se utilizó un test ANOVA de 1 vía y un post-análisis de comparación múltiple Bonferroni para comparar los efectos de las diferentes concentraciones del compuesto respecto del control (* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ y **** $p < 0.0001$).

Las capacidades antiproliferativas de los compuestos de platino fueron comparables entre sí (Tabla 7). En concreto, la IC_{50} más baja fue la del compuesto C227 ($9.86 \pm 0.14 \mu M$) y la más alta la del compuesto C242 ($10.47 \pm 0.22 \mu M$), por lo que apenas hay diferencia en los valores de IC_{50} . Al compararlos con el valor de IC_{50} del *cisPt* ($12.45 \pm 0.46 \mu M$) (Tabla 5), estos compuestos fueron ligeramente mejores que el *cisPt*, en cuanto a cantidad de dosis necesaria para inhibir la viabilidad del 50% de las células tumorales. Sin embargo, al compararlas con las actividades de los compuestos de rutenio (Tabla 6), se observó que los compuestos de platino presentaban actividades más bajas.

Tabla 7. Valores de IC_{50} (μM) de los compuestos de platino en células tumorales. Los datos se expresan como la media \pm desviación estándar del log IC_{50} .

COMPUESTO	IC_{50} EN CÉLULAS TUMORALES (μM)
C227	9.86 ± 0.14
C239	10.41 ± 0.15
C242	10.47 ± 0.22

6.1.3 COMPARACIÓN ENTRE LOS COMPUESTOS DE PLATINO Y LOS DE RUTENIO

La diferencia en la actividad y eficacia de los compuestos de rutenio en comparación con los compuestos de platino en la afectación de la viabilidad de las células cancerosas puede estar relacionada con diversas razones:

- Los compuestos de Ru(II) tienen una estructura octaédrica a diferencia de la estructura plano-cuadrada de los compuestos de Pt(II), lo cual podría implicar un mecanismo de acción diferente. Es posible que los compuestos de Ru actúen sobre vías metabólicas o procesos biológicos específicos en las células cancerosas, lo que podría conducir a una mayor afectación de su viabilidad en comparación con los compuestos de Pt (25).
- Los compuestos de rutenio pueden tener una mayor especificidad hacia ciertos objetivos moleculares o estructuras en las células cancerosas, lo que les permite ejercer un efecto más potente en su viabilidad. Esto podría estar relacionado con diferencias en la estructura química y las propiedades de unión de los compuestos de rutenio en comparación con los compuestos de platino (26).

6.2 ESTUDIO DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE CIERTOS GENES

De acuerdo con los resultados anteriores de actividad antiproliferativa de los compuestos de platino, se seleccionaron los compuestos C227, C239 y C242 para profundizar en el estudio de su mecanismo de acción.

Además de los genes *APC* y *P53* relacionados con el proceso de tumorigénesis (*ver apartado 3.2.3*), los experimentos se han centrado en analizar las diferencias en los niveles de expresión de genes implicados en la apoptosis celular.

6.2.1 GENES IMPLICADOS EN LA MUERTE CELULAR PROGRAMADA: APOPTOSIS

En mamíferos, existen dos posibles vías apoptóticas: la ruta endógena o mitocondrial que se desencadena a base de señales intracelulares y la vía exógena dependiente de receptores de citoquinas, como los receptores de la familia del TNF. Aunque ambas vías presentan diferentes mecanismos de activación, comparten la misma vía de ejecución, que es la iniciación de la cascada de las caspasas.

Las caspasas se expresan en la mayoría de las células como procaspasas inactivas, por lo que deben ser activadas por escisión proteolítica en respuesta a señales que inducen apoptosis (27). Son las caspasas iniciadoras, caspasas-8 y -9, las que escinden y activan a otros miembros de la familia de procaspasas, en concreto, a las caspasas ejecutoras (caspasas-3, -6 y -7). La movilización de una caspasa iniciadora u otra es dependiente de la vía apoptótica, así mientras la vía exógena activa la caspasa-8, la vía endógena hace lo propio con la caspasa-9 (28,29).

Finalmente, son las caspasas ejecutoras las que escinden cientos de sustratos, y estas sí que son comunes para las dos vías de apoptosis descritas anteriormente.

La apoptosis o muerte celular programada (MCP) es adecuada para evitar la generación de procesos patológicos, ya que en este proceso las células se autodestruyen sin desencadenar reacciones de inflamación. La apoptosis por tanto constituye un mecanismo de defensa "*anti-cancer*" (30).

Además de las caspasas, la proteína Bcl-2 (*B-cell lymphoma 2*) también desempeña un papel crucial en la regulación de la apoptosis. La función principal de esta proteína es inhibir la apoptosis y promover la supervivencia celular. Además de su papel en la regulación de la apoptosis, la proteína Bcl-2 también

puede influir en otros procesos celulares, como la regulación del ciclo celular, la respuesta al estrés celular y la autofagia (31).

