

Inés Mármol Peguero

Evaluación del efecto antitumoral  
de nuevos complejos de oro (I)  
como potenciales agentes frente al  
cáncer colorrecta.

Director/es

Cerrada Lamuela, Elena  
Rodríguez Yoldi, María Jesús

<http://zaguan.unizar.es/collection/Tesis>

© Universidad de Zaragoza  
Servicio de Publicaciones

ISSN 2254-7606

Tesis Doctoral

EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTITUMORAL DE  
NUEVOS COMPLEJOS DE ORO (I) COMO  
POTENCIALES AGENTES FRENTE AL CÁNCER  
COLORRECTA.

Autor

Inés Mármol Peguero

Director/es

Cerrada Lamuela, Elena  
Rodríguez Yoldi, María Jesús

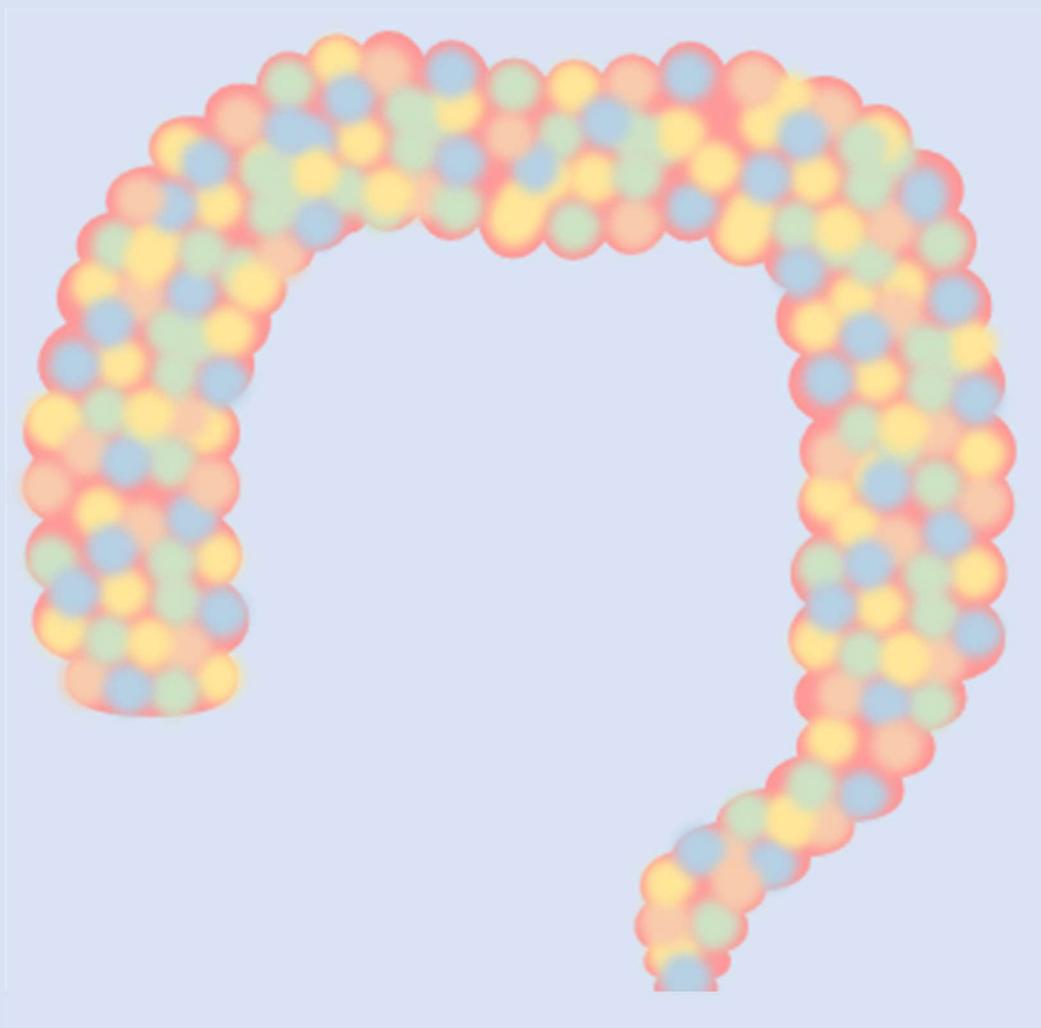
**UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA**  
**Escuela de Doctorado**

Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas y Biotecnológicas

2020



# **Evaluación del efecto antitumoral de nuevos complejos de oro(I) como potenciales agentes frente al cáncer colorrectal**



Inés Mármol Peguero

Doctorado en Ciencias Biomédicas y Biotecnológicas

Universidad de Zaragoza



**Universidad**  
Zaragoza

**Evaluación del efecto antitumoral de  
nuevos complejos de oro(I) como  
potenciales agentes frente al cáncer  
colorrectal**

**Inés Mármol Peguero**

Tesis doctoral

Doctorado en Ciencias Biomédicas y Biotecnológicas

**Directoras:**

Dra. Elena Cerrada Lamuela

Dra. M<sup>a</sup> Jesús Rodríguez Yoldi



**M<sup>a</sup> Jesús Rodríguez Yoldi**, Catedrática del departamento de Farmacología y Fisiología de la Universidad de Zaragoza

**Elena Cerrada Lamuela**, Profesora Titular del departamento de Química Inorgánica de la Universidad de Zaragoza

**CERTIFICAN:**

Que D<sup>a</sup> Inés Mármol Peguero , Graduada en Biotecnología por la Universidad de Zaragoza, ha realizado en los departamentos de Farmacología y Fisiología y de Química Inorgánica de la Universidad de Zaragoza, bajo nuestra dirección, el trabajo *“Evaluación del efecto antitumoral de nuevos complejos de oro(I) como potenciales agentes frente al cáncer colorrectal”*, que constituye su memoria para aspirar al grado de Doctor en Ciencias Biomédicas y Biotecnológicas reuniendo, a nuestro juicio, las condiciones necesarias para ser presentada y defendida ante el tribunal correspondiente.

En Zaragoza a 21 de Septiembre de 2020



Fdo. Dra. Elena Cerrada Lamuela



Fdo. Dra M<sup>a</sup> Jesús Rodríguez Yoldi



## AGRADECIMIENTOS

Gracias a mis directoras, las doctoras Elena Cerrada Lamuela y M<sup>a</sup> Jesús Rodríguez Yoldi, por darme la oportunidad de realizar la tesis y acogerme cuando solamente era una estudiante de prácticas. Gracias también a todos los miembros de los departamentos de Fisiología y Química Inorgánica que siempre tuvieron un consejo o una palabra amable para una atribulada estudiante de tesis. E infinitas gracias a los miembros del departamento de Bioquímica de la Facultad de Veterinaria, que ha sido como una segunda casa: Javi, Tania, Luis, Roberto, Cris y Jesús. Muchas, muchas, muchísimas gracias a todos. También al equipo e instalaciones del CIBA, donde se realizaron los ensayos de citometría de flujo.

Gracias también a Gaëlle Catanante y a Jean Louis Marty por acogerme en Perpignan y a Joana Santos y Carla Ramos por hacer lo propio, y encima dos veces, en la ciudad más bonita jamás construida, Viana do Castelo. *Merci beaucoup, obrigadísima.*

Tengo mucho que agradecer a las tres estupendas mujeres que considero mis mentoras. Sonia Gascón, que me adoptó cuando era una estudiante de prácticas escuchimizada y a la que le daba miedo tocar nada por si lo rompía; gracias por tu infinita paciencia durante esos primeros días, por enseñarme todo lo que sabías y por estar siempre ahí. El laboratorio nunca fue lo mismo desde que lo dejaste. Elena Atrián, que siempre fue toda amabilidad y dulzura, dispuesta a enseñar química a una biotecnóloga negada en la materia; infinitas gracias por acogerme en Toulouse, también, en mi primer congreso fuera de España. Y María Virumbrales, la fantástica y maravillosa María que no tenía ninguna necesidad de perder más de dos minutos con una estudiante de Máster de otro grupo de investigación, pero que se volcó en enseñarle todo lo que pudo, incluyendo a utilizar EndNote. María, no sé qué habría hecho sin tu bondad desinteresada en aquellos días. Eres una profesora estupenda y una persona increíble, de las que solo tienes la inmensa suerte de encontrar una vez cada mil años. A las tres, infinitas gracias.

Por supuesto, gracias a mis pobres y sufridos padres. No ha sido nada fácil convivir conmigo durante estos años, con todos los lloros y la frustración cada vez que me bloqueaba con algún experimento y no era capaz de interpretar los datos. La infinita paciencia con la que me habéis escuchado dando vueltas una y otra vez a los resultados durante horas para ver si hablando en voz alta podía llegar a alguna conclusión lógica. Gracias por no dejarme tirar la toalla, por estar ahí para sostenerme cuando me tambaleaba y por sentaros a mi lado cuando no estaba lista para levantarme del suelo después de una caída.

La edición 2020 de FameLab España se lleva una mención de última hora por haberme metido el gusanillo de la divulgación, haberme ayudado a superar mis problemas para hablar en público (más o menos) y por haberme permitido conocer a los Famelabers.

Hay una cita de mi libro de cabecera que describe a la perfección a mis personas favoritas: “Eran unos amigos excelentes. Esa clase de amigos con la que todo el mundo sueña, pero que nadie merece. Y yo menos que nadie”. Esta tesis es de todos y cada uno de vosotros, porque sin vuestra amistad a lo largo de todos estos (duros) años no habría llegado de una pieza hasta aquí. Vamos por partes:

Cris, a ti te considero mitad mentora, mitad amiga (y una de las mejores, debo añadir). Si no me hubieses dicho aquel día de primavera, mientras comíamos en el campus, que me fuese contigo a hacer unas prácticas de verano, esta tesis no existiría. Tú lo empezaste todo, con tu voluntad de hierro y tu mente brillante. Y, cuando te marchaste, seguiste ahí para mí. Siempre. Te valoro mucho como científica, pero incluso más como amiga. Gracias, Cris, por tu amistad.

Raquel, a pocas personas admiro más que a ti. Eres la persona más fuerte que he conocido, siempre tirando hacia adelante con determinación por muy difícil que se ponga la situación. Tu honestidad, tu generosidad y tu alegría son impagables. Eres una inspiración, Rachel.

Laura, ni aunque viviese un millón de vidas podría agradecerte que acogieses a este bicho raro durante el primer año de carrera y lo sacases de paseo a que le diese el aire de cuando en cuando. Gracias por los libros, las series, las películas, las *jam sessions* de (¿?) jazz, las fotos, los viajes, los lloros, las carcajadas, la paciencia. No he conocido a nadie que se merezca tu apellido más que tú.

JF, mi querido JF. El año 2013 habría sido un horror si no nos hubieras aparecido por sorpresa en mi vida el mes de marzo. Gracias por tu apoyo incondicional pase lo que pase, por estar siempre ahí para mí. Gracias por los viajes en coche cantando a grito pelado. Gracias por entenderme. Gracias por quererme. Te adoro.

La única e incomparable Leticia. Puedo decir sin equivocarme que eres la persona que mejor me conoce, y que eres la guardiana de mi cordura. No sé qué he hecho para merecerme tu amistad, pero la valoro más que nada. Eres una persona con una fuerza excepcional, ojalá tenerte a mi lado durante muchos años más. Gracias, Let.

Y, por supuesto, nos falta uno. Matt tiene a Foggy. Jax tiene a Chibs. Inés tiene a Compi. Esta tesis es en un 25% propiedad única y exclusiva de Javier Quero. Él ya sabe por qué.

A todos, muchas gracias.

## FINANCIACIÓN

Este trabajo ha sido financiado a través de los siguientes organismos y proyectos:

- *“REDVALUE: Alianza tecnológica para completar el ciclo agroindustrial y forestal”*. Financiado con fondos FEDER. Año 2016. SOE1/P1/E0123 (convocatoria SUDOE INTERREG IVB de 2015).
- *“APLICACIONES DE COMPUESTOS DE ORO EN FOTOFÍSICA, MEDICINA Y CATÁLISIS”*. Financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad. Año 2016. CTQ2016-75816-C2-1-P
- *“BÚSQUEDA DE LOS MECANISMOS MOLECULARES DE LA ACCIÓN DEL ESCUALENO IN VITRO E IN VIVO”*. Financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad. Año 2016. SAF2016-75441-R
- *“METALOFÁRMACOS MULTIFUNCIONALES PARA DIAGNOSIS Y TERAPIA”*. Financiado por Red Multimetdrugs. Año 2018. RED2018-102471-T.
- *“Dieta mediterránea y su potencial nutracéutico”*. Financiado por Gobierno de Aragón. Año 2017. B16\_R17.
- *“Química de oro y plata”*. Financiado por Gobierno de Aragón. Año 2017. E07\_17R



A mis padres.  
Y a Ina, que fue la mejor persona de cuantas he conocido, y eso que era un perro.

*One can both be intelligent and accept the intelligence of those who disagree with you.*  
De *El camino de los reyes*, de Brandon Sanderson.



# ÍNDICE

Resumen/Abstract.....	13
Abreviaciones.....	19
INTRODUCCIÓN.....	21
Transformación tumoral. Aparición y desarrollo del cáncer colorrectal.....	23
Muerte celular. Apoptosis, necroptosis y autofagia.....	33
Quimioterapia. Descubrimiento de las propiedades antitumorales del cisplatino.....	43
Búsqueda de soluciones a las limitaciones del cisplatino.....	51
Uso del oro en medicina. Descubrimiento de las propiedades antitumorales del auranofin.....	59
Farmacocinética. La albúmina sérica como transportador de fármacos.....	69
Objetivos.....	73
Referencias.....	75
MATERIAL AND METHODS.....	93
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	113
Capítulo 1.....	115
Referencias.....	157
Capítulo 2.....	167
Referencias.....	190
Capítulo 3.....	195
Fosfino complejos.....	202
Carbeno complejos.....	220
Referencias.....	230
Capítulo 4.....	243
Referencias.....	269
CONCLUSIONES/CONCLUSIONS.....	277



## RESUMEN

Dado el constante crecimiento del número de casos de cáncer de colon a nivel mundial, es necesario el desarrollo de nuevas terapias más seguras y eficaces para mejorar la calidad y la esperanza de vida de los pacientes de este trastorno. Los derivados de oro(I) se han postulado como una interesante alternativa a los actuales fármacos de platino, puesto que sus dianas terapéuticas son, en su mayoría, proteínas sobreexpresadas en las células tumorales. Esto los convierte en fármacos presumiblemente más seguros, al tiempo que mantienen la eficacia terapéutica de sus predecesores de platino.

La presente Tesis Doctoral se ha centrado en el estudio de nuevos complejos de oro(I) frente a un modelo celular de cáncer de colon, la línea Caco-2. Se ha profundizado en la influencia de los ligandos de coordinación en el efecto biológico de la molécula resultante, llevando a cabo para ello diversos ensayos entre los que se encuentran el estudio de las poblaciones apoptóticas, la medida de los niveles de especies reactivas de oxígeno y el análisis de la actividad de diversas enzimas y proteínas, entre otros. Asimismo, se ha desarrollado una nueva formulación compuesta por un alquino derivado de oro(I) y un extracto vegetal, se ha evaluado la capacidad antibacteriana de una serie de derivados de oro(I) siguiendo la filosofía del *drug repurposing* y se ha estudiado la influencia del centro metálico en cuanto a la acción biológica del complejo frente al cáncer de colon mediante la sustitución del oro(I) por plata(I). La memoria se ha estructurado en cuatro capítulos que se detallan a continuación.

En el primer capítulo, se ha comparado el efecto antitumoral frente a la línea Caco-2 de tres alquino derivados de oro(I) coordinados con fosfinas solubles en agua:  $[Au(C\equiv CPh)(PTA)]$ ,  $[Au(C\equiv CPh)(DAPTA)]$  y  $[Au(C\equiv C-2-NC_5H_4)(PTA)]$ . Se observó que cambios aparentemente mínimos en el diseño de la molécula pueden dar lugar a grandes diferencias en cuanto al mecanismo de acción causado por un fármaco antitumoral. Así, el complejo  $[Au(C\equiv CPh)(PTA)]$  inhibe a la enzima redox tiorredoxina reductasa y causa un incremento en los niveles de especies reactivas de oxígeno, produciendo la muerte de las células tumorales por apoptosis intrínseca. Por su parte, el complejo  $[Au(C\equiv C-2-NC_5H_4)(PTA)]$  no muestra afinidad por la tiorredoxina reductasa e induce necroptosis en lugar de apoptosis. Se cree que este cambio en el mecanismo de acción podría estar motivado por la formación de agregados de varios complejos en la mitocondria, lo que provocaría un gran aumento en los niveles de especies reactivas de oxígeno, causando como consecuencia la activación de la proteína RIP-1, responsable de la necroptosis.

En el segundo capítulo, se estudió el efecto combinado del complejo  $[Au(C\equiv C-2-NC_5H_4)(PTA)]$  y un extracto de polifenoles ácidos del fruto de la *Rosa canina* sobre la línea Caco-2. La interacción entre ambos fármacos resultó ser de tipo aditivo, de modo que suponía un incremento de la actividad antitumoral respecto al efecto de cada

componente por separado. Dicha combinación produce un bloqueo de la necroptosis causada por el complejo metálico; en su lugar, desencadena la muerte por apoptosis, presumiblemente debido a un bloqueo del flujo autofágico provocado por la alcalinización de los lisosomas, que parece estar causado a su vez por una disrupción de la función normal mitocondrial. Dado que estos efectos no se han descrito al tratar el cultivo con los componentes aislados de este nuevo cóctel, se puede concluir que los resultados observados parecen ser debidos al efecto conjunto de ambos.

En el tercer capítulo, se estudió el efecto de la unidad 3-hidroxi flavona como ligando de coordinación en cuatro series de alquino derivados de oro(I):  $[\text{Au}(\text{L2a-d})\text{PPh}_3]$ ,  $[\text{Au}(\text{L2a-d})\text{PTA}]$ ,  $[\text{Au}(\text{L2a-d})(\text{IMe})]$  y  $[\text{Au}(\text{L2a-d})(\text{IPr})]$ . Mientras que los fosfino complejos mostraron un interesante efecto antitumoral, así como una buena selectividad, los carbeno complejos fueron descartados como potenciales agentes quimioterapéuticos por su escaso potencial antitumoral en comparación con otros complejos de oro(I). No obstante, se observó que algunos de ellos poseían un considerable efecto antibacteriano, al mostrar una capacidad antibacteriana moderada frente a especies Gram negativas y Gram positivas.

Por su parte, los fosfino complejos fueron ensayados no solo frente a la línea Caco-2, sino que se incluyeron dos modelos tumorales adicionales (líneas MCF-7 y HepG2, adenocarcinoma de mama y hepatocarcinoma respectivamente) para determinar una posible selectividad frente a cáncer colorrectal, observándose una mejor respuesta frente al modelo de cáncer colorrectal. Un estudio en profundidad del mecanismo de acción de los complejos más activos  $[\text{Au}(\text{L2b})\text{PPh}_3]$  y  $[\text{Au}(\text{L2c})\text{PTA}]$ , reveló que el complejo  $[\text{Au}(\text{L2b})\text{PPh}_3]$  es capaz de inhibir a las enzimas tioredoxina reductasa y ciclooxigenasa 2, causando una ruptura del equilibrio redox y la muerte por apoptosis, mientras que el complejo  $[\text{Au}(\text{L2c})\text{PTA}]$  bloquea la acción de las enzimas tioredoxina reductasa y ciclooxigenasa 1, siendo también capaz de inducir la muerte por apoptosis; no obstante, su efecto pro-apoptótico es más reducido que el del complejo  $[\text{Au}(\text{L2b})\text{PPh}_3]$  durante las primeras 24h de incubación, lo que podría estar mediado por un aumento de la autofagia citoprotectora en respuesta al tratamiento. En cualquier caso, ambos derivados se han revelado como complejos multidiana y aparentemente selectivos frente al cáncer colorrectal, lo que sería de gran interés de cara a sustituir al oxaliplatino.

En el cuarto capítulo, se han ensayado una serie de derivados de oro(I) y plata(I) coordinados con ligandos derivados de la 2-anilino piridina. Al estudiar en profundidad el efecto terapéutico de los complejos  $[\text{Au}(\text{L1})(\text{PPh}_3)](\text{TfO})$  y  $[\text{Ag}(\text{TfO})(\text{L1})(\text{PPh}_3)]$ , se observó que no compartían dianas moleculares, al menos al ser ensayados en una concentración equivalente a sus  $\text{IC}_{50}$ . El derivado de oro  $[\text{Au}(\text{L1})(\text{PPh}_3)](\text{TfO})$  resultó ser capaz de inhibir a la enzima tioredoxina reductasa y a la subunidad 20S del proteasoma, de modo que se trata de un complejo multidiana, mientras que el

mecanismo de acción del complejo de plata  $[Ag(TfO)(L1)(PPh_3)]$  no pudo ser identificado, si bien los datos obtenidos sugieren que podría causar un fallo mitocondrial que daría lugar a una activación de la apoptosis, siendo este proceso independiente del nivel de especies reactivas de oxígeno. Por su parte, el tratamiento de las células Caco-2 con el complejo  $[Au(L1)(PPh_3)](TfO)$  tuvo como consecuencia un aumento en la activación de la caspasa 8, lo que sugiere que los derivados de oro(I) podrían activar no solo la vía intrínseca de la apoptosis, sino también la extrínseca. La ausencia de un mecanismo de acción compartido entre los derivados de oro(I) y plata(I) podría indicar que no existirían resistencias cruzadas entre ambos. Por último, en este caso concreto se concluye que el complejo de oro  $[Au(L1)(PPh_3)](TfO)$  podría ser de mayor interés que el análogo de plata  $[Ag(TfO)(L1)(PPh_3)]$  frente al tratamiento del cáncer colorrectal, dado que, aunque muestran valores comparables en cuanto a su eficacia, el derivado de oro(I) parece mostrar una mayor selectividad que su análogo de plata(I).

En definitiva, los datos obtenidos sugieren que los derivados de oro(I) ensayados podrían tener un interesante futuro como agentes quimioterapéuticos frente al cáncer de colon, ya que se trata de complejos más selectivos que los fármacos de referencia utilizados, siendo también su efectividad mayor que la de estos en algunos casos.