Por otro lado, tenemos la proteína BIRC-5 (*baculoviral inhibitor of apoptosis repeat-containing 5*). Esta proteína se encuentra sobreexpresada en una amplia variedad de tumores y células cancerosas, y su presencia está asociada con la resistencia a la muerte celular programada, debido a que BIRC-5 inhibe la activación de la caspasa-9. Por ello, la inhibición de BIRC-5 se considera una estrategia terapéutica potencial para el tratamiento del cáncer (32). Finalmente, se ha analizado el nivel de expresión de la proteína PARP-1 (Poly(ADP-ribose) polymerase 1), una enzima implicada en la reparación del DNA y en la regulación de la apoptosis.

La expresión de los genes BIRC-5 y APC (*Fig. 8A y B, respectivamente*) no se ve modificada de manera significativa respecto al control por ninguno de los compuestos. A pesar de ello, el cisplatino y el compuesto C242 mostraron una regulación positiva del gen Bcl-2 (*Fig. 8C*). En concreto, el nivel de expresión del gen Bcl-2 tras el tratamiento con C242 es de 2.05 ± 0.32 , mientras que tras el tratamiento con el cisPt es de 1.81 ± 0.24 . Esta observación resulta contradictoria, ya que el gen Bcl-2 codifica para una proteína anti-apoptótica, por lo que, en teoría, un aumento en la expresión de Bcl-2 debería conducir a una disminución de la apoptosis.

Al comparar estos resultados de los niveles de expresión con los valores de IC₅₀ obtenidos, se observa que tanto el cisplatino (*Tabla 5*) como el C242 (*Tabla 7*) presentan una IC₅₀ ligeramente superior a la de los demás compuestos. Esto sugiere que la leve sobreexpresión del gen Bcl-2 puede conferir a estas células antitumorales una mayor resistencia a la apoptosis.

Sin embargo, se ha descrito que pacientes con sobreexpresión de Bcl-2 presentan un pronóstico ligeramente más favorable. De hecho, los casos que presentan una disminución en la expresión de P53 tienen un pronóstico mucho mejor si también muestran sobreexpresión de la proteína Bcl-2, lo que sugiere que el estado de Bcl-2 tiene un efecto sobre el pronóstico (33). En este contexto, únicamente el cisplatino demuestra un aumento en la expresión de Bcl-2 (*Fig. 8C*) y una disminución significativa en la expresión de P53 (0.61 ± 0.07) (*Fig. 8G*).

No obstante, los compuestos C227 y C239 también muestran una reducción en la expresión de P53, siendo más significativa ($p < 0.01$) la del compuesto C239 (0.53 ± 0.08) (*Fig. 8G*). Esta observación muestra una discrepancia al ser contrastada con los valores de IC₅₀ obtenidos (*Tabla 7*), dado que el gen P53 actúa como un supresor tumoral, lo que implica que una menor cantidad de este gen se correlaciona con una mayor probabilidad de desarrollar un tumor. Sin embargo, en algunos estudios realizados en pacientes con cáncer de colon, aquellos en los que se observó una disminución en la expresión de gen P53, tuvieron un pronóstico más favorable que los que presentaban una sobreexpresión de P53 (33).

Además, se llevó a cabo un análisis de la expresión génica de las proteínas pertenecientes a la familia de las caspasas. En todos los compuestos estudiados, se observó una disminución en la expresión de la caspasa-3 (*Fig. 8E*). Sin embargo, únicamente en el cisPt y el C242 se detectó una sobreexpresión de la caspasa-9 (*Fig. 8D*). Por otro lado, la caspasa-8 se encuentra sobreexpresada en todos los compuestos (*Fig. 8F*). Esto indica que la expresión de las caspasas iniciadoras está aumentada, pero ocurre lo contrario con la caspasa ejecutora. Como se ha mencionado previamente, la caspasa-8 activa la vía exógena, mientras que la caspasa-9 activa la endógena. Por lo tanto, todos los compuestos activan la vía exógena, y tanto el cisplatino como el C242 también activan a la vía

endógena. Esto es beneficioso, ya que estos compuestos exacerbaban ambas vías apoptóticas, por lo que se movilizan más mecanismos de muerte.

En definitiva, las caspasas iniciadoras están sobreexpresadas, pero la caspasa-3 que es una de las responsables de la apoptosis, no lo está. Una posible causa, es que en lugar de sobreexpresarse la caspasa-3, lo hagan las otras dos caspasas ejecutoras (caspasa-6 y -7). Otra posibilidad es que la activación de las caspasas no sea el mecanismo apoptótico de muerte celular implicado en la actividad de los complejos estudiados, ya que existen otros mecanismos de muerte celular, como la externalización de la fosfatidilserina (34).

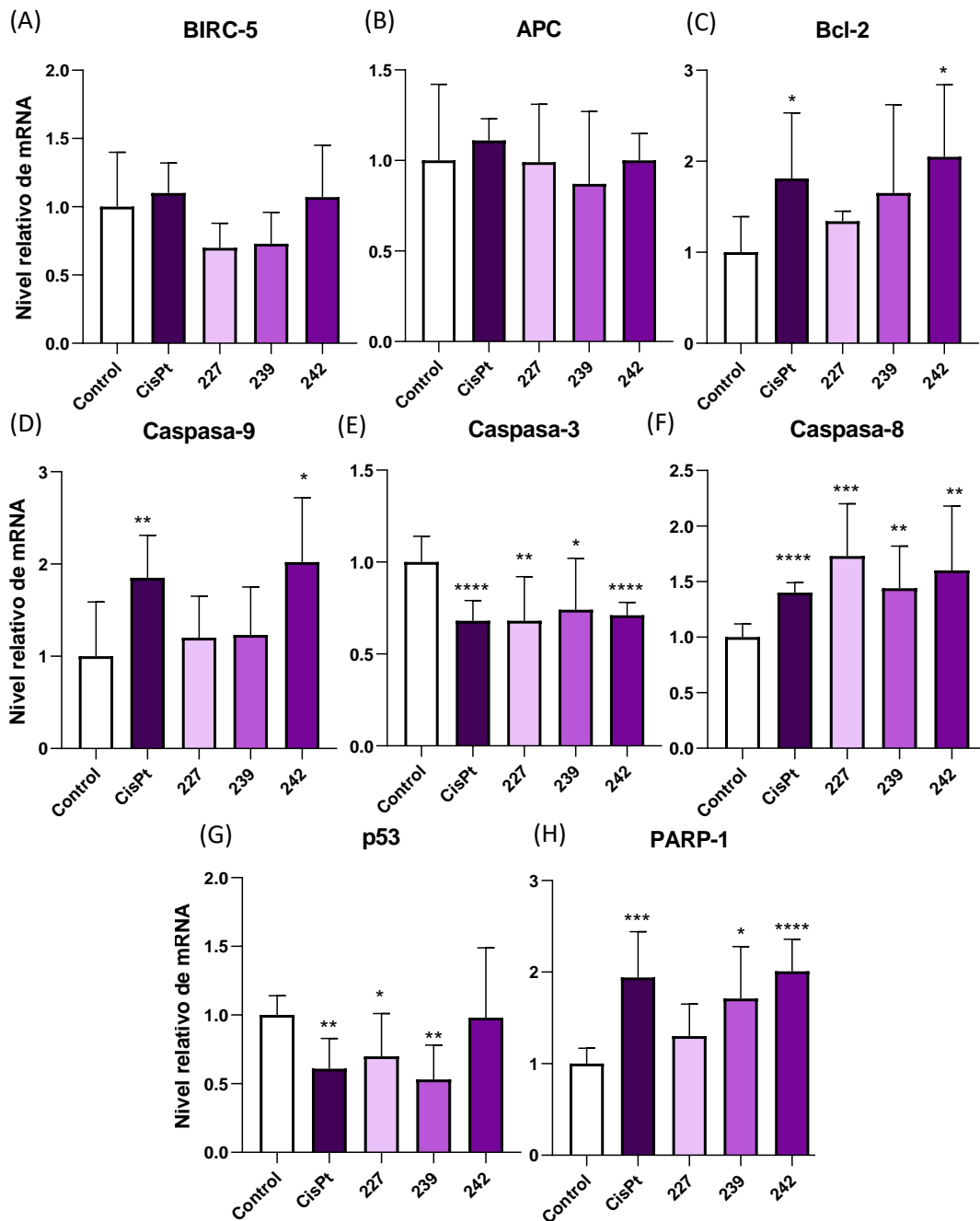


Figura 8. Nivel relativo de mRNA de los genes BIRC-5, APC, Bcl-2, caspasa-9, -3, -8, P53 y PARP-1 inducidos por varios compuestos de platino (20 μ M, 72h) en células Caco-2/TC7. Los valores se expresan como valores medios \pm desviación estándar ($n \geq 3$ experimentos), y los asteriscos indican las diferencias significativas respecto al control (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$).