## ABSTRACT

Given the incessant growth in colorectal cancer cases worldwide, the development of novel, safer and more effective therapeutic strategies is needed to improve both quality-of-life and life expectancy of patients. Gold(I) derivatives have arisen as a promising alternative to current platinum-containing drugs due to their affinity for proteins that are overexpressed on tumor cells. Therefore, this kind of drugs are supposed to be safer but to maintain the therapeutic efficacy of platinum-based metallodrugs.

This Thesis has been focused on the evaluation of novel gold(I) complexes towards a model of colorectal cancer, Caco-2 cell line. The influence of coordination ligands on the biological effect of the resultant molecule has been in depth studied with a variety of assays that includes analysis of apoptotic populations, measurement of reactive oxygen species levels and analysis of certain enzymatic and proteic activities among others. Moreover, a novel drug combination containing an alkynyl gold(I) derivative and plant extracts has been developed, the antibacterial activity of a series of gold(I) derivatives has been evaluated according to drug repurposing philosophy and the replacement of gold(I) by silver(I) in regards to anti-colorectal cancer activity has been studied. Text has been structured on four chapters detailed below.

On the first chapter, the antitumor effect of three alkynyl gold(I) derivatives coordinated with water soluble phosphines has been evaluated on Caco-2 cell line:  $[\text{Au}(\text{C}\equiv\text{CPh})(\text{PTA})]$  (**1a**),  $[\text{Au}(\text{C}\equiv\text{CPh})(\text{DAPTA})]$  (**1b**) y  $[\text{Au}(\text{C}\equiv\text{C-2-NC}_5\text{H}_4)(\text{PTA})]$  (**2a**). It was observed that apparently minimal changes on molecule design might lead to great differences regarding to the mechanism of action of an antitumor drug. Complex  $[\text{Au}(\text{C}\equiv\text{CPh})(\text{PTA})]$  inhibited redox enzyme thioredoxin reductase and induced an increase in reactive oxygen species levels, thus leading to intrinsic apoptotic cancer cells death. On the other hand, complex  $[\text{Au}(\text{C}\equiv\text{C-2-NC}_5\text{H}_4)(\text{PTA})]$  did not show any affinity for this enzyme and triggered necroptosis instead of apoptosis. This switch on the mechanism of action might be explained by complex aggregation on mitochondria, which would lead to a high increase in reactive oxygen species levels that triggered protein RIP-1 activation, one of the main responsables of necroptosis.

On the second chapter, the combined effect of complex  $[\text{Au}(\text{C}\equiv\text{C-2-NC}_5\text{H}_4)(\text{PTA})]$  (**2a**) and acidic polyphenols extract from the rosehip of *Rosa canina* on Caco-2 cell line was studied. The additive pharmacological interaction was responsible of an increase in antitumor activity in comparison to the effect of each agent individually. Drug combination induced a blockage of necroptosis triggered by the metallodrug; instead, drug combination lead to apoptotic cell death, probably due to an impairment of the autophagic flux triggered by lysosomes alkalization, which was caused by mitochondrial normal function disruption, was observed. Since the observed effects were not noticed

upon cell culture treatment with the single agents, the obtained results might be a direct consequence of the concomitant addition of both of them.

On the third chapter, the influence of the molecule derived from 3-hydroxyflavone unit as ligand in four series of alkynyl gold(I) derivatives, namely  $[\text{Au}(\text{L2a-d})\text{PPh}_3]$ ,  $[\text{Au}(\text{L2a-d})\text{PTA}]$ ,  $[\text{Au}(\text{L2a-d})(\text{IMe})]$  and  $[\text{Au}(\text{L2a-d})(\text{IPr})]$ , was evaluated. Whereas the phosphine derivatives showed a promising antitumor effect as well as adequate selectivity as will be detailed below, carbene derivatives were discarded as potential chemotherapeutic agents due to their low antitumor potential compared with the phosphine analogues. However, some of them showed certain antibacterial effect towards both Gram positive and Gram negative strains.

The antitumor potential of the phosphine derivatives was evaluated on Caco-2 cell line and on two additional tumor models (MCF-7 and HepG2 cell lines, breast adenocarcinoma and hepatocarcinoma respectively) to analyze a likely selectivity toward colorectal cancer, and the colorectal cancer model showed the best response to treatment. An in-deep study of the mechanism of action of the most active complexes,  $[\text{Au}(\text{L2b})\text{PPh}_3]$  and  $[\text{Au}(\text{L2c})\text{PTA}]$ , revealed that complex  $[\text{Au}(\text{L2b})\text{PPh}_3]$  inhibits both thioredoxin reductase and cyclooxygenase-2 enzymes, leading to a redox balance disruption and apoptosis, whereas complex  $[\text{Au}(\text{L2c})\text{PTA}]$  was able to block redox enzymes glutathione reductase and thioredoxin reductase activities as well as cyclooxygenase-1, triggering apoptotic cell death; however, its pro-apoptotic effect seems to be lower than the observed for  $[\text{Au}(\text{L2b})\text{PPh}_3]$  on the first 24h of incubation, which might be a consequence of an increase in cytoprotective autophagy as a response to treatment. Nevertheless, both derivatives are considered as multitarget complexes and apparently selective toward colorectal cancer, which might be of great interest in order to replace oxaliplatin.

On the fourth chapter, a series of gold(I) and silver(I) derivatives with ligands derived from 2-anilino-pyridine were analyzed. After in-deep analyzing the biological action of complexes  $[\text{Au}(\text{L1})(\text{PPh}_3)](\text{TfO})$  and  $[\text{Ag}(\text{TfO})(\text{L1})(\text{PPh}_3)]$ , where L1 consists of an additional pyridine moiety, it was observed that they did not share molecular targets, at least when incubated at their  $\text{IC}_{50}$  values. Gold derivative  $[\text{Au}(\text{L1})(\text{PPh}_3)](\text{TfO})$  was found to be able of inhibiting redox enzyme thioredoxin reductase and 20S proteasome, thus being a multitarget complex, whereas the mechanism of action of silver complex  $[\text{Ag}(\text{TfO})(\text{L1})(\text{PPh}_3)]$  remains unclear, although the obtained data suggest that mitochondrial disruption might lead to ROS-independent apoptosis. On the other hand treatment of Caco-2 cells with complex  $[\text{Au}(\text{L1})(\text{PPh}_3)](\text{TfO})$  resulted in an increase of caspase 8 activation, which suggests that gold(I) derivatives might be able to trigger extrinsic apoptosis as well as the intrinsic pathway as has been widely reported previously. The lack of a shared mechanism of action between gold(I) and silver(I) derivatives might be indicative of an absence of cross-resistance among them. Lastly, in

this specific case, the gold complex  $[\text{Au}(\text{L1})(\text{PPh}_3)](\text{TfO})$  might be of greater interest than its silver analogue  $[\text{Ag}(\text{TfO})(\text{L1})(\text{PPh}_3)]$  for colorectal cancer treatment, since the gold(I) derivative shows higher selectivity than its silver(I) analogue despite of displaying comparable efficacy.

In summary, collected data suggests that the tested gold(I) derivatives might display a promising future as chemotherapeutic agents for colorectal cancer therapy, given their higher selectivity in comparison to reference drugs and even their greater efficacy in some cases.

## ABREVIACIONES

$\Delta\psi$ : potencial de membrana mitocondrial

AECC: Asociación Española Contra el Cáncer

AP: *Acidic Polyphenol*; polifenoles ácidos

Apaf-1: *Apoptosis Protease-Activating Factor 1*; factor inductor de apoptosis 1

Auranofin: 2,3,4,6-tetra-6-acetil-1-tio- $\beta$ -D-glucopiranosato-S-trifenilfosfina oro(I)

BSA: *Bovin Serum Albumin*; albúmina sérica bovina

CIMP: *CpG Island Methylator Phenotype*; fenotipo metilador de las islas CpG

CIN: *Chromosomal instability*; inestabilidad cromosómica

Cisplatino: *cis*-diaminodicloroplatino(II)

COX: ciclooxigenasa 2

CQ: cloroquina

CRC: *Colorectal Cancer*; cáncer colorrectal

DAPTA: 3,7-diacetil-1,3,7-triaza-5-fosfabiciclo[3.3.1]nonano

DC: *Drug Combination*; cóctel farmacológico

DHFR: dihidrofolato reductasa

DMARDs: *Disease-Modifying Antirheumatic Drugs*

DMSO: dimetilsulfóxido

DTNB: 5,5-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid)

FBS: *Fetal Bovine Serum*

FDA: *Food and Drug Administration*

FITC: *Fluorescein isotiocyanate*

GC: *Gold Complex*; complejo de oro

GR: glutatión reductasa

H<sub>2</sub>DCF-DA: 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate

HSA: *Human Serum Albumin*; albúmina sérica

IAPs: *Inhibitory Apoptosis Proteins*; proteínas inhibitorias de la apoptosis

IMe: 1,3-dimetilimidazol-2-ilideno

IPr: 1,3-bis(2,6-di-*i*-propilfenil)imidazol-2-ilideno

LADME: Liberación, Absorción, Distribución, Metabolismo y Excreción

MLKL: *Mixed Lineage Kinase Domain-Like*

MOMP: *Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization*; permeabilización de la membrana externa mitocondrial

MSI: *Microsatellite instability*; inestabilidad de los microsatélites

MTT: 3-(4,5-dimethyl-2-thiazoyl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide

NAC: N-acetil-cisteína

Nec-1: necrostatina-1

NF- $\kappa$ B: *Nuclear Factor Kappa-Light-Chain-Enhancer of Activated B Cells*

NP: *Neutral Polyphenols*; polifenoles neutros

PARP-1: poli ADP ribosa polimerasa 1

PBS: *Phosphate Buffered Saline*

PTA: 1,3,5-triaza-7-fosfaadamantano

RIP-1: *Receptor Interacting Protein 1*

ROS: *Reactive Oxygen Species*; especies reactivas de oxígeno

SEOM: Sociedad Española de Oncología Médica

SI: *Selectivity Index*; índice de selectividad

SRB: *Sulforhodamine B*

TE: *Total Extract*; extracto total

TNF: *Tumor Necrosis Factor*; factor de necrosis tumoral

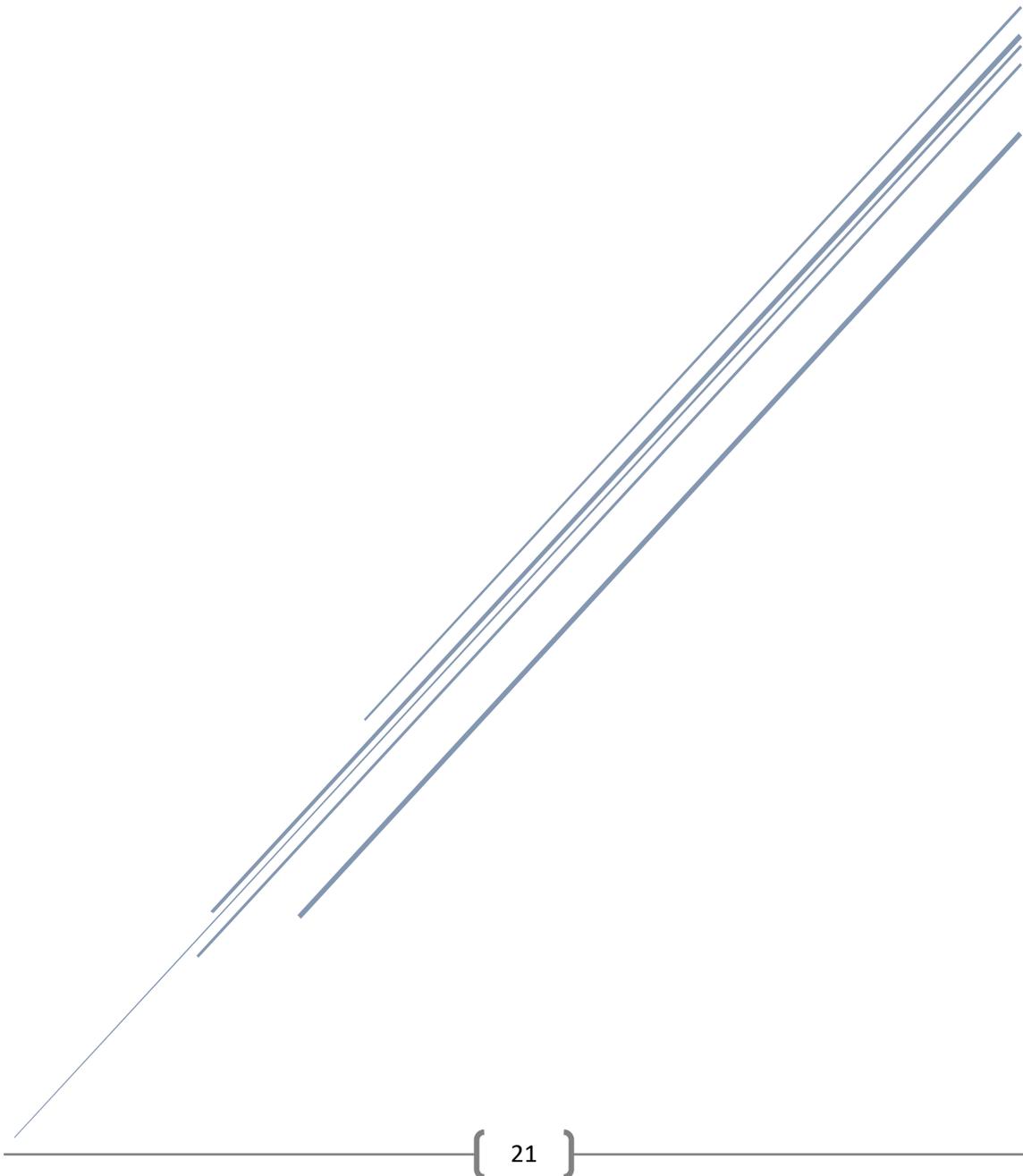
TNFR1: *TNF Receptor 1*

TrxR: tiorredoxina reductasa

VEGF: *Vascular Endothelial Growth Factor*; factor de crecimiento del endotelio vascular

# INTRODUCCIÓN AL TRATAMIENTO DEL CÁNCER COLORRECTAL

- *Int J Mol Sci.* **2017**; 18(1):197
- Mármol I. *et al.* **2018**. “Modifiable and non-modifiable risk factors of colorectal cancer” en *Advances in Health and Disease* vol 7., cap. 2.
- *Cancers (Basel).* **2019**; 11(6):780
- *Food&Function.* **2020**; 11(4):2805-2825





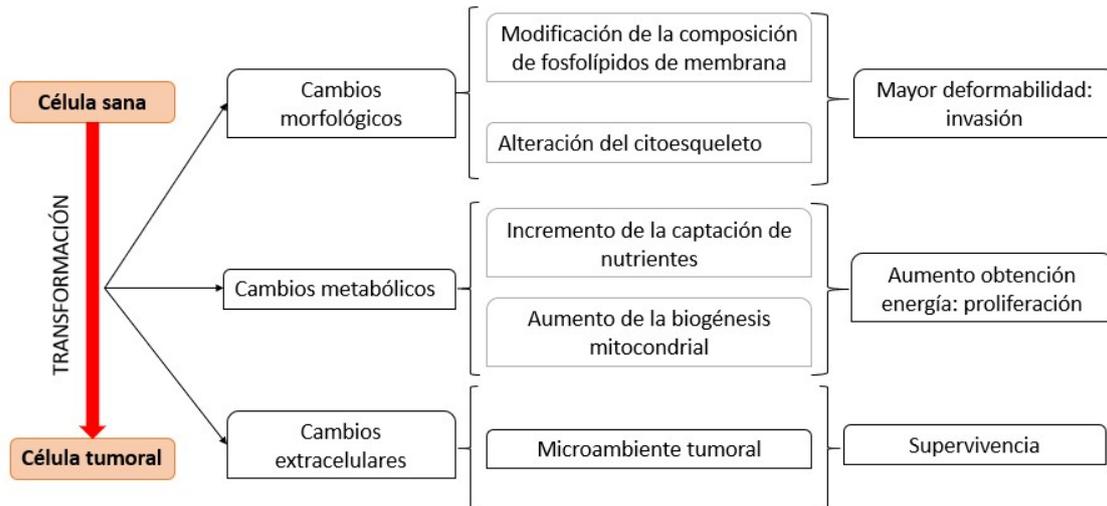
## 1.1. TRANSFORMACIÓN TUMORAL. APARICIÓN Y DESARROLLO DEL CÁNCER COLORRECTAL

El **cáncer** es uno de los mayores retos de la medicina actual. Esta seria amenaza a la salud pública no solo posee una alta tasa de muerte asociada, sino que, en muchos casos, los supervivientes sufren una considerable merma de su calidad y esperanza de vida. Es tal su gravedad que la palabra cáncer se utiliza en el lenguaje popular como sinónimo de cualquier evento o suceso pernicioso, de acuerdo con la definición de la Real Academia de la Lengua Española:

*“Cáncer. Nombre masculino. Definición 4: Proliferación en el seno de un grupo social de situaciones o hechos destructivos. Ejemplo: La droga es el cáncer de nuestra sociedad<sup>1</sup>”.*

La Organización Mundial de la Salud proporciona una definición de carácter más clínico, de acuerdo con la cual el cáncer es “un proceso de crecimiento y diseminación incontrolados de células<sup>2</sup>”. Así pues, un tumor se origina cuando un grupo de células pierde su fenotipo diferenciado y especializado, retornando a un estadio casi embrionario en el que poseen la capacidad de proliferar con mucha rapidez. Cuando un tumor se encuentra localizado en una zona concreta a la que no causa daños, se denomina benigno. No obstante, si invade el tejido circundante y altera su funcionamiento normal, pasa a considerarse maligno. Si, además, las células tumorales son capaces de migrar a zonas alejadas de aquella en la que se generaron y colonizar otros tejidos, se habla de **metástasis**<sup>3</sup>.

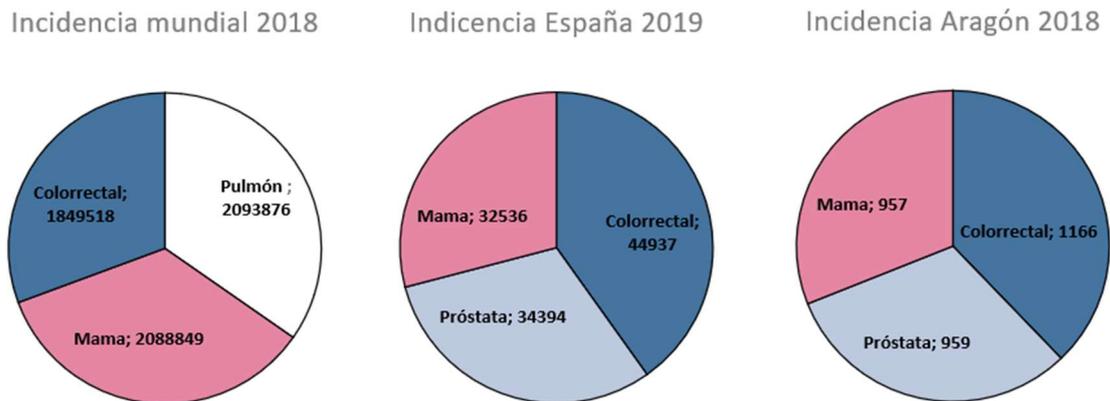
El proceso según el cual una célula sana pasa a ser una célula cancerígena se define como transformación. La transformación está causada por alteraciones genéticas, bien hereditarias bien adquiridas, que afectan a dos clases de genes presentes en el ADN nuclear: los genes supresores de tumores y los proto-oncogenes. Las mutaciones que alteran los genes supresores de tumores harán que pierdan su función natural, mientras que los proto-oncogenes pasarán a un estado activado. En cuanto a los tipos de alteraciones genéticas que pueden causar estos efectos, las más frecuentes son amplificaciones, translocaciones y mutaciones puntuales. En cualquier caso, el resultado será siempre el mismo: la célula va a perder su sensibilidad a la muerte celular, de la que se hablará en detalle en el apartado 1.2, y aumentará su capacidad proliferativa. Esto es debido a que las proteínas que codifican tanto genes supresores de tumores como oncogenes suelen tener funciones relacionadas con la regulación del crecimiento<sup>4,5</sup>. La transformación celular implica toda una serie de alteraciones para adaptar a las células a sus nuevas necesidades<sup>3,6-8</sup>, según se recoge en la Figura 1. Conocer en detalle estas diferencias entre células sanas y tumorales es una de las claves del diseño de fármacos antitumorales, lo que se discutirá en profundidad más adelante.



**Figura 1.** Esquematación de los principales cambios que se producen durante la transformación tumoral. 1) Cambios morfológicos: la deformabilidad de la membrana plasmática aumenta a raíz de alteraciones en su composición lipídica, así como de la organización de las proteínas que conforman el citoesqueleto, aumentando la capacidad invasiva de la célula. 2) Cambios metabólicos: se estimula la captación de nutrientes para solventar las necesidades energéticas. Además, se induce la formación de nuevas mitocondrias. 3) Cambios extracelulares: el microambiente tumoral aparece por la interacción de la célula cancerosa con las células sanas adyacentes, así como por la modificación de la composición de la matriz extracelular; tiene como misión favorecer el crecimiento de la masa tumoral.