Por otra parte, se observa una sobreexpresión de PARP-1 en las células tratadas con cisplatino (1.94 ± 0.17), C242 (2.01 ± 0.12) y C239 (1.71 ± 0.19) (Fig. 8H). En la actualidad, existe un gran campo de investigación para el desarrollo de inhibidores de PARP-1. Así, estos inhibidores al interferir con PARP-1, bloquean la reparación del DNA, por lo que esto conduce a la acumulación de daño en el DNA de las células cancerosas. De este modo, las células cancerosas se vuelven más susceptibles y pueden sufrir muerte celular programada o apoptosis. Sin embargo, en nuestro caso, los compuestos *cisPt*, C239 y C242 inducen un aumento en la expresión de PARP-1. Esta observación puede atribuirse al hecho de que, PARP-1 puede activarse en exceso, lo cual, debido a su mecanismo de actuación, conlleva un consumo elevado de los cofactores NAD^+ y ATP, cofactores esenciales para mantener la viabilidad celular. El agotamiento de estos cofactores puede resultar en la activación de procesos de necrosis (35,36). Dado que el *cisPt* tiene numerosos efectos secundarios, la regulación del PARP-1 por parte de este puede estar relacionada con procesos inflamatorios y necróticos que desencadenan estos efectos secundarios. Por lo tanto, el hecho de que los compuestos C239 y C242 también exacerben la expresión del PARP-1, indica que podrían desencadenar los mismos mecanismos de muerte celular que el *cisPt*, aunque esto debería de confirmarse con estudios adicionales.

7. CONCLUSIONES

1. Los compuestos de rutenio C112, C87 y C163 pueden ser candidatos a ser agentes antitumorales debido a su selectividad y actividad citotóxica frente a las células tumorales Caco-2.
2. Los compuestos de platino C227, C239 y C242 pueden ser candidatos a ser agentes antitumorales debido a su selectividad y actividad citotóxica frente a las células tumorales Caco-2.
3. Los compuestos C227, C239 y C242 podrían ejercer su actividad antitumoral incrementando la expresión de la caspasa iniciadora (caspasa-8) y reduciendo la expresión de la caspasa ejecutora (caspasa-3). Además, el compuesto C242 induce también una sobreexpresión de los genes Bcl-2, caspasa-9 y PARP-1. Sin embargo, a diferencia de los compuestos C227 y C239, el compuesto C242 no disminuye la expresión del gen *P53*.

8. CONCLUSIONS

1. Ruthenium compounds C112, C87, and C163 may be candidates as antitumor agents due to their selectivity and cytotoxic activity against Caco-2 tumor cells.
2. Platinum compounds C227, C239, and C242 may be candidates as antitumor agents due to their selectivity and cytotoxic activity against Caco-2 tumor cells.
3. Compounds C227, C239, and C242 could exercise their antitumor activity by increasing the expression of the initiator caspase (caspase-8) and reducing the expression of the executor caspase (caspase-3). Additionally, compound C242 also induces overexpression of the genes Bcl-2, caspase-9 and PARP-1. However, unlike compounds C227 and C239, compound C242 does not decrease the expression of the *P53* gene.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Silverthorn DU. Fisiología Humana, Un enfoque integrado. 4th ed. Panamericana. Vol. 1. 2008.
2. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin.* **2021**;71(3):209–249.
3. Global Cancer Observatory. [cited 2023 Jun 11]. Available from: <https://gco.iarc.fr/>
4. Pötten CS, Booth C, Mark Pritchard D. The intestinal epithelial stem cell: The mucosal governor. *Int J Exp Pathol.* **1997**;78(4):219–243.
5. Evan GI, Vousden KH. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature* **2001** May 17;411(6835):342–348.
6. Kaz AM, Brentnall TA. Genetic testing for colon cancer. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol.* **2006** Dec;3(12):670–679.
7. Potter JD. Colorectal Cancer: Molecules and Populations. *JNCI Journal of the National Cancer Institute.* **1999** Jun 2;91(11):916–932.
8. Powell SM, Zilz N, Beazer-Barclay Y, Bryan TM, Hamilton SR, Thibodeau SN, et al. APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis. *Nature.* **1992** Sep;359(6392):235–237.
9. Wiley-Blackwell. *ABC of colorectal Cancer.* 2nd ed. 2011.
10. Gottlieb TM, Oren M. p53 in growth control and neoplasia. *Biochimic et Biophysica Acta.* **1996** Jun;1287(2–3):77–102.
11. Li XL, Zhou J, Chen ZR, Chng WJ. P53 mutations in colorectal cancer - molecular pathogenesis and pharmacological reactivation. *World J Gastroenterol.* **2015** Jan 7;21(1):84–93.
12. Gustavsson B, Carlsson G, Machover D, Petrelli N, Roth A, Schmoll HJ, et al. A Review of the Evolution of Systemic Chemotherapy in the Management of Colorectal Cancer. *Clin Colorectal Cancer.* **2015** Mar;14(1):1–10.
13. Benedí J, Gómez del Río MÁ. Fármacos antineoplásicos (I). *Farmacia Profesional.* **2006** Feb 1;20(2):60–65.
14. Johnstone TC, Suntharalingam K, Lippard SJ. Third row transition metals for the treatment of cancer. *Philos Trans A Math Phys Eng Sci.* **2015** Mar 13;373(2037).
15. Zuba I, Zuba M, Piotrowski M, Pawlukoć A. Ruthenium as an important element in nuclear energy and cancer treatment. *Applied Radiation and Isotopes.* **2020** Aug 1;162:109-176.
16. Abid M, Shamsi F, Azam A. Ruthenium Complexes: An Emerging Ground to the Development of Metallopharmaceuticals for Cancer Therapy. *Mini Rev Med Chem.* **2016** Oct 1;16(10):772–786.
17. Fogh J, Wright WC, Loveless JD. Absence of HeLa Cell Contamination in 169 Cell Lines Derived From Human Tumors2. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute.* **1977** Feb;58(2):209–214.
18. Pinto, M.; Robine-Leon, S.; Appay, M. D.; Kedinger, M.; Triadou, N.; Dussaulx, E.; Lacroix, B.; Simon-Assmann, P.; Haffen, K.; Fogh, J.; Zweibaum, A., Enterocyte-like differentiation and polarization of the human-colon carcinoma cell-line Caco-2 in culture. *Biol Cell* **1983**, 47, 7.
19. Caro I, Boulenc X, Rousset M, Meunier V, Bourrié M, Julian B, et al. Characterisation of a newly isolated Caco-2 clone (TC-7), as a model of transport processes and biotransformation of drugs. *Int J Pharm.* **1995** Mar;116(2):147–158.
20. Grès M, Julian B, Bourrié M, Meunier V, Roques C, Berger M, et al. Correlation between oral drug absorption in humans, and apparent drug permeability in TC-7 cells, a human epithelial intestinal cell line: comparison with the parental Caco-2 cell line. *Pharm Res.* **1998**;15(5):726–733.