De acuerdo con los datos recogidos por la Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM) y GLOBOCAN, en el año 2018 se diagnosticaron en torno a 18,1 millones de cánceres en todo el mundo, siendo los más frecuentes los de pulmón, mama y colorrectal en ese orden. Se estima que en nuestro país se diagnosticaron durante 2019 alrededor de 280.000 casos, estando el cáncer de colon en primer lugar, seguido por próstata y mama. Existen diferencias entre sexos, ya que los varones sufren con mayor frecuencia cáncer de pulmón, colorrectal y de vejiga, mientras que las mujeres se ven más afectadas principalmente por el cáncer de mama y el colorrectal. También la edad se considera un factor de riesgo, puesto que los mayores de 65 años se ven por lo general más afectados por este trastorno que la población más joven. Tanto en España como en el resto del mundo, el número de casos diagnosticados cada año va en aumento, y se espera que esta alarmante tendencia continúe durante los próximos años<sup>9,10</sup>. Según datos de la Asociación Española Contra el Cáncer (AECC), en la Comunidad de Aragón se detectaron un total de 8346 nuevos casos de cáncer en 2018, estando concentrado el mayor número de sucesos en la provincia de Zaragoza (5.929 casos), y siendo el principal tipo de tumor diagnosticado el colorrectal (1.166 casos). El grupo poblacional que registró un mayor número de incidencias se correspondió con los mayores de 75 años. En cuanto a la tasa de mortalidad, en la comunidad se registraron 2738 muertes debidas al cáncer. En este caso, el cáncer de pulmón fue responsable de

la mayor parte de las mismas (783 casos), seguido por el cáncer colorrectal (521 casos)<sup>11</sup>. Los datos aquí expuestos se muestran esquematizados en la Figura 2.



**Figura 2.** Representación esquemática de los tres principales tipos de tumor diagnosticados a nivel mundial, nacional o regional en 2018 ó 2019 (se han escogido los datos más actualizados disponibles) de acuerdo con informes de la SEOM y la AECC. Se indica en cada caso el número total estimado de incidencias.

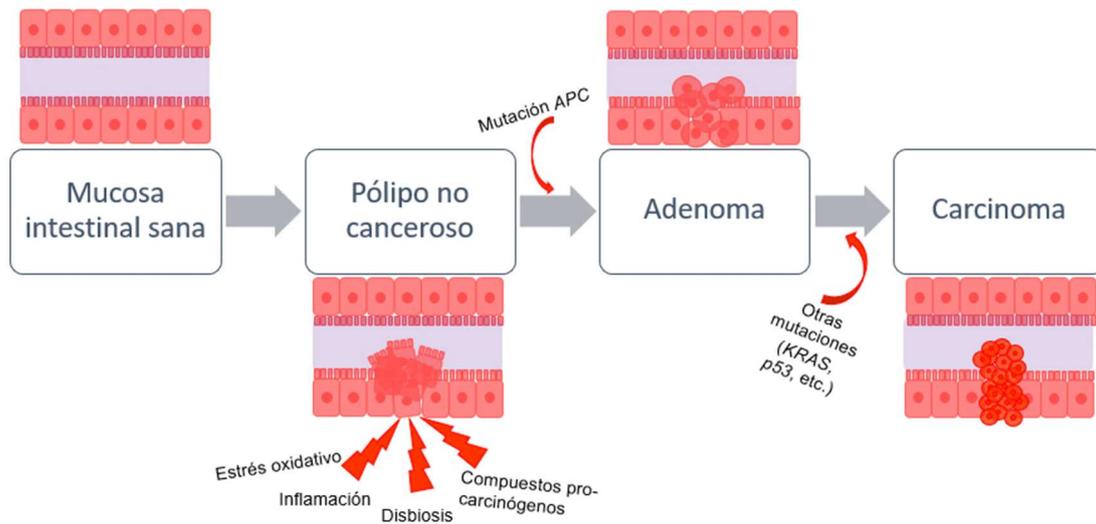
De acuerdo con las gráficas de la Figura 2, el **cáncer colorrectal** (*Colorectal Cancer*; CRC) es uno de los tipos de tumor más frecuentes y de los que poseen una mayor tasa de mortalidad asociada. Además, se trata de una de las clases de cáncer cuyo número de casos ha ido en aumento durante los últimos años, y se espera que esta tendencia continúe durante la próxima década<sup>12-14</sup>. Se cree que las principales razones tras este incremento son el envejecimiento de la población mundial, ya que según se mencionaba anteriormente la edad avanzada es un factor de riesgo, junto con la adquisición de una serie de comportamientos inadecuados que conforman el estilo de vida inadecuado que se ha implantado poco a poco en la sociedad actual. No obstante, los programas de detección temprana y los nuevos métodos de diagnóstico han supuesto un gran avance en la lucha frente a esta enfermedad. En el caso concreto de la Comunidad de Aragón, el programa de detección temprana de CRC está orientado a la “población de riesgo medio”. Este grupo engloba a aquellas personas que, independientemente de su sexo, tienen más de 50 años y carecen de antecedentes familiares, ya que estos últimos poseen un plan de seguimiento diferente por ser considerados de alto riesgo. La prueba, que se realiza cada dos años en caso de obtenerse resultados negativos, consiste en detectar sangre oculta en las heces. Si una prueba resultase positiva, la siguiente fase del diagnóstico consistiría en una colonoscopia<sup>15</sup>.

Este tipo de tumor se beneficia especialmente de los programas de detección temprana porque su desarrollo es un proceso lento y generalmente asintomático. En la mayor parte de los casos, el CRC tiene su inicio en una lesión precancerosa en forma de pólipos intestinales. Los pólipos no cancerosos son agrupaciones de células del epitelio intestinal que forman protuberancias hacia la luz del intestino, constituyendo en principio un tumor benigno. Aunque pueden surgir como consecuencia de procesos

inflamatorios de la mucosa intestinal o por una maduración anormal de la misma, en la mayoría de los pacientes los pólipos aparecen de manera espontánea, y la frecuencia de aparición aumenta con la edad. Si no se eliminan a tiempo, los pólipos pueden sufrir una transformación maligna<sup>16,17</sup>. Al eliminar el pólipo mediante cirugía, se reducen en gran medida las posibilidades de desarrollar un tumor. Como esta etapa es asintomática, sin los programas de detección precoz sería prácticamente imposible encontrar y eliminar esta amenaza a tiempo. Es por ello que estas estrategias salvan millones de vidas, además de ahorrar grandes sumas de dinero.

Si no son extirpados, los pólipos no cancerosos pueden derivar en pólipos adenomatosos o pólipos serrados, ambos con un alto riesgo de convertirse finalmente en un tumor colorrectal. Esto es lo que comúnmente se conoce como la **secuencia adenoma-carcinoma** (Figura 3), que establece que la transformación maligna del adenoma está mediada por la acumulación de mutaciones en oncogenes y genes supresores de tumores a lo largo del tiempo. De las muchas mutaciones que se han descrito como posibles responsables de la secuencia adenoma-carcinoma, destacan las que afectan a los genes *APC*, *KRAS*, *BRAF* y *TP53*, por encontrarse alteraciones en los mismos en la gran mayoría de muestras analizadas. Existen tres vías principales por las cuales se adquieren las mencionadas alteraciones genéticas, que son: la vía supresora o de la inestabilidad cromosómica (*Chromosomal instability*; CIN), la vía mutadora o de la inestabilidad de los microsatélites (*Microsatellite instability*; MSI) y la vía metiladora o del fenotipo metilador de las islas CpG (*CpG Island Methylator Phenotype*; CIMP), siendo esta última de tipo epigenético<sup>12,18-20</sup>.

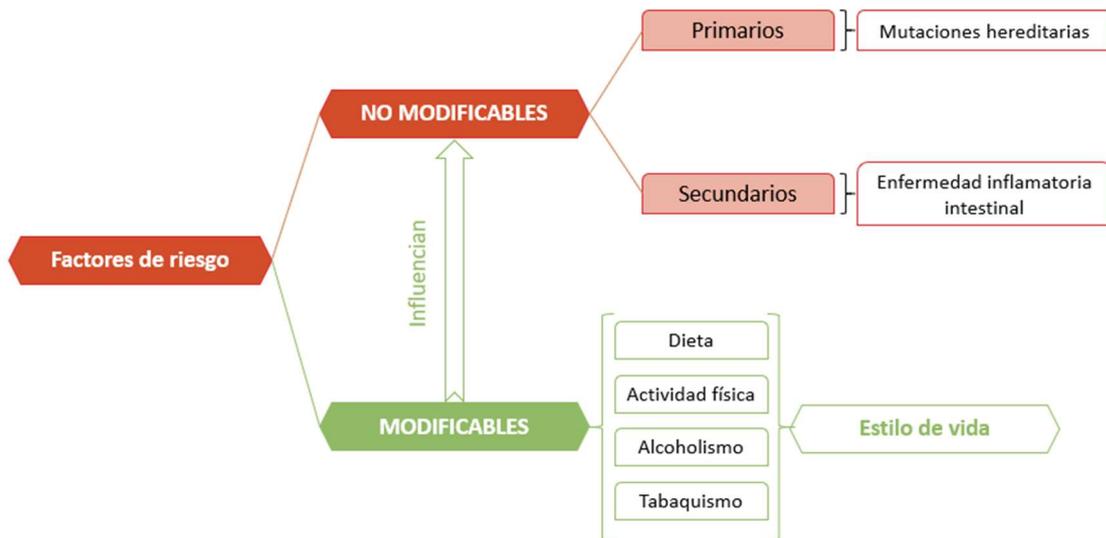
La acumulación de mutaciones responsables de la secuencia adenoma-carcinoma puede ser debida a diversos factores, entre los que destacan el estrés oxidativo, la inflamación, la disbiosis (alteración de la composición normal de la flora intestinal) y la exposición a compuestos pro-carcinógenos. Estos elementos pueden ser debidos a un estilo de vida inadecuado, ya mencionado como una de las causas de la alarmante progresión del CRC a nivel mundial, o bien estar causados por factores endógenos.



**Figura 3.** Representación esquemática de los pasos de la secuencia adenoma-carcinoma en la mucosa intestinal a lo largo del tiempo.

Los factores de riesgo del CRC pueden clasificarse en dos grandes grupos: modificables y no modificables (Figura 4). Los factores de riesgo no modificables pueden dividirse, a su vez, en primarios y secundarios. Los primarios son debidos a trastornos genéticos hereditarios, y son los responsables de solamente una proporción muy baja dentro del total de casos de cáncer de colon<sup>12</sup>, mientras que los secundarios son consecuencia de una enfermedad preexistente, principalmente los trastornos que se engloban bajo el término “enfermedad inflamatoria intestinal”. A este respecto es necesario matizar que, si bien el individuo no tiene control sobre la existencia previa de estos factores, sí puede, hasta cierto punto, retrasar la formación de los tumores y mejorar su pronóstico en caso de que lleguen a aparecer, a través de los factores no modificables<sup>21</sup>. Se plantearán a continuación dos ejemplos para ilustrar esta interdependencia entre los factores de riesgo no modificables y los modificables:

- El *síndrome de Lynch* es un trastorno genético hereditario que se considera factor de riesgo no modificable de tipo primario, y está relacionado con la predisposición a sufrir diversos tipos de tumores, entre ellos el colorrectal. No obstante, no todos los pacientes que sufren esta enfermedad acaban desarrollando CRC, lo que sugiere que debe existir algún factor exógeno que influya en la aparición de este trastorno. Estudios epidemiológicos han puesto el foco sobre el tabaquismo y la obesidad como los principales factores de riesgo de desarrollar un tumor colorrectal en personas con la enfermedad de Lynch<sup>22,23</sup>.
- El tabaco puede agravar también las lesiones de los pacientes de enfermedades inflamatorias intestinales y contribuir a la formación de un adenoma, ya que incrementa la inflamación de la mucosa al mismo tiempo que induce disbiosis<sup>21</sup>.

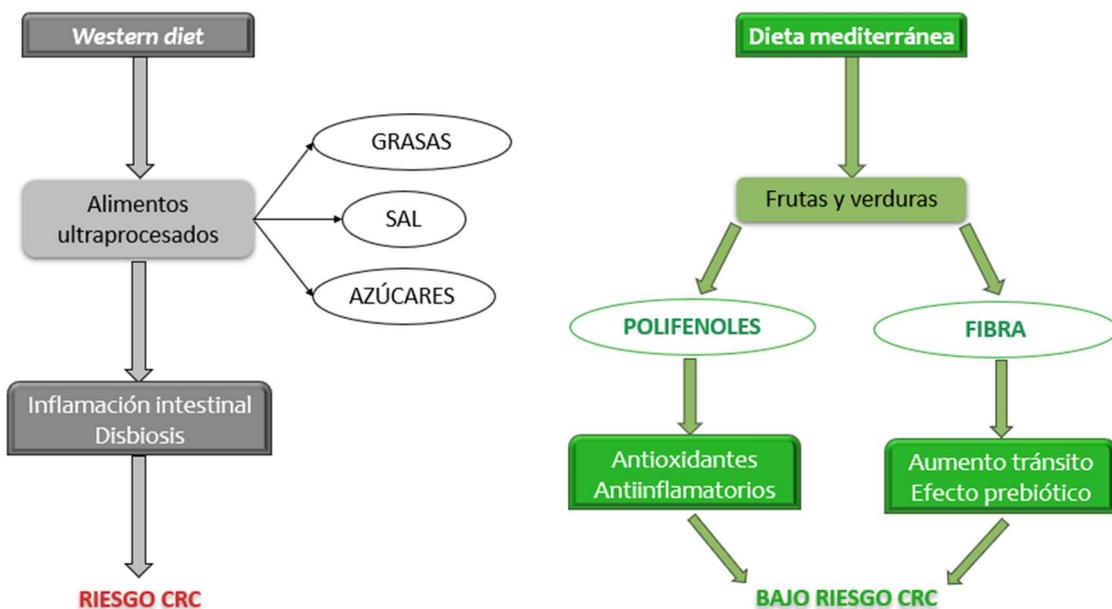


**Figura 4.** Factores de riesgo que influyen sobre la aparición de un tumor colorrectal. Se clasifican en no modificables y modificables, los cuales a su vez pueden influir sobre los primeros al acelerar o frenar el desarrollo de la masa tumoral.

Como ya se había adelantado, no cabe duda de que el estilo de vida tiene un gran peso en la aparición y el desarrollo de los tumores colorrectales. Esta influencia puede estar mediada por dos vías. Por un lado, determinados factores exógenos pueden potenciar una acumulación de potenciales carcinógenos en el tracto gastrointestinal. El tabaquismo es el mejor exponente de este supuesto, ya que entre sus componentes aparecen diversas moléculas de probado efecto mutagénico, además de ser capaces de inducir disbiosis como se ha mencionado anteriormente<sup>21</sup>. Por otro lado, el estilo de vida también puede alterar la homeostasis redox e inducir procesos inflamatorios en la mucosa intestinal. Tanto el estrés oxidativo como la inflamación crónicas pueden dar lugar a las lesiones intestinales que podrían actuar como precursoras del CRC (Figura 3).

En lo relativo al papel de la dieta, es muy habitual caer en la falacia de suponer que existen alimentos protectores y alimentos dañinos. Sin embargo, no es tan importante la contribución de un único alimento concreto sino el cómputo global de alimentos consumidos por la persona a lo largo de su vida diaria lo que podría influir sobre la aparición de tumores colorrectales. En este aspecto, debe tenerse en cuenta además el impacto de la globalización sobre la dieta. Tradicionalmente, los alimentos que se consumían en una región eran los que se producían en esa zona concreta. Esto permitía hablar de patrones dietéticos muy diferentes entre sí, como la dieta mediterránea o la dieta nórdica. Ambos casos tenían en común un alto consumo de frutas y verduras, pescado azul y cereales, diferentes en cada caso dependiendo de las condiciones climáticas de cada región, entre otros muchos factores. La globalización ha difuminado las antes bien definidas fronteras entre los diferentes regímenes alimenticios a nivel mundial, permitiendo que puedan consumirse de manera habitual productos que

antiguamente resultaba imposible adquirir. El principal inconveniente de esta situación aparece cuando se importan comportamientos que pueden influir negativamente sobre la salud del individuo. El más claro exponente es la denominada dieta occidental (*Western Diet*). La piedra angular de este patrón dietético son los alimentos ultraprocesados, ricos en grasas animales, sal y azúcares, en detrimento de un consumo regular de frutas y verduras frescas. Mientras que la adherencia a patrones dietéticos tradicionales, como es la dieta mediterránea en nuestro país, se asocia con una menor incidencia de enfermedades degenerativas, entre ellas CRC, la dieta occidental induce inflamación y disbiosis, por lo que se la considera en parte responsable de la aparición de este trastorno<sup>24-26</sup> (Figura 5). Los países en vías de desarrollo son un claro reflejo de la relación entre dieta occidental y cáncer colorrectal, ya que la industrialización ha ido de la mano con la adopción de esta dieta y un alarmante aumento de la incidencia de la enfermedad. El incremento del número de casos unido a la ausencia de programas de detección precoz ha hecho que la tasa de muerte es mayor en estas zonas que en países con una economía más consolidada<sup>13,14</sup>.



**Figura 5.** Representación esquemática de las principales diferencias a nivel de contenido entre la *Western diet* y la dieta mediterránea, así como sus principales efectos en relación al riesgo de sufrir cáncer colorrectal.

De lo anterior se deduce que el consumo habitual de alimentos de origen vegetal podría tener un efecto preventivo en la aparición de los tumores colorrectales. Se cree que los responsables de ello son su contenido en fibra y polifenoles. Bajo el término **fibra** se engloban todos aquellos polisacáridos que no son digeridos ni absorbidos por el tracto intestinal. El destino de dichos polisacáridos es, o bien pasar a formar parte de las heces, o bien ser aprovechados por algunas bacterias de la flora intestinal; a estos últimos se les denomina prebióticos, término que no debe ser confundido con

probiótico (microorganismos vivos que son administrados para modificar la flora normal del individuo, por ejemplo mediante alimentos funcionales)<sup>27</sup>. El componente mayoritario de la fibra es la celulosa, aunque también contiene almidón resistente o pectinas entre otros. El consumo de fibra se asocia, por un lado, a un aumento del tránsito intestinal y a un incremento del volumen de las heces. En consecuencia, los potenciales carcinógenos que se encuentren en el lumen van a estar más diluidos y permanecerán menos tiempo en contacto con el epitelio intestinal, reduciendo las posibilidades de que causen alteraciones genéticas<sup>21,28</sup>. Por otra parte, el potencial prebiótico de algunos de estos polisacáridos favorece la proliferación de bacterias productoras de butirato. El butirato es un ácido graso de cadena corta que promueve la expresión de genes pro-apoptóticos en las células intestinales, por lo que posee potencial antitumoral. Es un producto normal del metabolismo de las bacterias butirógenas tras la fermentación de algunos polisacáridos. El consumo de prebióticos tiene un beneficio secundario, ya que un aumento en la proporción de bacterias butirógenas tiene como consecuencia una disminución en el número de otras especies que pueden promover la formación de tumores, entre las que destaca *Fusobacterium nucleatum*<sup>12,21,29</sup>. Este potencial de los prebióticos de corregir una potencial disbiosis y reducir así el riesgo de desarrollar un tumor colorrectal puede verse beneficiado por el consumo concomitante de alimentos funcionales ricos en probióticos<sup>30</sup>, ya que contribuiría a aumentar la población de bacterias “protectoras” y disminuir a la de bacterias potencialmente peligrosas.

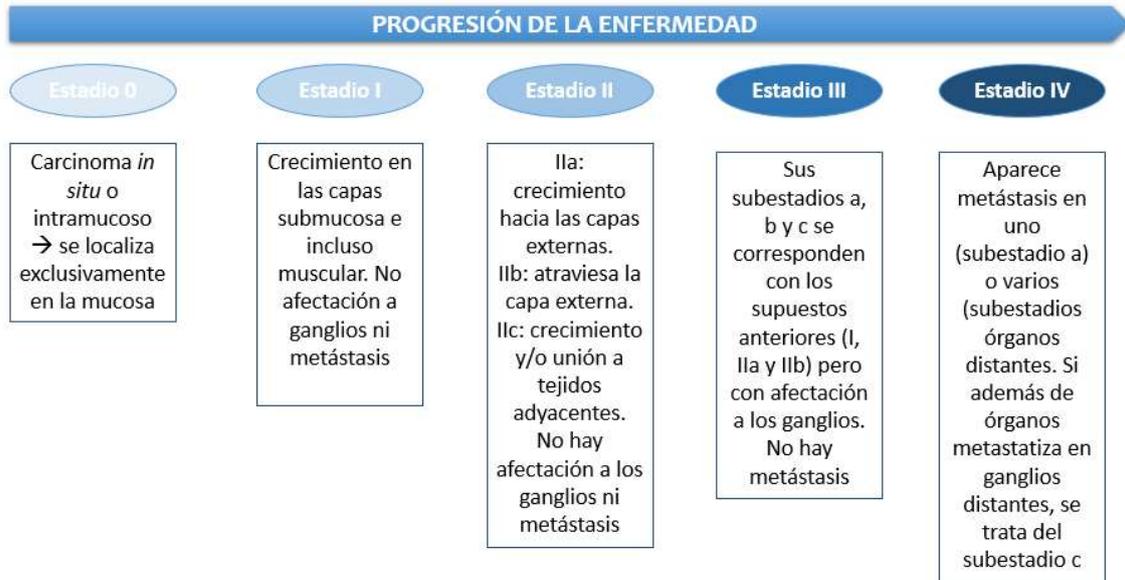
Los **polifenoles**, por su parte, son un grupo de metabolitos secundarios de las plantas, heterogéneo en cuanto a su estructura química y a las funciones que desempeñan dentro del vegetal. En situación basal, los polifenoles están implicados en el desarrollo de la planta, su pigmentación o la defensa frente a patógenos fúngicos, por ejemplo, aunque son de especial interés en la respuesta adaptativa frente a diferentes tipos de estrés: sequía, suelos con alta salinidad o temperaturas extremas, por citar algunos. La planta modifica su composición fenólica, tanto en contenido como en cantidad, para aumentar sus probabilidades de éxito frente a estos factores ambientales desfavorables. También influyen factores endógenos sobre la composición fenólica, siendo el más evidente la edad del vegetal. Es decir, la composición en polifenoles de una planta estará determinada por las condiciones en las que se ha desarrollado y su edad, principalmente. De ello se deduce que dos plantas de la misma especie que hayan crecido en regiones diferentes no van a tener la misma composición en polifenoles y, por supuesto, esta composición variará incluso más entre diferentes tipos de plantas<sup>31-34</sup>. Al margen de sus funciones en el vegetal en el que se originan, en el organismo humano los polifenoles actúan como antioxidantes y antiinflamatorios. De ahí su posible efecto preventivo en la aparición de tumores colorrectales, ya que se cree que pueden reducir la inflamación y el estrés oxidativo en la mucosa intestinal y disminuir así la posibilidad de adquirir mutaciones que conduzcan a la transformación tumoral (Figura 3). En este sentido, un estudio realizado por investigadores de la Universidad Pública de

Navarra y la Universidad de Zaragoza, en el que participó la autora de la presente tesis doctoral, demostró el efecto protector de polifenoles extraídos de las partes no comestibles de la alcachofa sobre un modelo de la mucosa intestinal sometida a estrés oxidativo exógeno. Los autores sugieren que los polifenoles podrían utilizarse como ingredientes clave en nuevos alimentos funcionales que mejoren la homeostasis del colon en personas con un riesgo medio de desarrollar esta enfermedad<sup>35</sup>.

No obstante, ya que el CRC es una enfermedad multifactorial, llevar un estilo de vida adecuado no es garantía de no llegar a desarrollar en algún momento un tumor colorrectal. Además, debe tenerse en cuenta que los grupos de bajo riesgo no entran en los programas de detección precoz, y dado que las etapas iniciales de la enfermedad son asintomáticas, la lesión precancerosa puede no ser extirpada a tiempo en todos los casos. Una vez que la secuencia adenoma-carcinoma se ha completado y se ha establecido un carcinoma en la región colorrectal, se pueden distinguir varias etapas de acuerdo con el grado de desarrollo e invasión del tumor. Estas etapas o estadios se correlacionan con la prognosis y determinan el tipo de tratamiento a escoger. El **sistema** de estadificación **TNM** (Tamaño-Nodo-Metástasis) es uno de los más utilizados para determinar la etapa de desarrollo de un tumor. Se basa en el análisis de tres parámetros, y el estudio conjunto de los valores obtenidos para cada parámetro determina el estadio de la enfermedad<sup>36,37</sup>. Dichos parámetros son:

- Grado de invasión local (*Local invasion depth*; parámetro **T**). Hace referencia, a grandes rasgos, al tamaño del tumor y a cuántas de las capas de la pared intestinal se han visto afectadas.
- Nivel de propagación a los ganglios linfáticos adyacentes (*Lymph node involvement*; parámetro **N**). Dependiendo del grado de avance del tumor, este puede afectar a los ganglios linfáticos más cercanos a la zona en la que se origina.
- Presencia de metástasis en regiones distantes al punto en el que se formó inicialmente la masa tumoral (*Presence of distant metastases*; parámetro **M**).

De acuerdo con estos parámetros, se obtiene finalmente la estratificación de los grados de agresividad de un tumor que se muestra en la Figura 6.



**Figura 6.** Representación esquemática de las diferentes etapas del desarrollo del CRC, siendo 0 la etapa menos avanzada y IV la más agresiva.

Los tumores en los estadios del 0 al III se eliminan mediante cirugía, aunque para los tumores en estadio III, además de los casos más graves en estadio II, es necesario llevar a cabo también un tratamiento de quimioterapia<sup>36</sup>. El abordaje de un tumor en estadio IV resulta bastante más complicado, siendo algunos de ellos incluso incurables. En este extremo se suele recurrir a la combinación de varias estrategias terapéuticas, incluyendo cirugía, quimioterapia y radioterapia<sup>38</sup>. Dependiendo de si la quimioterapia se administra antes o después de la cirugía, podemos hablar de quimioterapia adyuvante o neoadyuvante. La primera busca eliminar toda célula tumoral que haya podido permanecer en el organismo tras la cirugía, mientras que la segunda se administra previamente a la resección para disminuir el tamaño de la masa tumoral y facilitar el procedimiento. Por lo general, los tumores en estadios II y III reciben quimioterapia adyuvante, mientras que la quimioterapia neoadyuvante es más propia del estadio IV o de casos muy avanzados en el estadio III<sup>39</sup>. En cualquier caso, ambas tienen el mismo fin: causar la muerte de las células tumorales. Por consiguiente, en el próximo apartado se va a discutir en profundidad el concepto de muerte celular, así como algunas de las principales vías a través de las cuales se induce este proceso.

## 1.2. MUERTE CELULAR. APOPTOSIS, NECROPTOSIS Y AUTOFAGIA

A pesar de que en la actualidad se sabe que son varias las vías a través de las cuales puede producirse la muerte de las células, que de acuerdo con lo desarrollado hasta el momento es el objetivo último de la quimioterapia, las dos más estudiadas y, por lo tanto, mejor caracterizadas, son apoptosis y necrosis.

La **apoptosis** o muerte programada es un procedimiento habitual en el organismo para mantener una cantidad constante de células, así como para eliminar células que hayan sufrido algún daño y no puedan realizar su función correctamente. Este proceso está altamente regulado y culmina con la activación de unas proteasas denominadas caspasas ejecutoras, las **caspasas** 3, 6 y 7. La función de estas caspasas ejecutoras consiste en destruir diversas estructuras del interior celular, entre las que se encuentran los filamentos de actina del citoesqueleto, de modo que se produce un cambio en la morfología celular observable mediante microscopía óptica. El encogimiento celular va acompañado de una pérdida de sus conexiones con las células adyacentes. Se produce, además, una condensación y posterior fragmentación del núcleo celular. Finalmente, la célula apoptótica deriva en una serie de pequeñas vesículas denominadas cuerpos apoptóticos. Los cuerpos apoptóticos se forman a partir de la membrana plasmática, que forma vesículas que contienen los distintos orgánulos y fragmentos del núcleo. Los cuerpos apoptóticos serán fagocitados por los macrófagos del sistema inmune, finalizando así la apoptosis<sup>40,41</sup>. Otra de las dianas de las caspasas ejecutoras son las DNAsas, que quedan activadas en consecuencia y degradan el ADN nuclear. La fragmentación del ADN se produce en un característico patrón en escalera, que tradicionalmente ha sido uno de los marcadores moleculares del proceso apoptótico al analizarlo mediante electroforesis<sup>41</sup>.

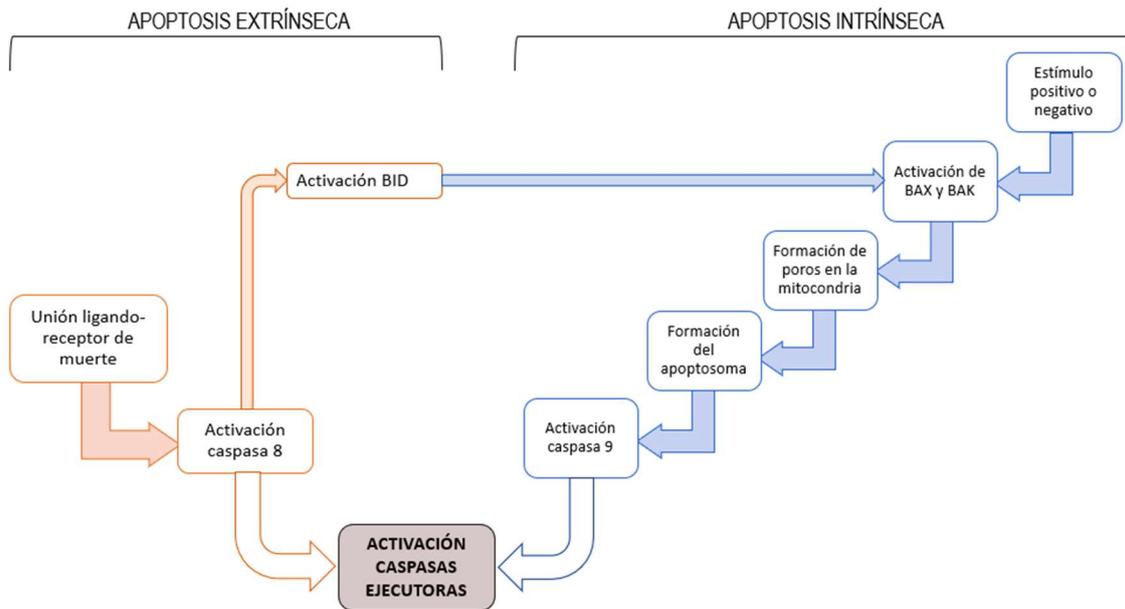
La activación de las caspasas ejecutoras puede darse a través de dos vías distintas, que se diferencian en el estímulo que induce el inicio de la apoptosis (Figura 7). Por un lado, la vía **extrínseca** depende de la activación de los denominados receptores de muerte. Dichos receptores pertenecen a la familia de los receptores del factor de necrosis tumoral (*Tumor Necrosis Factor*, TNF) y se encuentran en la superficie exterior de la célula, siendo algunos ejemplos Fas, TNFR1 o Trail<sup>42</sup>. Los distintos ligandos de estos receptores se encuentran expresados en la superficie de células del sistema inmune. La unión entre ligando y receptor promueve la migración de la pro-caspasa 8 a la membrana plasmática, lo cual resulta en su activación. Una vez la caspasa 8 está activada, es responsable de la inducción de la apoptosis de manera directa o indirecta, dependiendo del tipo de célula. De acuerdo a cómo responden a la activación de la caspasa 8, se puede clasificar a las células en tipo I y tipo II. En las células tipo I, la caspasa 8 activa a las caspasas ejecutoras sin necesidad de intermediarios, mientras que en las células tipo II es necesaria la inhibición de las proteínas inhibitorias de la apoptosis

(*Inhibitory Apoptosis Proteins*; IAPs) mediante proteínas liberadas por la mitocondria, entre las que destaca Smac<sup>43,44</sup>.

La apoptosis **intrínseca**, por su parte, puede ser causada por una gran variedad de estímulos. A grandes rasgos, estos estímulos se pueden dividir en positivos y negativos. Los estímulos negativos son aquellas sustancias que promueven la supervivencia de la célula en condiciones normales, como algunas hormonas, citoquinas o factores de crecimiento, de modo que su ausencia en el medio extracelular supone la señal de inicio para la activación de la maquinaria apoptótica. Los factores positivos inducen daños en la célula que la hacen inadecuada para un correcto funcionamiento, por lo que debe ser eliminada. Entre estos factores se cuentan los niveles altos de especies reactivas de oxígeno (*Reactive Oxygen Species*; ROS), infecciones víricas o la entrada de toxinas en la célula. Una gran cantidad de fármacos quimioterapéuticos, entre ellos el cisplatino<sup>45</sup>, del que se hablará más adelante, actúan como iniciadores de la vía intrínseca de la apoptosis.

En respuesta a los daños producidos por los estímulos mencionados, se rompe el equilibrio entre las proteínas pro y anti-apoptóticas de la familia Bcl-2. En situación basal, ambos tipos de proteínas se encuentran en la misma proporción en el interior celular, y las anti-apoptóticas inhiben a la acción de sus análogas mediante interacciones proteína-proteína. Al romperse el equilibrio en favor de las pro-apoptóticas, entre las que destacan BAX y BAK, éstas podrán llevar a cabo su función normal, que no es otra que generar poros en la membrana externa mitocondrial. Como consecuencia, se induce un aumento de la permeabilización de la membrana externa mitocondrial (*Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization*, MOMP), lo que se traduce en una pérdida del potencial de membrana mitocondrial. Además, se produce la liberación de proteínas mitocondriales como la anteriormente mencionada Smac o el citocromo c. Este último resulta de especial interés por su relevancia a la hora de formar el complejo proteico denominado apoptosoma junto con Apaf-1 (*Apoptosis Protease-Activating Factor 1*). El apoptosoma induce la activación de la caspasa 9, la cual a su vez activará a las caspasas ejecutoras<sup>43,46</sup>.

Aunque ambas vías convergen en la activación de las caspasas ejecutoras, este no es su único punto en común, ya que la caspasa 8 también es capaz de inducir la MOMP. Esto es a causa de su capacidad de activar a la proteína BID, la cual a su vez puede activar a las proteínas pro-apoptóticas BAX y BAK para que induzcan la formación de poros en la mitocondria<sup>44</sup>.

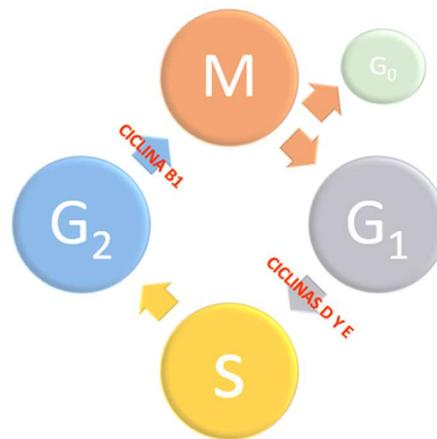


**Figura 7.** Vías extrínseca e intrínseca de la apoptosis.

Existe una estrecha relación entre la apoptosis y el avance en el **ciclo celular**, siendo este el conjunto de fases que conducen a la división de una célula en dos células hijas. A grandes rasgos, el ciclo celular consta de dos fases: interfase y división. Existe, a su vez, una etapa quiescente o  $G_0$ , durante la cual la célula no se prepara para dividirse. En la fase  $G_0$ , la célula lleva a cabo las funciones propias del tejido en el que se encuentra, y se mantendrá en este estado hasta que sea necesario dividirse, por ejemplo, al producirse algún daño en el tejido que requiera de nuevas células para sustituir a las alteradas. Cuando la célula comienza el proceso de división, pasa de este estado quiescente a la primera de las etapas de la interfase, la fase  $G_1$ . El objetivo de esta etapa es controlar la integridad del genoma para asegurar la ausencia de mutaciones que pudiesen resultar en células hijas alteradas. Para ello, existen los denominados puntos de control del ciclo celular (Figura 8). A continuación, se entra en la fase S, en la que se produce la replicación del ADN. De esta etapa se pasa a la fase  $G_2$ , cuya razón de ser es idéntica a la de la fase  $G_1$ : asegurar que no existen errores en el nuevo ADN replicado. Estas tres etapas constituyen la interfase, que da paso a la fase M, en la que se produce finalmente la división celular<sup>47-49</sup>.

La razón que subyace a la antes mencionada relación entre apoptosis y ciclo celular es que un cese en la proliferación del cultivo suele ir acompañado por un incremento en la tasa de muerte celular. Ambos procesos están estrechamente regulados por los genes supresores de tumores tales como *TP53*, de modo que mutaciones en los mismos conducirán no solo a una pérdida de sensibilidad hacia la muerte celular sino también a un aumento de la proliferación. Entre otras funciones, la proteína p53 es capaz de inducir un cese en el avance entre fases del ciclo celular, lo que se traduce en un dramático aumento del número de eventos en una fase en concreto, siendo las más

habituales  $G_1$  y  $G_2$ . Esto es debido a que, al activarse, p53 bloquea a las proteínas responsables de la transición entre fases, que son las ciclinas D y E en el caso de la transición  $G_1$ -S y la ciclina B para el paso entre la fase  $G_2$  y la mitosis. Estas ciclinas constituyen los ya mencionados puntos de control del ciclo celular (Figura 8). El estudio de la distribución de las poblaciones celulares en cada fase del ciclo es un proceso habitual a la hora de determinar el posible mecanismo de acción de un compuesto, ya que los compuestos que provocan un arresto en la fase  $G_2$ /M suelen causar más daños que los que lo bloquean en la fase  $G_0$ / $G_1$ <sup>50-52</sup>. En este sentido, el hallazgo de un aumento en la población celular en la fase  $G_2$ /M podría ser una señal de alarma en relación a la toxicidad sobre tejidos sanos. Esta es una de las causas por las que la inducción de daños sobre el ADN como principal mecanismo de acción de un fármaco quimioterapéutico<sup>53,54</sup> puede resultar potencialmente peligroso, según se discutirá más adelante.



**Figura 8.** Transición en el ciclo celular y principales puntos de control entre fases.

Existen varios puntos dignos de mención en cuanto a la interconexión entre apoptosis y cáncer. En primer lugar, en el apartado 1.1. se mencionaba la pérdida de sensibilidad a la muerte celular como uno de las principales consecuencias del proceso de transformación tumoral<sup>4,5</sup>. Al principio del presente apartado, se comentaba que una de las funciones de la apoptosis es eliminar a las células dañadas, entre las que se cuentan aquellas que han sufrido la transformación maligna. La transformación tumoral es un proceso que tiene lugar a diario en el organismo humano, ya que los errores en la replicación del ADN son algo habitual; el problema aparece cuando estas alteraciones genéticas afectan a genes relacionados con el control de la apoptosis, puesto que entonces estas células dañadas no serán eliminadas y podrán continuar proliferando, dando lugar así a un tumor. Las mutaciones en genes supresores de tumores y proto-oncogenes relacionadas con este respecto tienen como consecuencia principal la sobreexpresión de proteínas anti-apoptóticas de la familia Bcl-2, de modo que impiden la activación de la vía intrínseca. Por el contrario, la expresión de las caspasas ejecutoras se encuentra en niveles muy bajos<sup>55,56</sup>. En la Tabla 1 se recogen los principales mecanismos de resistencia a la apoptosis que se relacionan con el desarrollo de las

células tumorales<sup>46,57</sup>. En consecuencia, las células tumorales no van a responder del modo esperado a la inducción de apoptosis por causas endógenas.

**Tabla 1.** Mecanismos de resistencia a la apoptosis desarrollados por las células tumorales.

MECANISMO	CONSECUENCIA	VÍA APOPTÓTICA AFECTADA
<i>SILENCIAMIENTO DE RECEPTORES DE MUERTE</i>	Ausencia de interacción ligando-receptor de muerte	EXTRÍNSECA
<i>PRODUCCIÓN DE RECEPTORES DE MUERTE INACTIVOS</i>	Ausencia de interacción ligando-receptor de muerte	
<i>SECRECIÓN DE RECEPTORES SOLUBLES DE MUERTE</i>	Bloqueo de los ligandos en las células del sistema inmune	
<i>SOBREEXPRESIÓN DE PROTEÍNAS INHIBIDORAS DE LA CASPASA 8, P.EJ. C-FLIP</i>	No activación de la caspasa 8	
<i>REDUCCIÓN EN LA EXPRESIÓN DE COMPONENTES CITOSÓLICOS DE LA VÍA EXTRÍNSECA, P.EJ. FADD</i>	No activación de la caspasa 8	
<i>AUSENCIA DE CASPASA 8</i>	No activación de caspasas ejecutoras	
<i>DESREGULACIÓN DEL EQUILIBRIO ENTRE PROTEÍNAS PRO Y ANTI-APOPTÓTICAS</i>	Sobreexpresión de proteínas anti-apoptóticas	INTRÍNSECA
<i>REDUCCIÓN EN LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE APAF-1</i>	Descenso en la expresión de proteínas pro-apoptóticas	
	No formación del apoptosoma	

No obstante, se puede forzar la apoptosis mediante el uso de agentes quimioterapéuticos, lo que convierte a esta clase de muerte celular en un valioso aliado en el tratamiento de la enfermedad. Son numerosos los fármacos capaces de inducir la vía intrínseca como parte de su mecanismo antitumoral<sup>45,58-61</sup>. Así mismo, también existen fármacos capaces de estimular la vía extrínseca<sup>62,63</sup>, y, finalmente, se han dado casos de compuestos que promueven ambas vías simultáneamente<sup>64,65</sup>. La importancia de la apoptosis en la terapia contra el cáncer reside en la ausencia de respuesta inflamatoria que conlleva esta forma de muerte celular, lo que no ocurre con otros tipos de muerte como la necrosis.

Sin embargo, debe tenerse en cuenta un tercer punto de gran importancia en la relación entre apoptosis y cáncer, y es que algunos tumores que inicialmente no presentan resistencia a esta clase de muerte celular pueden desarrollarla en respuesta a la terapia. El concepto de resistencia a la quimioterapia será explicado en detalle en el apartado 1.3, aunque en este punto puede adelantarse que la resistencia adquirida a la muerte por apoptosis suele ser consecuencia de un aumento en la expresión de los genes de las proteínas anti-apoptóticas junto con un descenso de los niveles de factores pro-apoptóticos en respuesta a una exposición prolongada al fármaco (Tabla 1)<sup>66,67</sup>. En

estos casos, la estrategia terapéutica deberá modificarse para escoger un nuevo tratamiento que induzca la muerte de las células tumorales por una vía alternativa a la apoptosis.

Mientras que la apoptosis recibe el sobrenombre de “muerte celular programada”, la **necrosis** se considera un proceso poco controlado y con consecuencias desagradables para el tejido circundante. Los estímulos que la inician son situaciones generalmente traumáticas y/o extremas para la célula y, por extensión, el organismo, como pueden ser la inflamación o la hipoxia mantenidas a lo largo del tiempo. A nivel morfológico, la necrosis se caracteriza por un aumento del volumen celular que culmina con la ruptura de la membrana plasmática. Durante el proceso de muerte la célula sobreexpresa proteínas pro-inflamatorias, por lo que la liberación del contenido intracelular al medio extracelular supondrá la inducción de daños sobre las células circundantes<sup>43</sup>. Si se desarrollase un agente quimioterápico cuyo mecanismo de acción culminase con la inducción de necrosis, a sus posibles efectos secundarios tendría que añadirse causar inflamación en la región tumoral, lo que podría no solo ser doloroso para el paciente sino incluso contraproducente para la terapia, ya que como se ha apuntado en el apartado 1.1, la inflamación crónica se considera un factor de riesgo para la aparición y el desarrollo de los tumores. Por ello, tradicionalmente se ha optado por el diseño de fármacos capaces de inducir apoptosis.

Existe un tipo de muerte celular cuyo interés en quimioterapia está aumentando considerablemente en los últimos tiempos, la **necroptosis** o necrosis programada. La necroptosis es una forma de muerte independiente de caspasas. A nivel morfológico, los cambios que tienen lugar en el proceso son prácticamente idénticos a los de la necrosis, pero se asemeja a la apoptosis en que es un proceso altamente regulado<sup>68,69</sup> (Tabla 2). Las primeras evidencias acerca de este tipo de muerte celular se describieron en respuesta a infecciones víricas o bacterianas, y en este sentido, la inflamación producida al liberarse el contenido intracelular al medio extracelular tendría como finalidad desencadenar una fuerte respuesta inmune que ayudase a combatir la infección<sup>70,71</sup>. Sin embargo, la necroptosis no se limita a la defensa frente a patógenos, sino que también se ha planteado la posibilidad de que se trate de un mecanismo de emergencia celular para inducir la muerte en caso de que la apoptosis esté inhibida. Este descubrimiento se ha postulado como una interesante estrategia para vencer la resistencia a la quimioterapia mediada por una pérdida de sensibilidad a la apoptosis. Metzger *et al.*<sup>72</sup> fueron capaces de inducir la muerte por necroptosis sobre un modelo de cáncer colorrectal resistente a 5-fluorouracilo al utilizarlo conjuntamente con un inhibidor de caspasas. Por consiguiente, la inducción de necroptosis podría ser un abordaje terapéutico muy prometedor para tratar los tumores más agresivos y que peor responden a la quimioterapia adyuvante, así como para hacer frente a la reaparición de la enfermedad tras una remisión inicial.