21. Da Violante G, Zerrouk N, Richard I, Provot G, Chaumeil JC, Arnaud P. Evaluation of the Cytotoxicity Effect of Dimethyl Sulfoxide (DMSO) on Caco2/TC7 Colon Tumor Cell Cultures. *Biol Pharm Bull.* **2002**;25(12):1600–1603.
22. Programa de control de calidad de ácidos nucleicos. *Banco Nacional de ADN Carlos III (Universidad de Salamanca)*. **2020** Oct;1-10.
23. Abás E, Bellés A, Rodríguez-Diéguez A, Laguna M, Grasa L. Selective cytotoxicity of cyclometalated gold(III) complexes on Caco-2 cells is mediated by G2/M cell cycle arrest. *Metallomics.* **2021** Jul 1;13(7).
24. Cevc G. Partition coefficient vs. binding constant: How best to assess molecular lipophilicity. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics.* **2015** May 1;92:204–215.
25. Sava G, Zorzet S, Giraldi T, Mestroni G, Zassinovich G. Antineoplastic activity and toxicity of an organometallic complex of ruthenium(II) in comparison with cis-PDD in mice bearing solid malignant neoplasms. *Eur J Cancer Clin Oncol.* **1984** Jun;20(6):841–847.
26. García-Fernández A, Díez J, Manteca Á, Sánchez J, García-Navas R, Sierra BG, et al. Antitumor activity of new hydridotris(pyrazolyl)borate ruthenium(II) complexes containing the phosphanes PTA and 1-CH₃-PTA. *Dalton Transactions.* **2010** Oct 19;39(42):10186–10196.
27. Alberts B, Johnson A, Lewis J., Raff M., Walter P. *Biología Molecular de la célula*. 4^o ed. Omega; 2004.
28. Adams JM. Ways of dying: multiple pathways to apoptosis. *Genes Dev.* **2003** Oct 15;17(20):2481–2495.
29. Pistritto G, Trisciuglio D, Ceci C, Garufi A, D’Orazi G. Apoptosis as anticancer mechanism: function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies. *Aging.* **2016** Mar 27;8(4):603–619.
30. Jordán J. Apoptosis: muerte celular programada. *Offarm.* **2003** Jun 1;22(6):100–106.
31. Fearon ER. Molecular Genetics of Colorectal Cancer. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease.* **2011** Feb 28;6(1):479–507.
32. Marques I, Teixeira AL, Ferreira M, Assis J, Lobo F, Maurício J, et al. Influence of survivin (BIRC5) and caspase-9 (CASP9) functional polymorphisms in renal cell carcinoma development: a study in a southern European population. *Mol Biol Rep.* **2013** Aug 5;40(8):4819–4826.
33. Kaklamanis L, Savage A, Whitehouse R, Doussis-Anagnostopoulou I, Biddolph S, Tsiotos P, et al. Bcl-2 protein expression: association with p53 and prognosis in colorectal cancer. *Br J Cancer.* **1998** Jun;77(11):1864–1869.
34. Pistritto G, Trisciuglio D, Ceci C, Alessia Garufi, D’Orazi G. Apoptosis as anticancer mechanism: function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies. *Aging.* **2016** Mar 27;8(4):603–619.
35. Murata MM, Kong X, Moncada E, Chen Y, Imamura H, Wang P, et al. NAD⁺ consumption by PARP1 in response to DNA damage triggers metabolic shift critical for damaged cell survival. *Mol Biol Cell.* **2019** Sep 15;30(20):2584–2597.
36. Shin HJ, Kwon HK, Lee JH, Gui X, Achek A, Kim JH, et al. Doxorubicin-induced necrosis is mediated by poly-(ADP-ribose) polymerase 1 (PARP1) but is independent of p53. *Scientific Reports.* **2015** Nov 2;5(1):1–17.

10.ANEXOS

Anexo I

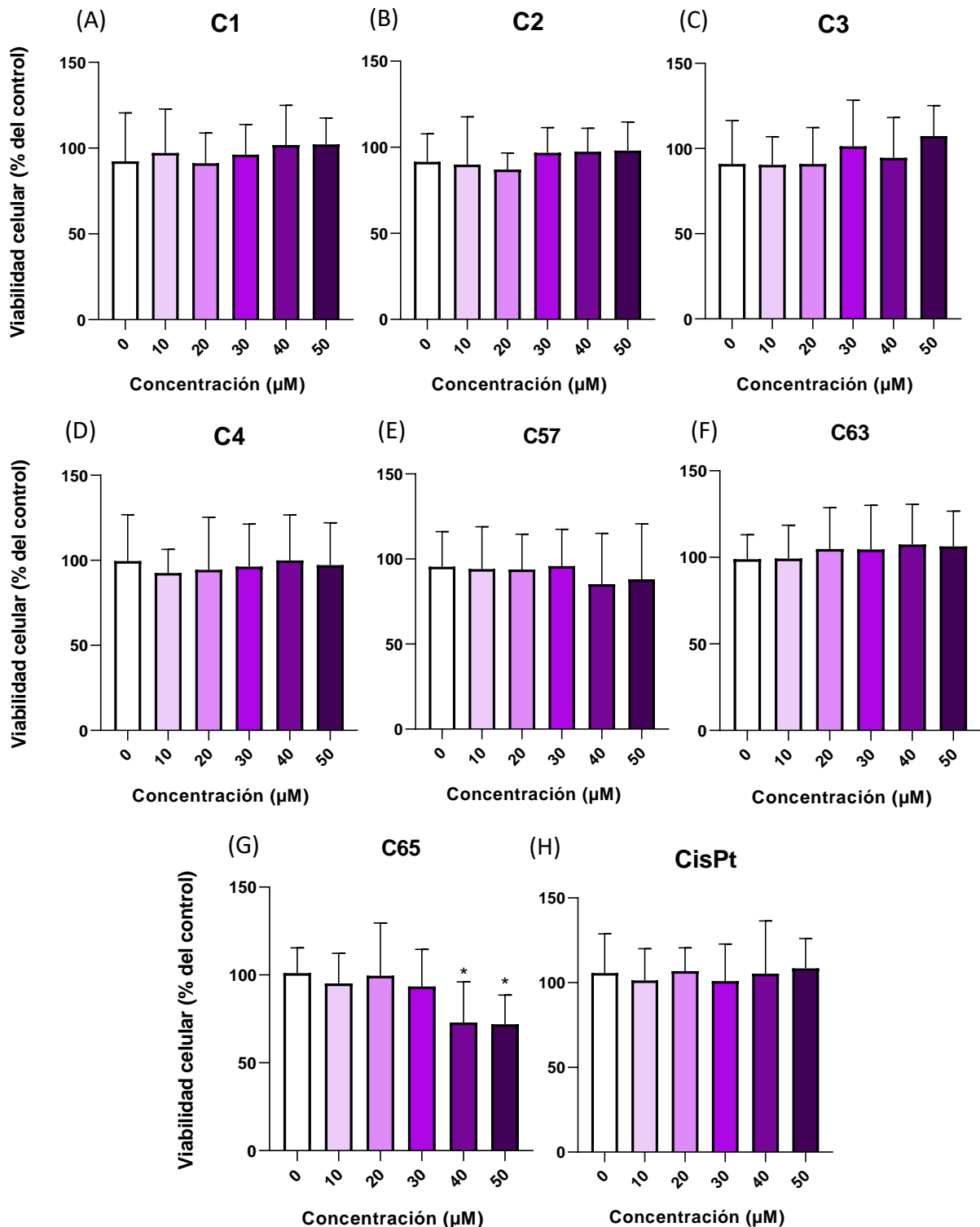


Figura S1. Gráficos del efecto dosis-respuesta de los compuestos derivados de rutenio (C1, C2, C3, C4, C57, C63 y C65) y del cisPt en células Caco-2 normales (15 días). Los datos se expresan como la media \pm desviación estándar ($n \geq 3$ experimentos). Se utilizó un test ANOVA de 1 vía y un post-análisis de comparación múltiple Bonferroni para comparar los efectos de las diferentes concentraciones del compuesto respecto del control (* $p < 0.05$).