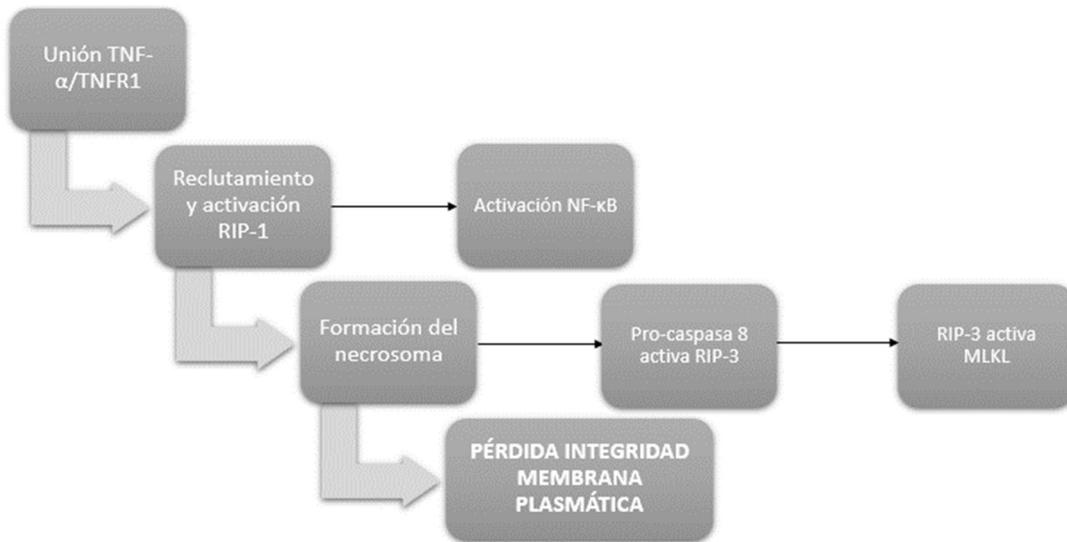
**Tabla 2.** Principales diferencias entre necroptosis y apoptosis.

NECROPTOSIS	APOPTOSIS
Controlada por RIP-1, RIP-3 y MLKL.	Controlada por caspasas ejecutoras 3, 6 y 7
Pérdida de la integridad de la membrana plasmática (formación de poros) en la fase temprana	Formación de cuerpos apoptóticos en la fase final
Aumento del volumen celular y los orgánulos (ej: mitocondria)	Encogimiento por degradación del citoesqueleto e internalización de los orgánulos en los cuerpos apoptóticos
Liberación del contenido intracelular al medio extracelular	Eliminación por parte de los macrófagos del sistema inmune
Inducción de una fuerte respuesta inmune e inflamación	No estimula respuesta inmune ni produce inflamación

En cuanto a los estímulos que desencadenan la necroptosis, no están tan claros como en el caso de la apoptosis. Es más, algunos de los estímulos que tradicionalmente se han descrito como iniciadores de la apoptosis, pueden inducir la necroptosis cuando los daños que causan en el interior celular son extremos, aunque resulta complicado establecer cuál es el umbral que determina el tipo de muerte<sup>68</sup>. Quizá el ejemplo más representativo de esta dificultad lo encontramos en el papel de las especies reactivas de oxígeno como iniciadoras de ambos tipos de muerte celular dependiendo de las circunstancias. Se ha observado que los daños extremos en la mitocondria, que van acompañados por una excesiva generación de ROS, podrían ser una de las principales razones por las que ciertos agentes quimioterapéuticos podrían inducir necroptosis en las células tumorales<sup>73,74</sup>. No obstante, no se han esclarecido en qué circunstancias la pérdida de función de este orgánulo determina la inducción de apoptosis o de necroptosis.

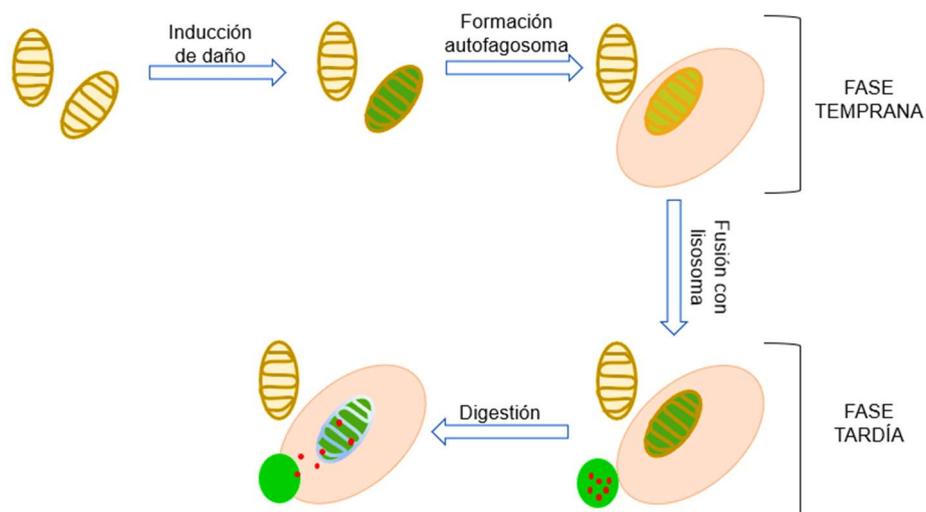
Independientemente del tipo de estímulo que la inicie, existen varias vías a través de las cuales puede desencadenarse la muerte por necroptosis. La mejor caracterizada es la dependiente de la citoquina TNF- $\alpha$  (Figura 9). Al unirse TNF- $\alpha$  con su receptor de membrana TNFR1, se recluta a la proteína RIP-1 (*Receptor Interacting Protein 1*), junto con una serie de IAPs. Esto supone la señal de activación para NF- $\kappa$ B (*Nuclear Factor Kappa-Light-Chain-Enhancer of Activated B Cells*), que se traslocará al núcleo y promoverá la transcripción de genes relacionados con la muerte celular. A continuación, se produce la ubiquitinación y posterior degradación de las IAPs, permitiendo así la activación de RIP-1. Tras activarse, RIP-1 queda libre en el citosol y recluta a otras proteínas para formar el complejo proteico denominado necrosoma, responsable final de la muerte vía necroptosis. Entre los integrantes del necrosoma destacan la pro-caspasa 8, que será responsable de la activación final de RIP-1 y RIP-3, así como de la proteína MLKL (*Mixed Lineage Kinase Domain-Like*), que es activada al ser fosforilada

por RIP-3. El necrosoma migra entonces a la membrana plasmática e induce su destrucción, culminándose así el proceso de muerte<sup>68,69,75</sup>.



**Figura 9.** Inducción de necroptosis dependiente de TNF-α.

Así como la necroptosis se considera un mecanismo de emergencia para inducir la muerte celular en caso de que la apoptosis esté impedida, existen otros procesos cuya relación con la apoptosis es incluso más complicada. Es el caso de la **autofagia**, una ruta metabólica cuyo objetivo es eliminar componentes celulares dañados que podrían alterar el funcionamiento celular. Consta de dos etapas, la temprana y la tardía (Figura 10). Durante la etapa temprana se forma una vesícula denominada autofagosoma, que engloba a las estructuras dañadas. A continuación, en la etapa tardía, el autofagosoma se fusiona con un lisosoma, que vierte sus proteasas al interior de la vesícula y se inicia así la digestión de su contenido<sup>76</sup>.



**Figura 10.** Autofagia en respuesta al daño sobre un orgánulo celular.

La relación entre autofagia y cáncer, y por extensión, entre autofagia y apoptosis, es realmente compleja. Dado que la autofagia es, en esencia, un mecanismo que promueve el correcto funcionamiento de la célula y su supervivencia, alteraciones en su maquinaria pueden desencadenar la transformación tumoral. En general, la influencia de la desregulación de la autofagia sobre la carcinogénesis suele estar mediada por un aumento del estrés oxidativo causado por defectos en la eliminación de las mitocondrias no funcionales<sup>76,77</sup>. No obstante, la situación cambia por completo una vez que se ha producido la transformación, ya que la autofagia se vuelve una aliada de la célula cancerosa y promueve el desarrollo de la masa tumoral. Este caso no es sino una perversión del concepto mismo de la autofagia, ya que su efecto citoprotector se vuelve en contra del propio organismo al permitir la proliferación de las células tumorales, eliminando con eficiencia las estructuras que hayan podido resultar dañadas por la acción de los fármacos. En línea con lo anterior, la autofagia puede incluso ser una de las causas de la resistencia a la quimioterapia.<sup>78-80</sup> A modo de ejemplo, se ha observado que la resistencia al tratamiento con cisplatino, del cual se hablará en detalle en el apartado 1.3, puede estar mediada por un incremento del flujo autofágico<sup>81,82</sup>, entre otros mecanismos moleculares que serán discutidos más adelante<sup>83-85</sup>. Es por ello que se ha planteado el uso de inhibidores de la autofagia como coadyuvantes de los fármacos tradicionales, para aumentar su eficacia y reducir la tasa de resistencia a la terapia<sup>86-89</sup>.

Curiosamente, la autofagia también puede promover la muerte de la célula. Esta dualidad permite distinguir entre **autofagia citoprotectora**, término que responde a la definición previamente desarrollada, y **autofagia citotóxica**. Este efecto se ha observado principalmente en células tumorales, y aunque las bases moleculares del proceso todavía son objeto de discusión entre los expertos, se cree que el estrés en el retículo endoplasmático podría jugar un papel clave. También es controvertido el papel que desempeña la apoptosis en la muerte inducida por la autofagia citotóxica, ya que se han descrito casos en los que ambos procesos en paralelo contribuyen a la muerte celular y otros en los que la autofagia citotóxica se desencadena en respuesta al bloqueo de la apoptosis. Finalmente, tampoco está clara la existencia de un umbral a partir del cual una repuesta inicialmente citoprotectora derive en citotóxica<sup>90,91</sup>. Dadas las numerosas incógnitas en torno al papel de la autofagia en la quimioterapia, cada caso concreto requiere de un estudio pormenorizado para determinar la estrategia clínica con mayores posibilidades de éxito.



### 1.3. QUIMIOTERAPIA. DESCUBRIMIENTO DE LAS PROPIEDADES ANTITUMORALES DEL CISPLATINO.

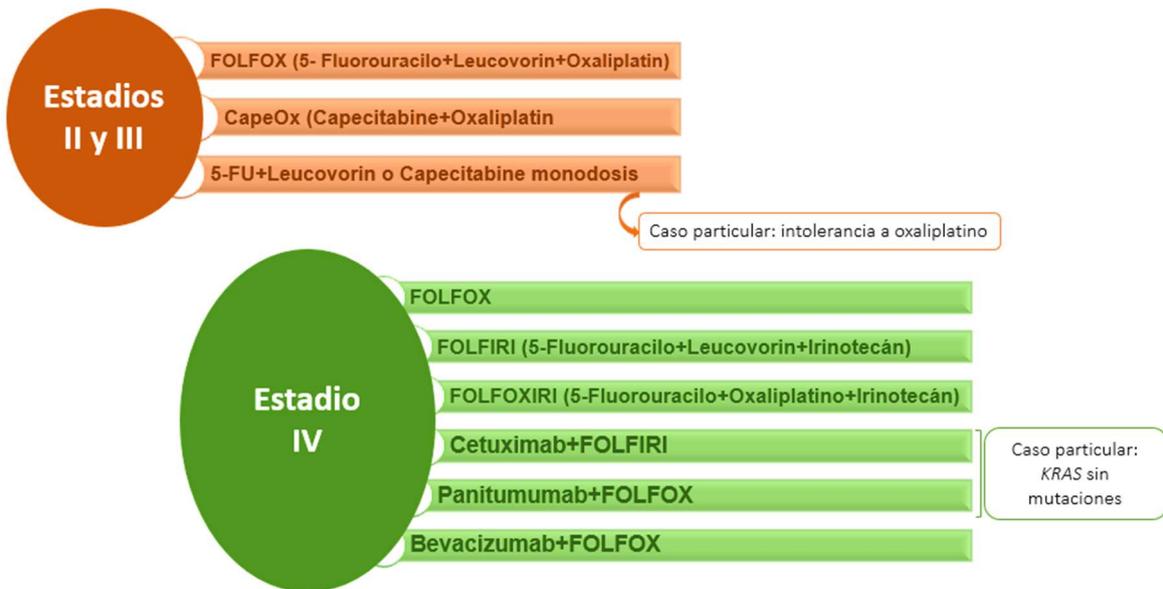
Según se adelantaba en el apartado 1.1, el propósito de la **quimioterapia** consiste en inducir la muerte de las células tumorales mediante el uso de fármacos. El medicamento quimioterapéutico ideal debería reunir dos características: ser efectivo, es decir, resultar altamente tóxico para la célula cancerosa, al tiempo que selectivo, lo cual implica que no causa daños sobre los tejidos sanos. En la actualidad, se dispone de una amplia gama de compuestos químicos que presentan una potente acción antitumoral, pero de limitada selectividad, dando lugar a severos efectos secundarios para el paciente. En consecuencia, aunque el tratamiento logre finalmente eliminar el tumor, una lacra muy seria del tratamiento será la merma de la calidad de vida del paciente oncológico. Debe tenerse en cuenta que el término “calidad de vida” hace referencia a un concepto completamente subjetivo que engloba tanto el bienestar físico como emocional del individuo, pero que, reducido a su mínima expresión, se puede entender como una situación de bienestar en la que el individuo es capaz de llevar una vida normal con la que se encuentre satisfecho<sup>92,93</sup>. Los conceptos esperanza de vida y calidad de vida no deben, por lo tanto, confundirse. Las prácticas clínicas actuales han logrado aumentar la primera, pero esto no en todos los casos va acompañado por una mejora de la segunda. Los supervivientes del cáncer colorrectal experimentan un detrimento de su salud física que, en muchos casos, va unido a episodios de depresión y de otros trastornos psicológicos<sup>94-96</sup>. Por ello, es necesario encontrar una alternativa a las actuales opciones farmacológicas que sea selectiva además de efectiva, para mejorar tanto la calidad como la esperanza de vida de los pacientes de cáncer de colon.

Los dos pilares que sostienen el desarrollo de terapias selectivas son la investigación básica y la medicina personalizada. La investigación básica es esencial para conocer las diferencias entre una célula tumoral y una célula sana, lo que permitirá identificar dianas moleculares clave y diseñar los nuevos compuestos antitumorales en consecuencia. Por otra parte, la medicina personalizada implica realizar un análisis en profundidad de las características bioquímicas de cada tumor, para así poder escoger el mejor fármaco o combinación de fármacos para un paciente en concreto. Ambas disciplinas requieren tiempo y una gran inversión económica, además de necesitar de una comunicación constante entre los investigadores y los profesionales de la medicina, pero los beneficios a obtener son inmensos. Uno de los casos más representativos del gran avance que implica la unión de ambos conceptos lo encontramos en el tratamiento del cáncer de mama. Antiguamente, se tendía a pensar que todos los tumores que se desarrollaban en una zona concreta del organismo eran iguales, por lo que se administraba el mismo tratamiento a todos los pacientes. No obstante, no todos los pacientes de cáncer de mama respondían igual a la quimioterapia, lo que resultaba en una alta tasa de mortalidad. Por ello, se decidió analizar cada tumor de manera individualizada, encontrándose diferencias significativas entre unos y otros, siendo una de las más

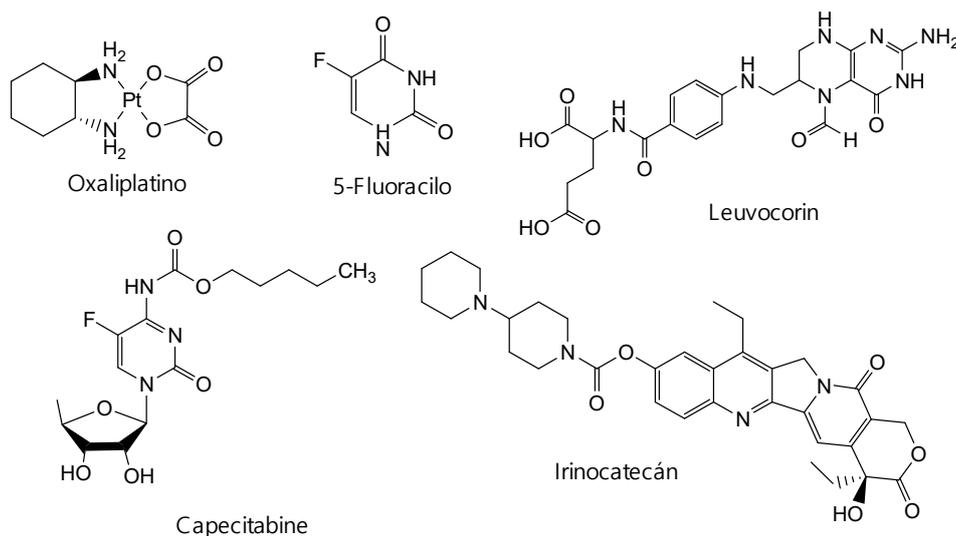
evidentes la expresión o no del receptor de estrógenos en las células tumorales. Esto permitió diseñar terapias dirigidas hacia esta diana, en el caso de tumores que la expresaban, y aumentar el número de curaciones de forma considerable. De igual forma, se desarrollaron nuevas estrategias terapéuticas completamente diferentes para los tumores que no expresaban el receptor de estrógenos, gracias a estudios posteriores que lograron identificar nuevas dianas moleculares específicas para cada subtipo de cáncer de mama, aumentando todavía más la eficacia de la terapia<sup>97,98</sup>.

Los avances realizados a este respecto en el desarrollo de terapias frente al cáncer colorrectal son más discretos, pero no por ello desdeñables. Día a día, se caracterizan nuevos biomarcadores que permiten un diagnóstico más rápido y fiable del perfil molecular del tumor, lo que permite al oncólogo escoger el tratamiento más adecuado para cada paciente. Además, estas nuevas técnicas de diagnóstico son menos invasivas, más fidedignas y más baratas en comparación con los métodos tradicionales como la colonoscopia<sup>12,99</sup>. Es decir, en la actualidad contamos con herramientas que facilitan la toma de decisiones en lo relativo a la quimioterapia para tratar el cáncer colorrectal. A continuación, se retomará el concepto de quimioterapia adyuvante desarrollado anteriormente para ahondar en los avances de la medicina personalizada en el tratamiento de esta clase de tumor.

Según la definición previa (ver apartado 1.1) la **quimioterapia adyuvante** busca reducir las posibilidades de recurrencia y metástasis tras extraer el tumor mediante cirugía, destruyendo a las células tumorales que hayan podido permanecer en el organismo tras la intervención. Durante el siglo XX, se tenía la creencia de que este fin podría lograrse con un único fármaco muy potente, de manera similar a recurrir a un solo antibiótico para eliminar una infección bacteriana. No obstante, como ya hemos discutido a lo largo de esta sección, el uso de agentes quimioterápicos muy potentes puede tener como consecuencia graves efectos secundarios. Así, uno de los principales avances de la medicina personalizada en la lucha contra el CRC fue el desarrollo de cócteles de fármacos, es decir, combinaciones de varios medicamentos, cada uno dirigido hacia una diana terapéutica. Esta aproximación contaba con dos grandes ventajas. En primer lugar, permitía reducir las cantidades individuales de cada compuesto, lo que suponía un menor riesgo de efectos secundarios por su acumulación a largo plazo en los tejidos sanos. Por otro lado, se aumentaba la eficacia del tratamiento al atacar a la célula tumoral por varios flancos de manera simultánea. Otra posible estrategia consiste en utilizar un único fármaco en combinación con radioterapia, ya que el tejido irradiado es más sensible a la acción del agente quimioterápico y permite utilizarlo en una dosis menor para disminuir los efectos secundarios. La Figura 11 muestra un resumen de las posibles opciones a elegir para tratar el cáncer colorrectal dependiendo del estadio en el que se encuentra, mientras que en la Figura 12 se recogen las estructuras químicas de algunos de los principales agentes quimioterapéuticos que se mencionan en la figura anterior<sup>37,39</sup>.



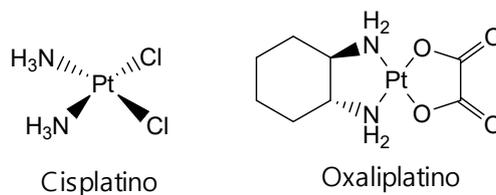
**Figura 11.** Esquematización de los tipos de quimioterapia adyuvante a administrar dependiendo del estadio en el que se encuentra el tumor colorrectal.



**Figura 12.** Estructura química de algunos de los principales agentes utilizados en quimioterapia adyuvante frente al cáncer colorrectal.

De acuerdo con la Figura 11, uno de los componentes más habituales de los cócteles de quimioterápicos utilizados frente al CRC es un derivado metálico de platino, el denominado **oxaliplatino** –*trans*-L-1,2-diaminociclohexanoalatoplatino(II). Es habitual administrarlo junto con moléculas orgánicas tales como leucovorin, 5-fluorouracilo, capecitabine o irinotecán (Figura 12), así como con anticuerpos monoclonales. El oxaliplatino es un ejemplo interesante acerca de las ventajas de combinar investigación básica y medicina personalizada en la terapia frente al cáncer colorrectal, y para entender el avance que supuso este fármaco para los pacientes de CRC, es necesario hablar en primer lugar de su precursor, el derivado cisplatino.