Anexo II

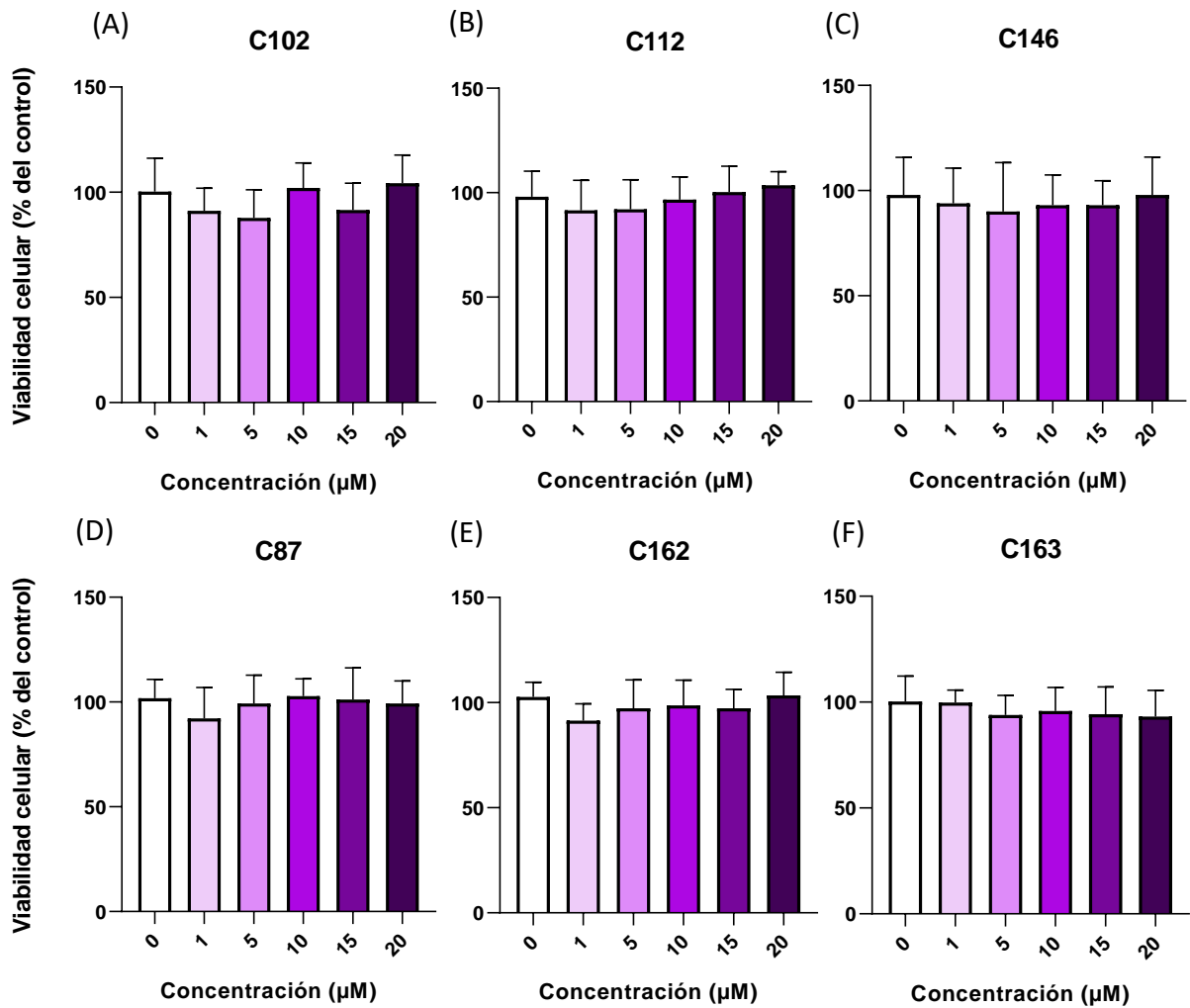


Figura S2. Gráficos del efecto dosis-respuesta de los compuestos derivados de rutenio (C102, C112, C146, C87, C162 y C163) en células Caco-2 normales (15 días). Los datos se expresan como la media \pm desviación estándar ($n \geq 4$ experimentos). Se utilizó un test ANOVA de 1 vía y un post-análisis de comparación múltiple Bonferroni para comparar los efectos de las diferentes concentraciones del compuesto respecto del control.