**Cisplatino** es el nombre común que recibe el complejo *cis*-diaminodicloroplatino(II), cuya estructura se recoge en la Figura 13. El interés de este compuesto reside en que fue el primer compuesto de platino aprobado por la FDA (*Food and Drug Administration*) para su uso en terapia clínica, así como el primer compuesto metálico en ser aprobado como fármaco antitumoral. Los primeros datos acerca del cisplatino datan del siglo XIX, cuando fue descrito por primera vez, pero no sería hasta los años 70 cuando se descubriría su acción anticancerígena.

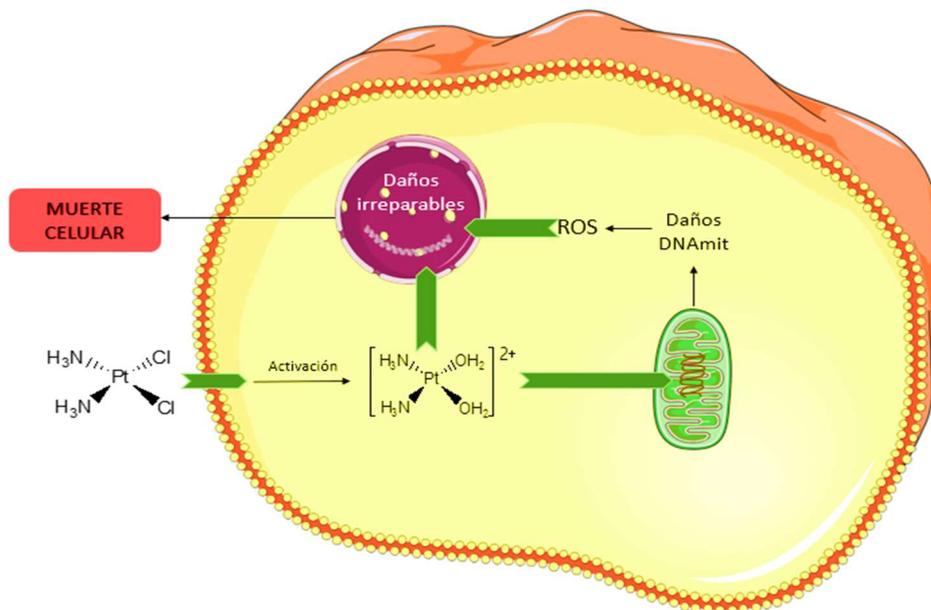


**Figura 13.** Estructura química de los derivados de platino cisplatino y oxaliplatino.

El paso previo a este hallazgo fue un trabajo publicado en 1965 por los investigadores Rosenberg, Van Camp y Krigas, quienes observaron que al administrar este compuesto a un cultivo de la bacteria *Escherichia coli* se lograba reducir su crecimiento, puesto que el cisplatino impedía la división celular<sup>100</sup>. Dada la alta tasa de proliferación de las células tumorales, se planteó la posibilidad de que este compuesto actuase de manera similar a la observada sobre un cultivo de células humanas cancerosas. Así, se llevaron a cabo diversas investigaciones acerca del potencial antitumoral del cisplatino sobre distintos modelos tumorales, obteniéndose resultados muy prometedores. El gran éxito de los estudios preclínicos llegó cuando se observó un descenso del crecimiento de la masa tumoral en un modelo animal, lo que abrió la puerta finalmente a los ensayos en humanos. En esta etapa, no obstante, los resultados fueron agrídulces. Por un lado, el cisplatino mostraba una alta tasa de eficacia sobre distintos tipos de tumores, tal y como cabía esperar tras los estudios previos. Sin embargo, resultaba muy tóxico para los tejidos sanos, produciendo una amplia gama de efectos secundarios entre los que destacaban los daños a nivel renal y neurológico. La alegría inicial que supuso el descubrimiento del cisplatino se enfrió al observar el descenso en la calidad de vida de los pacientes a los que se les administraba<sup>85,101</sup>.

La razón por la cual el cisplatino resulta a la vez tan potente y dañino reside en su mecanismo de acción (Figura 14). Este complejo es inicialmente inactivo, y no será hasta que entre a la célula y sufra una reacción de acuación cuando será capaz de llevar a cabo su efecto biológico. En la acuación, uno o los dos ligandos cloro de la molécula son reemplazados por sendas moléculas de H<sub>2</sub>O. Este proceso ocurre espontáneamente debido a la baja concentración del ion cloruro en el interior de la célula. La especie resultante de sustituir los ligandos cloruro por moléculas de agua posee dos cargas positivas, por lo que siente una fuerte atracción por los grupos fosfato que forman parte de las cadenas de ADN. La afinidad entre el cisplatino y las bases nitrogenadas es

especialmente intensa en el caso de la guanina, con la que se une de forma covalente a través del N7 del anillo imidazol. La interacción entre el cisplatino y las bases nitrogenadas tiene como primera consecuencia la formación de un monoadducto. Los monoadductos pueden derivar en cruzamientos intra o interhebra, en caso de que se establezca una segunda interacción entre el fármaco y otra base nitrogenada. La formación de estos aductos genera torsión sobre la doble hebra de ADN, lo que le causa serios daños y es la principal causa de la muerte de la célula<sup>85,102</sup>. Aunque la célula normalmente cuenta con sistemas que reconocen específicamente los aductos ADN-cisplatino y puede eliminarlos, algunos tumores poseen deficiencias en este sistema. Es por ello que unos tipos de cáncer van a responder mucho mejor a la terapia con cisplatino que otros<sup>85</sup>. Entre los tumores sobre los que es activo el cisplatino se encuentran algunos subtipos de cáncer de ovario, próstata, mama y cabeza y cuello. Sin embargo, no se utiliza de forma habitual frente al CRC dado su escaso efecto<sup>103</sup>.



**Figura 14.** Esquemización del mecanismo de acción del cisplatino en la célula tumoral. Tras intercambiar los ligandos cloruro por moléculas de agua, se acumula en el núcleo y en la mitocondria, formando aductos tanto con el ADN genómico como con el mitocondrial. Los daños causados en el ADN mitocondrial inducen un fallo en el funcionamiento normal de la mitocondria, que tiene como consecuencia una producción excesiva de ROS. El estrés oxidativo induce, a su vez, daños sobre el ADN genómico, que ya se encontraba alterado por la previa formación de aductos con el fármaco. Esto conduce finalmente a la muerte de la célula.

La formación del monoadducto inicial no siempre conduce a un cruzamiento intra o interhebra, ya que existe la posibilidad de que se forme un aducto ADN-cisplatino-proteína, debido a la atracción entre el fármaco activado y los grupos tiol de las proteínas. Las proteínas que intervienen en esta clase de aductos son las que normalmente se encuentran en estrecha conexión con el ADN, entre ellas las histonas, y estos aductos terciarios bloquean el acceso al resto de proteínas que deben

interaccionar con el ADN. Por ello, se impiden procesos como la replicación o la reparación del ADN, contribuyendo a la muerte de la célula<sup>85,104</sup>.

La atracción entre el ADN y el cisplatino no se limita al ADN genómico, sino que el ADN mitocondrial también es susceptible de formar aductos con el fármaco. Esto genera un fallo en este orgánulo que da lugar a altos niveles de especies reactivas de oxígeno. El estrés oxidativo induce daños sobre distintas estructuras celulares, siendo uno de los más graves el generado sobre el ADN<sup>105</sup>. Las células tumorales, además, son especialmente sensibles a la ruptura de su homeostasis redox, ya que generan una mayor proporción de ROS que una célula sana por su alta tasa de proliferación. Para compensar esta producción excesiva, sus defensas antioxidantes están sobreexpresadas en comparación con las de una célula no tumoral, pero se establece así un equilibrio muy delicado cuya ruptura tiene como consecuencia inevitable la muerte de la célula tumoral<sup>106</sup>. Se ha observado que el estrés oxidativo que se genera en respuesta a este tratamiento es un componente necesario para la muerte de la célula tumoral inducida por el cisplatino junto con la formación de aductos con el ADN (Figura 14)<sup>107</sup>.

Retomando las consideraciones iniciales en relación a la importancia de que un fármaco sea al mismo tiempo efectivo y selectivo, no debe resultar sorprendente que el uso clínico del cisplatino se vea limitado por sus graves efectos secundarios. Al estar su mecanismo de acción basado en su atracción por las bases nitrogenadas del ADN y en la producción de estrés oxidativo, que está mediada a su vez por su capacidad de dañar al ADN mitocondrial, no se dirige contra una diana molecular exclusiva de la célula tumoral, ya que esta macromolécula está presente en todas y cada una de las células del organismo. Se trata, pues, de un compuesto con una selectividad prácticamente nula. Por ello, causará serios daños sobre células cuya tasa de proliferación sea alta y, además, en las que sean especialmente sensibles al estrés oxidativo. Según se adelantaba en el apartado 1.2, los daños en el ADN tienen como consecuencia un cese del avance en el ciclo celular en la fase G<sub>2</sub>/M, lo que se corresponde con graves alteraciones a nivel celular<sup>52</sup>. La Tabla 3 recoge las principales estructuras afectadas por la terapia con cisplatino. A estos efectos secundarios consecuencia de un tratamiento de duración determinada, debe añadirseles el riesgo de que la terapia dé lugar a nuevos tumores, en especial leucemias, dado el potencial efecto mutágeno del fármaco a largo plazo<sup>53,54</sup>.

**Tabla 3.** Resumen de las principales regiones del organismo afectadas por el cisplatino y de las consecuencias que ello conlleva para el paciente.

REGIÓN AFECTADA	CONSECUENCIA	REFERENCIA
CÉLULAS DE LA CÓCLEA	Pérdida irreversible de la audición	Sheth <i>et al.</i> <sup>108</sup>
CÉLULAS TUBULARES RENALES	Insuficiencia renal aguda	Volarevic <i>et al.</i> <sup>109</sup>
CÉLULAS MADRE HEMATOPOYÉTICAS DE LA MÉDULA ÓSEA	Mielosupresión	Basu <i>et al.</i> <sup>53</sup>
CÉLULAS EPITELIALES DEL TRACTO GASTROINTESTINAL	Trastornos gastrointestinales: mucositis, náuseas, diarrea, malabsorción, etc.	Shahid <i>et al.</i> <sup>110</sup>

Además de que su uso clínico implique serios riesgos para la salud del paciente, existe un problema adicional a la terapia con cisplatino: la creciente resistencia de los tumores al tratamiento. Como su propio nombre indica, la resistencia a un medicamento supone una pérdida de su capacidad farmacológica debido al desarrollo de mecanismos adaptativos por parte de la célula tumoral. La resistencia a un medicamento puede ser intrínseca o adquirida. La primera clase implica que el tumor jamás responderá a ese tratamiento; en el segundo caso, el tratamiento funcionaría inicialmente, pero pasado un tiempo perdería su efecto por completo. Esto es un fenómeno frecuente en los tumores que reaparecen tras una remisión inicial<sup>111</sup>. En este punto, resulta interesante introducir los conceptos de quimioterapia de primera elección y quimioterapia de segunda elección, ya que esta última es a la que se recurre cuando falla la primera opción, frecuentemente en relación a la aparición de resistencias.

En el caso concreto del cisplatino, existen varias estrategias que las células tumorales pueden llevar a cabo para sobrevivir a la terapia<sup>83-85</sup>, entre las que se encuentran:

- Sobreexpresión de los sistemas de reparación del ADN: se incrementan los niveles de expresión de aquellas proteínas que reconocen y eliminan los aductos cisplatino-ADN, evitando el daño y, en consecuencia, la muerte celular.
- Descenso en los niveles de expresión del transportador que permite la entrada en la célula del cisplatino: con esto, la célula logra una menor concentración intracelular del fármaco, lo que disminuye su efecto antitumoral.
- Aumento en la expresión de transportadores de membrana que expulsan al cisplatino del interior celular: el efecto final es el mismo que en el caso anterior.

- Inactivación mediante la conjugación con glutatión o metalotioneínas: esta propiedad se basa en la capacidad del complejo de establecer uniones no específicas con diversas estructuras del interior celular, entre las que se encuentran, como se ha mencionado anteriormente, las proteínas. Los aductos resultantes no son tóxicos para la célula.
- Desregulación de la maquinaria apoptótica: según se adelantaba en el apartado 1.2, algunos tumores pueden desarrollar una pérdida de sensibilidad a la muerte vía apoptosis en respuesta a una exposición prolongada a un medicamento<sup>66,67</sup>. En el caso concreto del cisplatino, los mecanismos más habituales son los que implican la ruptura del equilibrio entre proteínas pro y anti-apoptóticas.

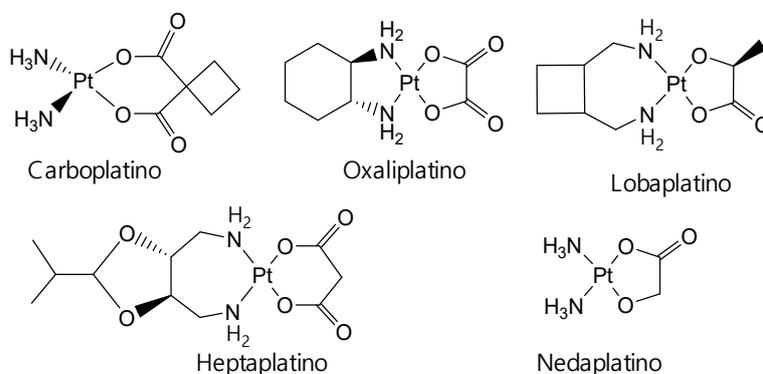
## 1.4. BÚSQUEDA DE SOLUCIONES A LAS LIMITACIONES DEL CISPLATINO

A la vista de los problemas derivados del uso clínico del cisplatino, durante los últimos años se han llevado a cabo numerosos intentos con el fin de reducir sus efectos secundarios y/o evitar la resistencia adquirida por los tumores. Estas estrategias podrían englobarse en tres grupos: uso de nanoportadores, diseño de análogos a partir de modificaciones de la estructura química del cisplatino y desarrollo de terapias combinatorias.

El objetivo de los nanoportadores o *nanocarriers* consiste en facilitar la llegada del fármaco al microentorno tumoral. Con esto se consigue, por un lado, maximizar la cantidad del agente quimioterápico que entra en las células cancerígenas, con lo que la eficacia del tratamiento aumenta considerablemente. Por otro, se reduce la concentración de fármaco en el resto de tejidos, para disminuir los efectos secundarios. Existen otras ventajas al margen de estos dos puntos clave, entre las que se encuentran aumentar la vida útil del fármaco, puesto que su exposición a agentes reductores y/u oxidantes se ve reducida, o facilitar su entrada en la célula, especialmente útil para moléculas con un marcado carácter hidrófilo<sup>112</sup>. Un ejemplo de *nanocarrier* que ha sido fruto de numerosas investigaciones durante los últimos años son las nanopartículas de oro, ya que presentan una serie de propiedades que las hace muy interesantes para el transporte de fármacos quimioterapéuticos en el organismo. Destaca su capacidad de funcionalizarlas para maximizar su concentración en el microentorno tumoral<sup>113</sup>. El uso de nanopartículas de oro para mejorar la terapia con cisplatino permite aumentar la eficacia del tratamiento a la par que reducir sus efectos secundarios<sup>114-117</sup>. No obstante, los *nanocarriers* también pueden dar problemas por su toxicidad intrínseca<sup>118</sup>, por lo que esta estrategia todavía debe ser optimizada para poder utilizar con seguridad a aquellos agentes quimioterapéuticos que, como el cisplatino, sean potencialmente dañinos para los tejidos sanos.

Por otra parte, modificar la estructura química del cisplatino para reducir sus efectos secundarios ha conducido a la síntesis de toda una serie de análogos del mismo, algunos de los cuales han sido aprobados por la FDA y posteriormente a nivel mundial (carboplatino y oxaliplatino), mientras que otros son utilizados en países concretos (lobaplatino en China, heptaplatino en Corea del Sur y nedaplatino en Japón) (Figura 15). La primera oleada de análogos del cisplatino que se desarrollaron tras el descubrimiento de sus propiedades antitumorales en los años 60 se denominaron análogos de segunda generación, entre los que destaca el carboplatino. Este complejo se diferencia de su predecesor en que los ligandos cloruro fueron sustituidos por el ligando bidentado del tipo dicarboxilato que le confiere mayor estabilidad al formar un quelato. Su efecto antitumoral es comparable al del cisplatino, pero sus efectos secundarios son menores, especialmente a nivel hematológico. No obstante, el carboplatino no responde igual de

bien frente a todos los tipos de tumores que sí se ven afectados por el tratamiento con cisplatino<sup>119,120</sup>. Por consiguiente, se continuaron sintetizando análogos del cisplatino, llegando así a la denominada tercera generación de análogos. De los análogos de tercera generación se va a resaltar al oxaliplatino, puesto que, este complejo es ampliamente utilizado en el tratamiento del cáncer colorrectal (ver apartado 1.3; Figura 11).



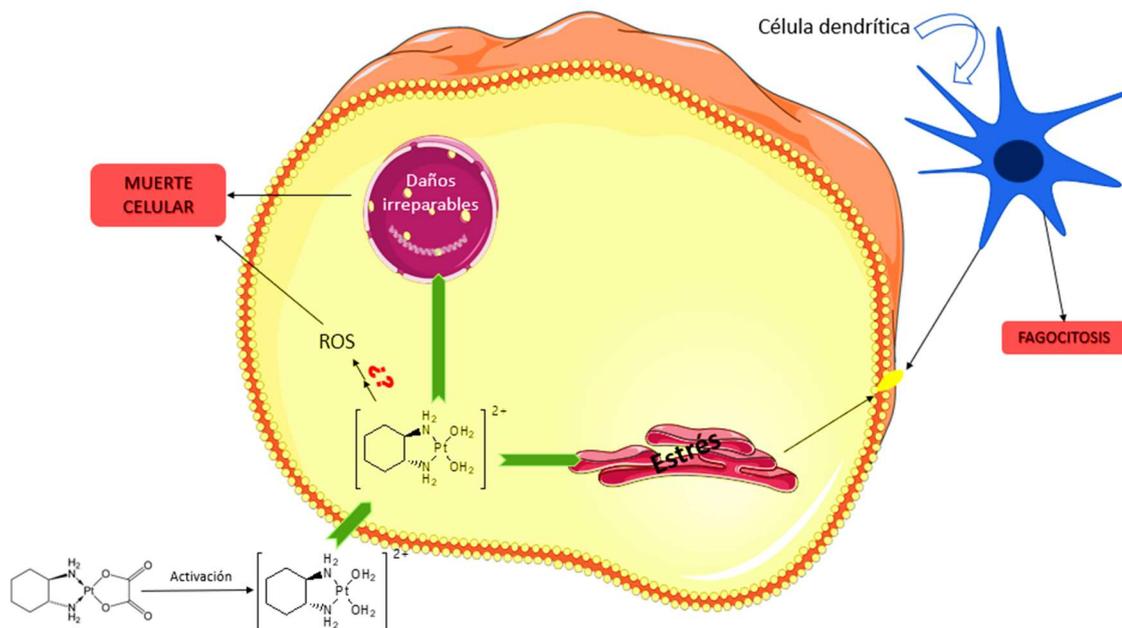
**Figura 15.** Estructuras de los diferentes análogos del cisplatino.

El **oxaliplatino** presenta diferencias significativas respecto a la sencilla estructura química de su predecesor. En primer lugar, los ligandos amoniaco del cisplatino son sustituidos por el ligando bidentado diaminociclohexano, mientras que los dos átomos de cloro son reemplazados por el anión oxalato. Dicho anión resulta clave para su funcionamiento, ya que en plasma es reemplazado y permite la activación de la molécula, lo que en el caso de su predecesor ocurría en el interior celular con la reacción de acuación. En cuanto a su mecanismo de acción (Figura 16), el oxaliplatino activado siente la misma atracción por las bases nitrogenadas del ADN que el cisplatino, por lo que va a formar aductos y cruzamientos intra e interhebras de igual manera. El efecto final, por lo tanto, será dañar el ADN e impedir su replicación y reparación. Sin embargo, la presencia del ligando diaminociclohexano en la molécula de oxaliplatino es la responsable de que este fármaco ocasione una mayor torsión sobre la hebra de ADN, causando lesiones más severas que el cisplatino y resultando, en consecuencia, un quimioterápico más activo. Curiosamente, el oxaliplatino forma menos aductos con el ADN que el cisplatino, lo cual es indicativo de la existencia de otros mecanismos de acción adicionales<sup>121,122</sup>.

Dado que, según se mencionaba anteriormente, la inducción de estrés oxidativo es fundamental para el mecanismo de acción del cisplatino (ver apartado 1.3, pág. 45; Figura 14), cabría pensar que su análogo oxaliplatino podría igualmente causar una ruptura del equilibrio redox como parte de su efecto anticancerígeno, especialmente si se tiene en cuenta la existencia de los mecanismos de acción adicionales a la formación de aductos con el ADN. No obstante, se han realizado escasas investigaciones a este respecto. De acuerdo con la Figura 11 (apartado 1.3, pág. 46), es habitual administrar al oxaliplatino en combinación con anticuerpos monoclonales para el tratamiento de

tumores en el estadio IV, si bien puede observarse que, curiosamente, el anticuerpo cetuximab es el único que nunca se administra junto con el régimen FOLFOX. Esto es debido a que dicho anticuerpo bloquea la producción de ROS inducida por el oxaliplatino, que es necesaria para que éste cause la muerte a la célula tumoral<sup>123</sup>. Este trabajo permite concluir que la generación de estrés oxidativo también es un componente esencial del efecto anticancerígeno del oxaliplatino, al igual que ocurría con su predecesor. No obstante, esto también parece estar detrás, al menos en parte, de sus efectos secundarios sobre los tejidos sanos, que se desarrollarán más adelante<sup>124</sup>. Finalmente, no se ha esclarecido el origen de las ROS generadas en respuesta al tratamiento con oxaliplatino. En la línea celular HT-29, un modelo de cáncer de colon, no se observó una alteración de la función mitocondrial ni un incremento de los niveles intracelulares del radical superóxido, un radical libre que pertenece al grupo de especies reactivas de oxígeno, tras una incubación con oxaliplatino<sup>125</sup>; curiosamente, sí se produjo una despolarización de la mitocondria en otro modelo de cáncer de colon (línea celular HCT15)<sup>126</sup>, lo que sugiere que la producción de ROS causada por el oxaliplatino podría ser dependiente del perfil bioquímico del tumor.