Anexo III

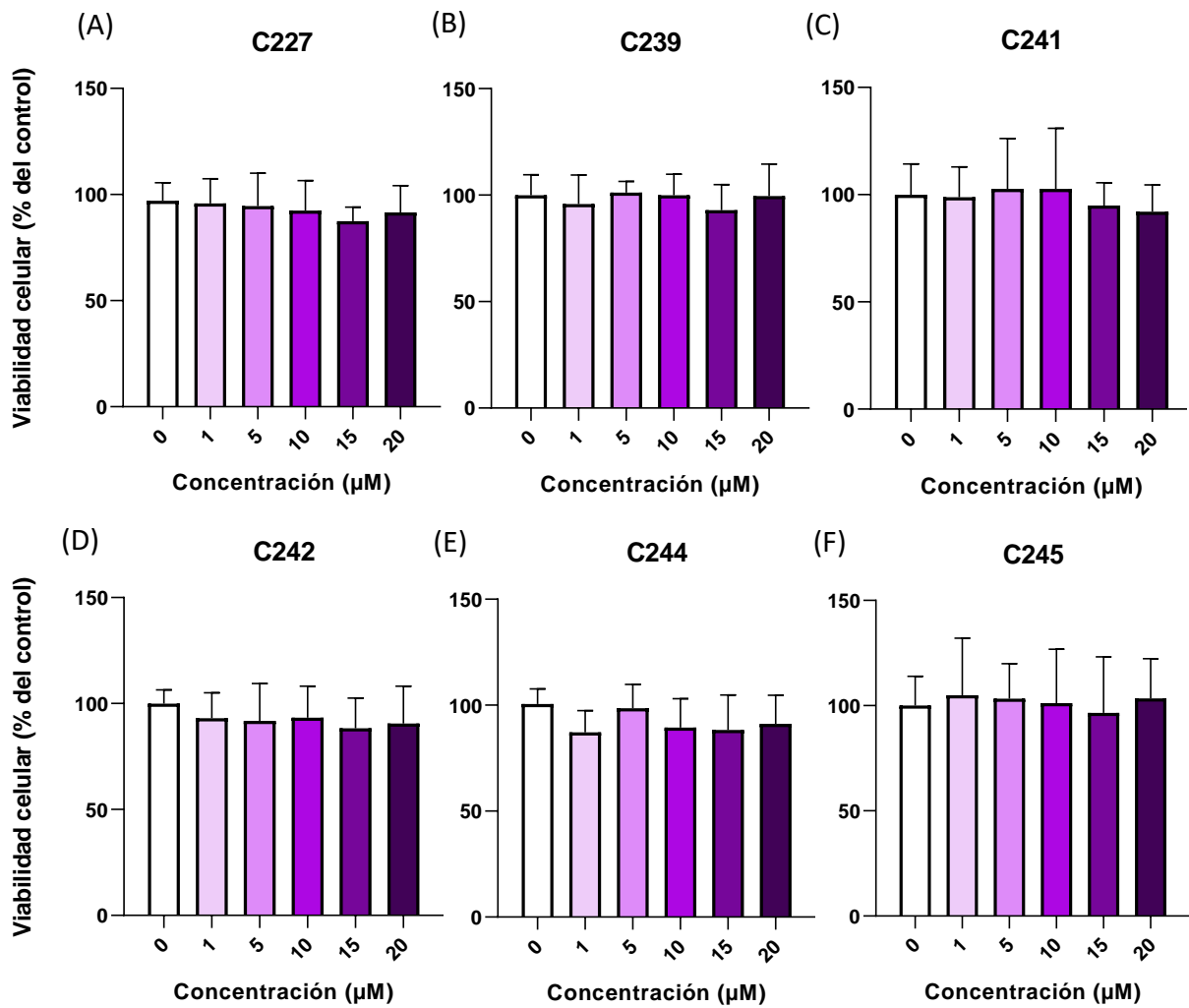


Figura S3. Gráficos del efecto dosis-respuesta de los compuestos derivados de platino (C227, C239, C241, C242, C244 y C245) en células Caco-2 normales (15 días). Los datos se expresan como la media \pm desviación estándar ($n \geq 4$ experimentos). Se utilizó un test ANOVA de 1 vía y un post-análisis de comparación múltiple Bonferroni para comparar los efectos de las diferentes concentraciones del compuesto respecto del control.