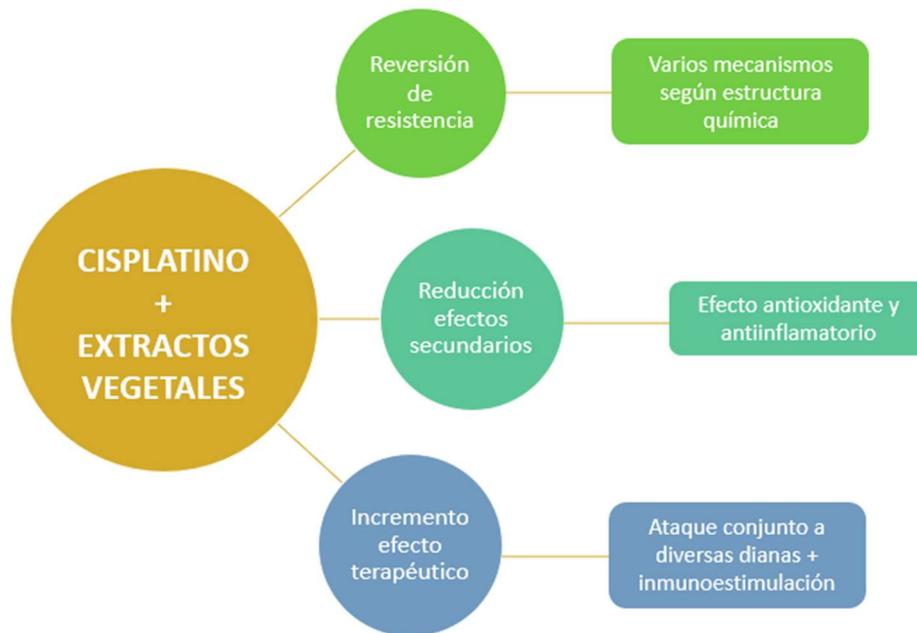
Pero además de los dos anteriores, el oxaliplatino posee un tercer e interesante mecanismo de acción antitumoral (Figura 16): es capaz de estimular al sistema inmune para que elimine a las células tumorales. Esta es una característica que este fármaco no comparte con el cisplatino, y aunque las razones de esta divergencia no se comprenden hasta la fecha, se sabe que está mediado por la traslocación de la proteína calreticulina del retículo endoplasmático a la membrana plasmática. La calreticulina actúa como receptor para las células dendríticas, que se activan en la región tumoral por la alta cantidad de ATP presente en el microentorno tumoral, liberado por las células cancerosas que han muerto previamente por la acción del oxaliplatino. Así, en aquellos pacientes que cuenten con un sistema inmune que funciona correctamente, se va a contar con una ventaja adicional al tratamiento con oxaliplatino respecto a la terapia con cisplatino<sup>121,127</sup>.



**Figura 16.** Esquematización del mecanismo de acción del oxaliplatino en la célula tumoral. Tras ser activado en el exterior celular, se acumula en el núcleo y forma aductos con el ADN genómico, una de las causas de la muerte celular. Además, por mecanismos todavía por determinar, induce una sobreproducción de ROS que contribuye asimismo a la muerte celular. Finalmente, causa estrés en el retículo endoplasmático, lo que tiene como consecuencia la traslocación de la calreticulina de la membrana de este orgánulo a la membrana plasmática. Esto actúa como señal para las células dendríticas del sistema inmune, que fagocitarán a la célula tumoral, constituyendo así una vía de eliminación alternativa a la muerte celular.

Según se apuntaba anteriormente, el oxaliplatino, a diferencia del cisplatino, resulta muy eficaz contra el CRC y es una opción habitual en la quimioterapia adyuvante de primera elección (ver apartado 1.3, pág. 46; Figura 11). Pero, al igual que ocurría con su predecesor, el uso clínico de este fármaco está limitado por sus efectos secundarios y la aparición de resistencias. Los efectos secundarios son menos severos que los del cisplatino, lo que lo convierte en un medicamento relativamente más seguro, pero afecta principalmente a las células del tracto gastrointestinal y a las de la médula ósea, causando los mismos efectos que el cisplatino descritos en la Tabla 3 (apartado 1.3, pág. 49), aunque los signos clínicos son menos graves. También se produce neuropatía periférica, aunque suele ser un trastorno reversible en la mayoría de los casos<sup>121</sup>. El mayor problema asociado al uso terapéutico del oxaliplatino lo supone la aparición de resistencia tras un tiempo de tratamiento prolongado. A grandes rasgos, los mecanismos de resistencia desarrollados por las células tumorales son los previamente descritos para el cisplatino<sup>128</sup>. Una de las maneras más eficaces para aumentar la sensibilidad de los tumores al oxaliplatino consiste en administrarlo conjuntamente con otros fármacos, por lo que es habitual que este compuesto sea parte de cócteles de medicamentos en lugar de ser suministrado como fármaco único<sup>121</sup>.

Este concepto de cócteles de fármacos nos devuelve a las estrategias enfocadas a la mejora de las propiedades clínicas del cisplatino. Aunque a nivel clínico se ha hecho más hincapié en el desarrollo de nuevos cócteles de fármacos que contengan cisplatino<sup>129-132</sup>, en la presente memoria se va a optar por desarrollar el potencial de los **extractos vegetales** como coadyuvantes del cisplatino, ya que en estudios preclínicos se ha observado que la administración conjunta del cisplatino con extractos de plantas o con fitomoléculas concretas y purificadas ha resultado poseer diversos efectos inesperados que podrían resultar de gran utilidad en la práctica clínica. Se trata de la reversión de resistencia al cisplatino, la reducción de daño en los tejidos sanos y el incremento de su potencial antitumoral (Figura 17).



**Figura 17.** Efectos beneficiosos del uso de extractos vegetales junto con cisplatino.

Anteriormente, se ha discutido acerca del papel preventivo de una dieta rica en frutas y verduras frente al desarrollo del cáncer colorrectal, haciéndose hincapié en la acción de fibra y polifenoles (ver apartado 1.1., pág. 30; Figura 5). Pues bien, el papel de los polifenoles no se limita a la prevención, sino que se ha observado que pueden ser de gran utilidad una vez que la transformación ha tenido lugar. El potencial terapéutico de los polifenoles se basa, en primer lugar, en su efecto antioxidante, antiinflamatorio y prebiótico, ya que pueden contribuir a la reducción del ambiente prooxidante y proinflamatorio que requiere la masa tumoral para su proliferación, así como a corregir una situación de disbiosis. La alteración del microentorno tumoral provocará el cese del crecimiento de la masa tumoral como consecuencia<sup>133</sup>, lo que podría mejorar el efecto terapéutico de la quimioterapia adyuvante. Por otra parte, los extractos vegetales ricos en polifenoles son capaces de inducir la muerte de las células tumorales de forma directa actuando sobre diversas dianas moleculares<sup>134-137</sup>.

Gracias al uso de extractos vegetales, se ha logrado recuperar la sensibilidad al cisplatino en líneas celulares que no respondían al tratamiento, como la A549/DPP de cáncer de pulmón. El tratamiento de este modelo tumoral con un cóctel de cisplatino y compuestos bioactivos derivados de plantas tales como el ácido salvianólico A<sup>138</sup> o la epicatequina-3-galato<sup>139</sup>, son capaces de sensibilizar de nuevo a las células a la terapia. El mecanismo según el cual cada compuesto bioactivo es capaz de revertir la resistencia varía en cada caso, debido a las diferencias estructurales y químicas de los mismos. Por entrar más en detalle en alguno de dichos mecanismos, se citará a modo de ejemplo el caso descrito por Sharma *et al.*<sup>140</sup> Estos investigadores se centraron en inhibir al citocromo P450 1B1, puesto que su sobreexpresión ha sido identificada como una de las causas por las que las células tumorales pueden desarrollar resistencia al cisplatino. Investigaron el efecto de un extracto de *Glycyrrhiza glabra* sobre el efecto terapéutico del cisplatino en la línea de cáncer de mama resistente a este fármaco MDA-MB-468 y observaron una recuperación de la sensibilidad al mismo. Posteriormente, se centraron en identificar cuál o cuáles de los fitocomponentes del extracto era capaz de inhibir al citocromo P450 1B1 y por consiguiente era el principal responsable de esta reversión de la resistencia. Mediante determinaciones de actividad enzimática y ensayos bioinformáticos, se concluyó que la quercetina era el compuesto bioactivo que más posibilidades tenía de ser el causante del efecto observado. Sinha *et al.*<sup>141</sup> se centraron en otro mecanismo que confiere resistencia al cisplatino en cáncer de mama: la hiperprolactinemia. Para ello, analizaron el efecto de un extracto de *Mucuna pruriens*, dado que entre sus componentes se encuentra un precursor de la dopamina capaz de inhibir la producción de la prolactina. Trabajaron con varios modelos de cáncer de mama, aunque en este caso observaron que su combinación extracto vegetal-cisplatino resultaba más eficaz en líneas celulares que, como la MCF-7, sí expresasen el receptor de estrógenos, mientras que otras que no lo expresan como la ya citada MDA-MB-468 respondían peor al cóctel. Por consiguiente, estos dos estudios apoyan una vez más la hipótesis planteada en el apartado 1.3. acerca de la necesidad de combinar investigación básica y medicina personalizada para dar con la opción terapéutica más adecuada para cada caso.

Por otro lado, el empleo de extractos vegetales en la práctica clínica podría contribuir a una mejora de las condiciones de vida de los pacientes sometidos a tratamientos quimioterapéuticos, ya que se ha observado que pueden reducir sus efectos negativos sobre los tejidos sanos. En experimentos realizados sobre animales sanos, Brahmi *et al.* demostraron que el pre-tratamiento con extractos de cladodio de cactus dos semanas antes de la administración de cisplatino reducía los daños a nivel renal causados por el fármaco. Los autores consideraron que este efecto protector estaba mediado principalmente por las propiedades antioxidantes de los extractos<sup>142</sup>. Rjeibi *et al.* encontraron resultados similares no solo a nivel renal sino también hepático al administrar un extracto de hojas de cambrónera (*Lycium europaeum*) a ratones sanos. De nuevo, los autores apuntaron al efecto beneficioso de los extractos sobre la defensa

antioxidante como principal responsable de la protección, ya que observaron que, si bien el tratamiento con cisplatino disminuye la actividad de enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa o la catalasa, la administración de extractos vegetales puede revertirlo, protegiendo a los tejidos frente al daño oxidativo<sup>143</sup>. Otros autores sugieren que el efecto antiinflamatorio de los extractos vegetales también puede tener una implicación clave en este papel protector, puesto que reducen la infiltración de leucocitos en la zona y reducen los niveles de compuestos pro-inflamatorios<sup>144</sup>. El efecto protector de los extractos vegetales frente al daño causado por el cisplatino en tejidos no tumorales no se limita a las zonas comúnmente más afectadas por los fármacos quimioterapéuticos, sino que es extensible a otras zonas del organismo como el sistema inmune<sup>145</sup>, los testículos<sup>146,147</sup> o el corazón<sup>148,149</sup>. Uno de estos estudios centrados en la protección frente a la cardiotoxicidad resulta especialmente interesante, ya que los autores observaron que la administración de extracto de té verde, si bien protegía frente a los daños a nivel cardíaco causados por el cisplatino, no interfería sobre el efecto antitumoral del fármaco<sup>149</sup>. Es decir, aunque las propiedades clínicas del fármaco no parecen verse afectadas por la administración conjunta del extracto vegetal, sí puede obtenerse un beneficio en cuanto a la reducción de sus efectos secundarios. Teniendo en cuenta que el cisplatino es un agente quimioterapéutico muy potente, pero que su uso es limitado por los daños que produce, el hecho de poder reducir sus efectos secundarios sin alterar su efecto antitumoral resulta de lo más prometedor. Finalmente, a pesar de que estos estudios todavía no han sido validados sobre pacientes humanos, un estudio preliminar reveló que el consumo diario de 160 mg de jengibre podría tener propiedades beneficiosas para controlar las náuseas inducidas por el tratamiento con cisplatino en mujeres y en pacientes de cáncer de cuello y cabeza<sup>150</sup>. Por tanto, son necesarias futuras investigaciones en este campo.

Finalmente, es posible recurrir a los extractos vegetales para aumentar el efecto terapéutico del cisplatino sobre tumores que no son resistentes a este compuesto. Se produce así un efecto aditivo o sinérgico entre ambos fármacos debido a las diferentes dianas terapéuticas de los mismos. Nguyen *et al.* analizaron el efecto de un extracto de flor de hibisco sobre la línea celular MDA-MB-231 como un modelo del cáncer de mama triple negativo, uno de los subtipos que poseen una peor prognosis. En primer lugar, los autores observaron que este extracto era capaz de inducir la muerte por apoptosis de las células, estando mediado el proceso por un incremento del estrés oxidativo. A continuación, administraron conjuntamente este extracto en una concentración fija con concentraciones variables de cisplatino, observándose un aumento del efecto terapéutico en comparación con el uso del fármaco metálico solo<sup>151</sup>. Estudios realizados sobre modelos animales han revelado que el uso conjunto de estas dos clases de fármacos podría tener otros efectos beneficiosos, al margen de causar la muerte de las células tumorales, que contribuyesen a su vez a la reducción de la masa tumoral. La administración conjunta del diterpeno ácido carnósico y cisplatino sobre un modelo animal de carcinoma pulmonar de Lewis resultó ser más efectiva que los fármacos por

separado. Los autores observaron un aumento de la actividad de los linfocitos T CD8 en los animales tratados con ácido carnósico, de lo que dedujeron que el mayor efecto antitumoral de la combinación de fármacos podría estar debido a este efecto inmunoestimulante del diterpeno<sup>152</sup>. En definitiva, el uso conjunto de extractos vegetales, o bien fitomoléculas aisladas, podría permitir reducir la cantidad de cisplatino necesaria para tener un efecto antitumoral destacable, lo que en la práctica clínica podría traducirse en una menor posibilidad de sufrir efectos secundarios a largo plazo causados por la acumulación del fármaco en tejidos sanos.

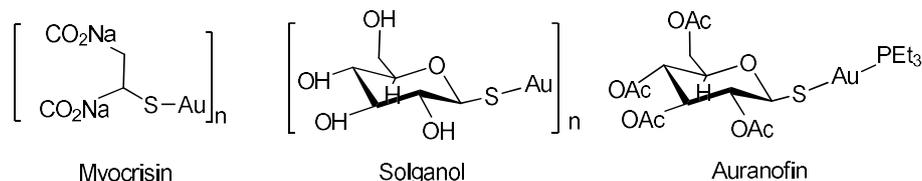
De todo lo anterior se deduce que las opciones terapéuticas actuales distan mucho de ser perfectas, pero es cierto que desde el descubrimiento de las propiedades anticancerígenas del cisplatino hasta el momento presente se ha avanzado a grandes pasos en el campo de la química inorgánica para desarrollar nuevos medicamentos que no solo sean efectivos sino además selectivos. Lo más importante, el cisplatino abrió el camino al uso de complejos metálicos con fines quimioterapéuticos, lo que ha multiplicado las opciones a la hora de diseñar y sintetizar nuevos medicamentos que se acerquen cada día más al ideal de la medicina personalizada.

## 1.5. USO DEL ORO EN MEDICINA. DESCUBRIMIENTO DE LAS PROPIEDADES ANTITUMORALES DEL AURANOFIN

Entre la amplia gama de metales a los que puede recurrir la quimioterapia, el oro ocupa un lugar destacado. La relación entre el oro y la medicina viene de lejos, puesto que las primeras pruebas que se tienen acerca de su uso con fines terapéuticos datan del año 3000 a.c. aproximadamente. Los primeros registros acerca del uso del oro con fines no ornamentales aparecen en la cultura egipcia, si bien se le atribuían propiedades más místicas que terapéuticas, en relación al mantenimiento de la juventud y la vitalidad. Mejor documentada está la práctica médica en la antigua China, ya que se describen con detalle distintos remedios que incluían oro para tratar diversas afecciones, como el uso de polvo de oro para sanar heridas. Otras interesantes propiedades que se le atribuían estaban relacionadas con el alivio de la tos o la cura de la fiebre tifoidea<sup>153,154</sup>.

No obstante, con el paso de los años las propiedades que realmente pudiese tener el oro sobre el organismo se perdieron en favor de un retorno a este misticismo que cultivaban los antiguos egipcios. Durante la Edad Media, los alquimistas volvieron a pensar en el oro como la clave de la juventud eterna, y buscaron nuevos métodos para obtener el mayor grado de pureza del metal, así como intentos de transmutar otros metales en oro. Evidentemente, estos intentos quedaron en nada, y en el siglo XV se retomó el estudio de las propiedades médicas del oro, aunque no sería hasta algunos siglos después cuando se lograsen avances significativos en este campo. El primer hallazgo realmente científico acerca del potencial terapéutico del oro recae sobre Robert Koch y su descubrimiento de las propiedades bacteriostáticas del complejo de oro(III)  $K[Au(CN)_2]$ <sup>155</sup>. Su estudio resultó de gran relevancia, dado que escogió como modelo bacteriano al bacilo de la tuberculosis, el causante de una de las grandes epidemias de la época, ya que en el siglo XIX la tuberculosis era la primera causa de muerte en Estados Unidos<sup>156</sup>. No obstante, los ensayos sobre pacientes revelaron que este compuesto no solo no era efectivo frente al bacilo *in vivo*, sino que además resultaba muy tóxico, por lo que se dejó de administrar pasados unos años. De igual manera que la medicina moderna ha intentado reducir la toxicidad del cisplatino diseñando nuevos análogos, la lucha contra la tuberculosis en el siglo XX buscó nuevos compuestos de oro cuyo uso clínico resultase más seguro. Si bien se terminó descartando esta investigación por infructuosa, se observó que algunos pacientes a los que se les administraban tiolato derivados de oro(I) notaban una mejoría en el dolor articular. Esto hizo sospechar a los investigadores de la época que sus complejos podrían tener una aplicación en medicina alejada de la que habían buscado inicialmente, así que se abrió una nueva vía de investigación en el campo de la artritis reumatoide. A diferencia de lo que había ocurrido en el tratamiento de la tuberculosis, frente a esta otra enfermedad se obtuvieron éxitos notables<sup>157-159</sup>. Algunos de los principales

complejos de oro que se han utilizado en la práctica clínica por sus beneficios frente a la artritis reumatoide se muestran en la Figura 18.



**Figura 18.** Estructura de una serie de complejos de oro(I) utilizados en el tratamiento de la artritis reumatoide.

Se acuñó así el término “**crisoterapia**”, que hace referencia precisamente al uso de complejos de oro en medicina. Los que se muestran en la Figura 18 son una serie de tiolatos de oro(I) que pertenecen al grupo de medicamentos antirreumáticos modificadores de la enfermedad o DMARDs (*Disease-Modifying Antirheumatic Drugs*). A pesar de que los DMARDs no hacen desaparecer la enfermedad, tienen un efecto beneficioso retrasando su curso natural. En el caso concreto de los complejos recogidos en la Figura 18, su administración intravenosa reducía los síntomas asociados a la enfermedad gracias a su efecto antiinflamatorio. Los primeros en ser comercializados fueron el tiosulfato sódico de oro o Miocrisina™ y la aurotioglucosa o Solganol™, pero su uso no reportó grandes beneficios para los pacientes porque ejercían su efecto terapéutico a largo plazo, lo cual aumentaba el riesgo de sufrir efectos secundarios, entre los que destacaban nefrotoxicidad y diversos problemas cutáneos<sup>158-160</sup>. El desarrollo del **auranofin** (2,3,4,6-tetra-6-acetil-1-tio-β-D-glucopiranosato-S-trifenilfosfina oro(I)) supuso un gran avance en el campo de la crisoterapia, aunque en su momento no se pudiese intuir la repercusión que este compuesto acabaría teniendo en la medicina moderna.

Al igual que sus predecesores, el auranofin posee un centro metálico de oro(I), aunque presenta la novedad de tener dos ligandos coordinados al mismo: una molécula de trietilfosfina y un grupo tiolato de tipo carbohidrato (tioglucosa). La fosfina le dota de carácter lipófilo, por lo que tiene una mayor solubilidad que los complejos anteriores, lo que permitió que fuese administrado por vía oral en lugar de intravenosa. Pero, aunque su toxicidad sobre los tejidos sanos fuese menor que la mostrada por sus predecesores, su efecto terapéutico también era menos acusado. Por ello, se fue reduciendo su uso frente a la artritis reumatoide<sup>158,159</sup>.

No obstante, se observó una menor predisposición al desarrollo de tumores en aquellos pacientes de artritis reumatoide que habían sido tratados con auranofin<sup>161</sup>. Este hecho, junto con el descubrimiento de las propiedades antitumorales del cisplatino y sus análogos, animó a los investigadores a evaluar el efecto del auranofin sobre diversas líneas tumorales<sup>162-167</sup>, encontrándose resultados esperanzadores que condujeron a resultados *in vivo*. Así, se comenzaron a sintetizar nuevos análogos de este

complejo y se continuaron los ensayos, llegándose a la conclusión de que el oro podría tener un futuro muy prometedor en la lucha contra el cáncer<sup>158,159</sup>.

El oro puede presentar varios estados de oxidación, siendo los estados I y III los únicos en los que es estable en un medio acuoso, por lo que son los más interesantes de cara a diseñar fármacos. Los complejos de oro(I) presentan ciertas ventajas frente a los de oro(III), ya que son más estables desde un punto de vista termodinámico y además son menos susceptibles de ser reducidos a oro metálico. No obstante, la síntesis de complejos de oro(III) podría presentar ventajas significativas en el campo de la quimioterapia, puesto que es isoelectrónico con el cisplatino (ambos poseen una configuración electrónica  $d^8$ ), dando una geometría plano cuadrada. Se pensaba, por consiguiente, que los **complejos de oro(III)** podrían poseer un mecanismo de acción similar al del cisplatino, así como un efecto terapéutico comparable<sup>158,159,168</sup>. A pesar de que *a priori* poseen una menor estabilidad que los complejos de oro(I), una adecuada elección de ligandos de coordinación ha permitido sintetizar numerosos derivados de oro(III) con un interesante potencial anticancerígeno, según puede observarse en exhaustivas revisiones bibliográficas realizadas durante los últimos años<sup>168-177</sup>. A pesar de que la presente memoria se va a centrar en el papel antitumoral de los complejos de oro(I), existen algunos puntos interesantes a considerar en cuanto al potencial clínico de los complejos de oro(III). Dadas sus similitudes con el cisplatino, podría pensarse que el uso de estos derivados podría dar lugar igualmente a graves efectos secundarios debido a una hipotética capacidad de interaccionar con el ADN. Aunque sí se han descrito algunos casos en los que la interacción directa con esta macromolécula parece ser uno de sus mecanismos de acción<sup>178-180</sup>, también se han identificado otras dianas moleculares diferentes y de gran interés en terapia. Por ejemplo, destaca la capacidad de algunos derivados de oro(III) de inducir una disminución en los niveles de expresión de la ciclina B1, lo que induce un cese del avance en el ciclo celular en la fase  $G_2/M$ <sup>181</sup>, o la afinidad que muestran otros complejos de esta clase de inhibir a la enzima poli ADP ribosa polimerasa 1 (PARP-1), de modo que pueden bloquear la reparación del ADN<sup>182-184</sup>. Estos estudios muestran que, a pesar de las características que comparten el cisplatino y los complejos de oro(III), estos últimos tienen un mayor potencial antitumoral en cuanto a las dianas moleculares con las que pueden interaccionar, de modo que poseen un interesante y prometedor futuro en quimioterapia.

Por su parte, el potencial anticancerígeno de los **complejos de oro(I)** ha sido objeto de un mayor número de investigaciones durante los últimos años. Solamente en lo respectivo a su uso frente al cáncer de colon se han publicado alrededor de un centenar de artículos científicos, centrados en la síntesis y caracterización de complejos tanto mononucleares como dinucleares. Los avances más recientes han sido recogidos en una revisión en la que participó la autora de la presente tesis doctoral<sup>113</sup>; en dicho artículo, se detalla el mecanismo de acción de complejos de tipo fosfino derivados mono y dinucleares con fosfinas mono y bidentadas, complejos con ligandos S-dadores, carbeno

derivados, entre los que se cuentan los biscarbano complejos, en su mayoría mononucleares y, por último, los alquil derivados, de los que se incluye un menor número de ejemplos. Además, los ensayos realizados en el marco de esta tesis doctoral se han centrado, principalmente, en el uso de complejos de oro(I) como potenciales agentes quimioterapéuticos frente a cáncer colorrectal.

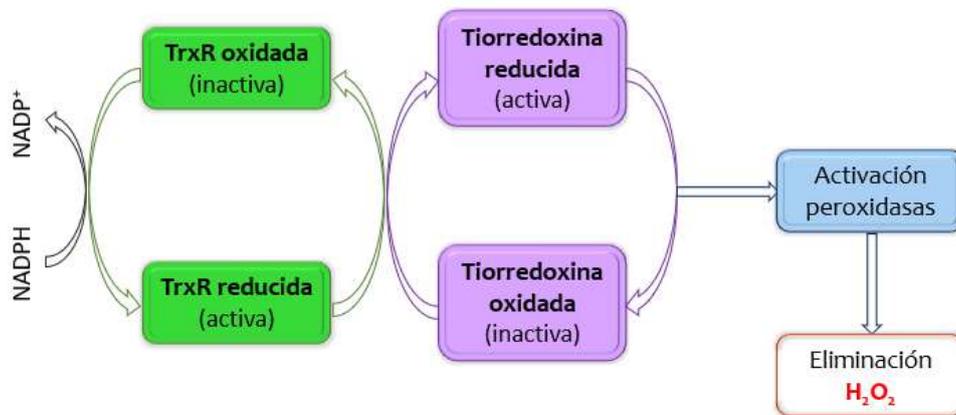
Los complejos de oro(I) presentan de forma general una geometría lineal. El centro metálico puede estar coordinado a diferentes tipos de ligandos para modificar sus propiedades químicas y biológicas. A diferencia de lo que ocurría en el proceso de activación del oxaliplatino, esta clase de complejos no suelen sufrir procesos de acuación; sin embargo, los ligandos pueden intercambiarse por biomoléculas una vez en el interior de la célula<sup>158,159</sup>.

Al ser un ácido blando<sup>185</sup>, el oro(I) siente una especial atracción por los átomos de azufre y selenio, pero no tanta por el nitrógeno como les ocurre a los derivados de platino, ni por el oxígeno. Es por ello que los complejos de oro(I) van a presentar una menor afinidad por el ADN que el cisplatino y sus análogos en condiciones fisiológicas<sup>186</sup>. En su lugar, estos complejos interactúan principalmente con los grupos tiol de proteínas y péptidos, en especial por aquellas que contengan azufre y/o selenio como las selenoproteínas.

Las **selenoproteínas** son un grupo de proteínas que contienen el residuo selenocisteína. La selenocisteína es una modificación del aminoácido esencial cisteína, y dada su importancia en el correcto funcionamiento del organismo, existe una corriente de investigadores que la consideran un aminoácido esencial más. Por lo general, el residuo selenocisteína se localiza en el centro activo de estas proteínas y es clave para su función, que suele estar relacionada con reacciones de oxidación-reducción<sup>187</sup>. Destaca como selenoproteína de gran interés para el propósito de la presente tesis doctoral la **tiorredoxina reductasa** (TrxR), el posible punto de convergencia entre el efecto antitumoral del auranofin y su uso como DMARD.

La TrxR es una oxidoreductasa que forma parte del **sistema tiorredoxina**, necesario para el mantenimiento de la homeostasis redox en el interior celular. Este sistema, que se encuentra tanto en el citosol como en el interior mitocondrial, cuenta con tres componentes: la tiorredoxina, la tiorredoxina reductasa y el NADPH. La Figura 19 muestra el ciclo de reacciones oxidación-reducción que caracterizan a este sistema. La función de este sistema redox consiste en activar a las peroxidasas intracelulares para que éstas puedan eliminar activamente el peróxido de hidrógeno. Esta activación es llevada a cabo por la tiorredoxina, mediante el traspaso de electrones provenientes del NADPH. En el proceso, la enzima queda oxidada y debe volver a su forma reducida para ser funcional de nuevo. Es aquí cuando interviene la TrxR, quien toma los electrones del NADPH en primer lugar y los transfiere a la tiorredoxina oxidada, completando el ciclo. Es decir, ni la tiorredoxina ni la tiorredoxina reductasa son enzimas con capacidad

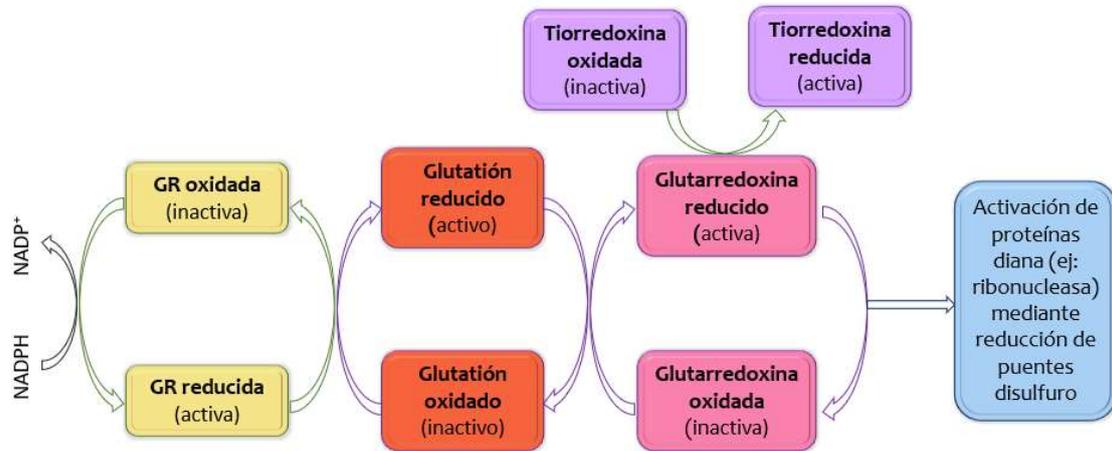
antioxidante *per se*, sino que su contribución sobre el equilibrio redox es indirecta, aunque no por ello menos importante<sup>188,189</sup>. Como puede observarse en la Figura 19, los tres componentes del sistema tienen el mismo peso en el proceso, y la ausencia o el malfuncionamiento de cualquiera de ellos conduciría a un incremento en los niveles de ROS que tendría consecuencias catastróficas para la célula. Esto es debido a que, como adelantábamos al describir el mecanismo de acción del cisplatino (ver apartado 1.3, pág. 45; Figura 14) y del oxaliplatino (ver apartado 1.4, pág. 54; Figura 16), los radicales libres dañan distintas estructuras del interior celular y tienen un papel clave en la inducción de la muerte celular<sup>105,107,123</sup>. Al contribuir al correcto mantenimiento de los niveles de ROS, el sistema tiorredoxina y, por extensión la TrxR, están involucrados en el control de numerosos procesos celulares de gran importancia, entre los que se cuentan la progresión en el ciclo celular o la regulación de la muerte celular<sup>188</sup>.



**Figura 19.** Funcionamiento del sistema antioxidante tiorredoxina. La tiorredoxina activa a las peroxidasas intracelulares al donarle los electrones que provienen del NADPH, quedando oxidada durante el proceso. Al transmitirle los electrones del NADPH, la tiorredoxina reductasa es capaz de reducir a la tiorredoxina oxidada y devolverla así a un estado funcional.

Dada la relevancia del sistema tiorredoxina para la célula, existe un segundo sistema antioxidante que sirve como refuerzo en caso de que esté comprometido: el **sistema glutatión-glutarredoxina** (Figura 20). Este sistema se compone de cuatro elementos: NADPH, glutatión reductasa (GR), glutatión y glutarredoxina. La GR pertenece a la misma familia de oxidoreductasas que la TrxR, aunque se diferencian en que la primera no es una selenoproteína. Pese a esto, la función de ambas enzimas es prácticamente idéntica: transferir electrones del NADPH a otra entidad, que en este caso es el péptido glutatión, para finalmente activar a la glutarredoxina, encargada final del mantenimiento de la homeostasis redox mediante la activación de las peroxidasas celulares, al igual que la tiorredoxina. No obstante, la glutarredoxina tiene una actividad al margen de su función antioxidante indirecta, que no es otra que la activación de ciertas proteínas, como por ejemplo la ribonucleasa, mediante la reducción de puentes disulfuro que se hayan podido formar en un entorno con un marcado carácter pro-oxidante. Esto hace que el sistema glutatión-glutarredoxina esté implicado en procesos celulares como la síntesis

de los desoxirribonucleótidos del ADN. Finalmente, la glutarredoxina es capaz de cederle electrones a la tiorredoxina oxidada cuando la TrxR es incapaz de hacerlo, de ahí su papel como refuerzo del sistema tiorredoxina cuando su actividad puede verse comprometida que se mencionaba antes<sup>189,190</sup>.



**Figura 20.** Funcionamiento del sistema glutatión-glutarredoxina. La glutatión reductasa (GR) transfiere los electrones del NADPH al péptido glutatión, quien a su vez se los transfiere a la glutarredoxina. Una vez activada, la glutarredoxina puede transferir sus electrones a la tiorredoxina, en caso de que la actividad de la tiorredoxina reductasa se encuentre comprometida, o bien activar a otras proteínas al reducir los puentes disulfuro que se hayan podido formar en un ambiente pro-oxidante.

Aunque su defecto pueda estar relacionado con la aparición de patologías, también un excesivo funcionamiento del sistema tiorredoxina puede contribuir a la aparición o al desarrollo de ciertas patologías. La artritis reumatoide parece ser una de estas enfermedades relacionadas con la sobreexpresión de tiorredoxina y TrxR. Ambas proteínas se encuentran en una cantidad muy superior a lo esperado en el líquido sinovial de las regiones inflamadas de pacientes de este trastorno<sup>191</sup>. Erróneamente, podría suponerse que la sobreexpresión de los componentes del sistema es un mecanismo para combatir el estrés oxidativo que promueve el desarrollo de esta enfermedad. No obstante, el efecto real es el contrario. La tiorredoxina promueve el reclutamiento y la maduración de las células dendríticas, quienes secretan citoquinas pro-inflamatorias y contribuyen al progreso del trastorno<sup>192</sup>. De ahí el potencial terapéutico del auranofin frente a la artritis reumatoide.

Al ser una selenoproteína, el auranofin se va a sentir naturalmente atraído hacia la TrxR. Si esta enzima, además, está sobreexpresada, las posibilidades de que fármaco y enzima se encuentren en el medio extracelular o intracelular se multiplican. Así, se piensa que el efecto anti-inflamatorio de este compuesto puede estar mediado por la inhibición de la actividad normal de la tiorredoxina reductasa. Al inutilizar a la TrxR, todo el sistema tiorredoxina deja de funcionar, generando un gran estrés oxidativo que causa

la muerte de aquellas células que sobreexpresen a los componentes de este sistema, que como se ha mencionado anteriormente son las responsables de la liberación de citoquinas pro-inflamatorias<sup>192,193</sup>.

También se ha encontrado una sobreexpresión de la tiorredoxina reductasa en algunos tipos de tumores, siendo especialmente llamativo el caso del cáncer colorrectal. Dado que las células tumorales producen una mayor cantidad de ROS que las células sanas por su rápido metabolismo, también cuentan con una mayor expresión de los sistemas de defensa antioxidante para compensar. El estudio de los niveles de expresión de la TrxR se utiliza para determinar la prognosis de un tumor, ya que cuanto mayor sea este valor, más alto será el grado de agresividad de la enfermedad<sup>187,188</sup>. Se establece así un paralelismo entre la artritis reumatoide y el cáncer, siendo el punto de convergencia los niveles anormalmente altos de TrxR y la efectividad del auranofin frente a ambos trastornos, por lo demás tan diferentes. Efectivamente, diversas investigaciones independientes apuntan a esta enzima redox como la principal diana terapéutica del auranofin<sup>194</sup>. En general, los complejos de oro(I) que se han sintetizado y evaluado durante la última década comparten con su predecesor la capacidad de inhibir a la TrxR, por lo que se han destinado grandes esfuerzos a mejorar la interacción complejo-enzima y así aumentar la efectividad de la terapia<sup>113,195,196</sup>. Esta estrategia cuenta, además, con la ventaja de ser selectiva frente a las células tumorales, puesto que su sensibilidad al estrés oxidativo es mayor que la de una célula normal<sup>106</sup>. En consecuencia, los complejos de oro podrían ser una alternativa igual o más eficaz que los de platino frente al CRC, y, dado que su mecanismo de acción parece más selectivo, su toxicidad en tejidos sanos podría ser menor. Además, varios derivados han sido probados con éxito sobre líneas celulares resistentes a cisplatino, lo que apunta a un posible uso de los complejos de oro(I) en tumores resistentes a las estrategias terapéuticas tradicionales<sup>197,198</sup>. También es interesante, aunque haya sido objeto de menores investigaciones hasta el momento, la capacidad del auranofin de inhibir la expresión de la isoforma mitocondrial de esta enzima (TrxR2)<sup>164</sup>, ya que apuntaría a una posible capacidad de los derivados de oro(I) a inhibir la acción de esta enzima no solo de forma directa, sino también indirecta.

De acuerdo con investigaciones posteriores, el mecanismo de acción del auranofin no se limita a la inhibición de la TrxR, sino que existen otras dianas moleculares con las que podría interactuar. Es relativamente reciente el descubrimiento de la capacidad de este complejo de interferir con el **sistema ubiquitina-proteasoma**, responsable de la renovación proteica en el interior celular. El proteasoma es una estructura proteica cuya función principal es la proteólisis, es decir, la degradación enzimática de proteínas, con lo que evita la formación de agregados proteicos que están detrás de diversos trastornos<sup>199-205</sup>. Está compuesto por dos subunidades, la 19S o partícula reguladora, que prepara al sustrato para la degradación, y la 20S, la partícula central, la que posee la actividad proteasa. Como paso previo a su destrucción en el proteasoma, las enzimas

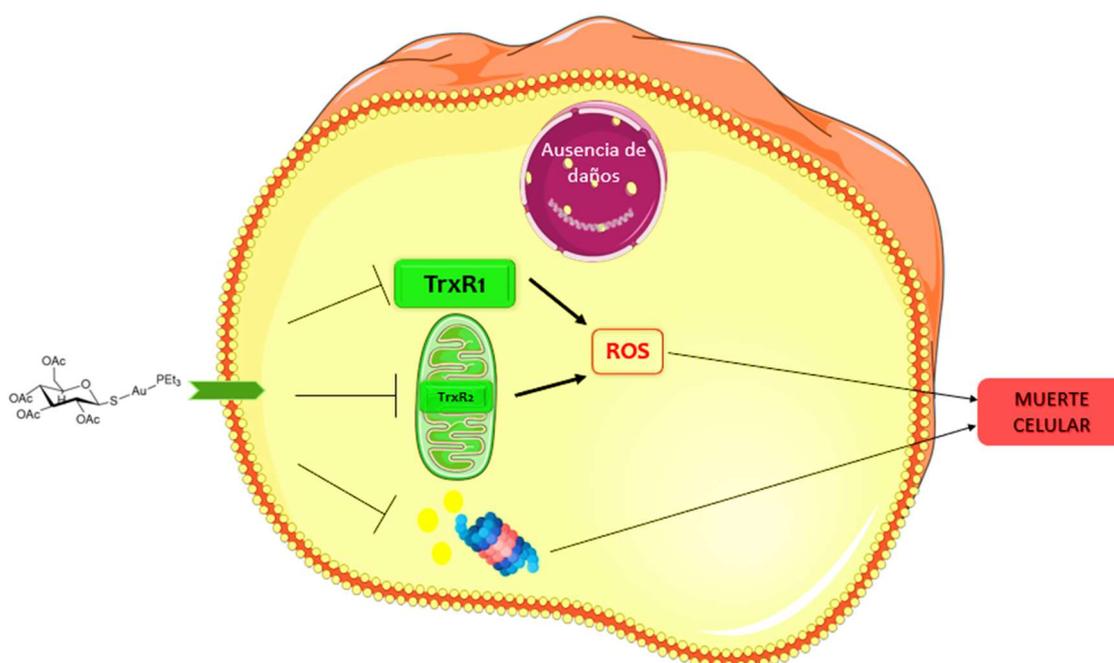
ubiquitinasas añaden residuos de ubiquitina a aquellas proteínas que van a ser degradadas, entre las que se cuentan no solo las viejas sino también las mal plegadas. Los residuos de ubiquitina son identificados por el proteasoma, lo que permite que la proteólisis sea selectiva y controlada<sup>206-208</sup>.

Dada su capacidad proteolítica, el proteasoma está directamente relacionado con el control de diversos procesos celulares, entre los que se cuentan la progresión en el ciclo celular, la respuesta inmune o la muerte celular. Además, resulta crucial para la respuesta a diversos estreses, ya que debe eliminar a las proteínas que se dañen como consecuencia<sup>206-209</sup>. Por ello, según se ha mencionado anteriormente, alteraciones en el proteasoma que le impidan realizar su función normal son la base de diversas enfermedades, entre las que destacan las neurodegenerativas<sup>199-202</sup>.

Por otra parte, de forma similar a lo que ocurría en el caso de la tiorredoxina reductasa, algunas células tumorales, entre las que se encuentran las de CRC, tienen una dependencia muy alta del proteasoma. Existen varias razones que lo explican. En primer lugar, las células transformadas se valen de su proteasoma para eliminar a las proteínas que controlan el avance en el ciclo celular, para así poder continuar con su alta tasa de proliferación; también lo utilizan para degradar a las proteínas resultantes de la expresión de los genes supresores de tumores. Por otra parte, el proteasoma es responsable de la activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B, que está directamente implicado en el desarrollo tumoral al inducir la síntesis de citoquinas pro-inflamatorias y de proteínas anti-apoptóticas. En situación basal, el factor NF- $\kappa$ B se encuentra retenido en el citoplasma por la proteína I $\kappa$ B, que es ubiquitinada en presencia de citoquinas pro-inflamatorias y posteriormente degradada en el proteasoma; esto permite que el factor NF- $\kappa$ B migre al núcleo, donde promueve la transcripción de los genes relacionados con los procesos antes mencionados (inflamación e inhibición de la apoptosis)<sup>210</sup>. Por estos motivos, el uso de inhibidores del sistema ubiquitina-proteasoma con fines quimioterapéuticos resulta una aproximación interesante. Uno de los ejemplos más representativos es el anticuerpo bortezomib, capaz de inhibir la función proteasomal en un 30%, de modo que es tóxico para una célula tumoral pero no para una célula sana<sup>210</sup>. A la vista de estos datos, el sistema ubiquitina-proteasoma puede ser considerado como una diana específica de cáncer colorrectal, de forma similar a lo que ocurre con la tiorredoxina reductasa.

El tratamiento con auranofin causa un incremento en los niveles de proteínas ubiquitinadas en el interior celular. Este efecto está mediado por una inhibición de las deubiquitinasas asociadas a la subunidad 19S; es decir, el tratamiento no afecta directamente a la actividad proteolítica de la subunidad 20S, pero al impedir la deubiquitinación ésta se bloquea y se acumulan proteínas viejas y/o mal plegadas en el interior celular, causando la muerte de la célula. La inhibición de este sistema es parte esencial de la inducción de muerte mediada por este complejo de oro(I), tanto o más

como la inhibición de la TrxR. A esta conclusión llegaron Liu *et al.* tras realizar una serie de ensayos sobre la línea HepG2 en presencia de dos compuestos antioxidantes: N-acetil-cisteína y terbutil hidroquinona. El primero de ellos, además de ser capaz de reducir los niveles de ROS en el medio intracelular, causa un cambio estructural en la molécula de auranofin que le impide llevar a cabo la inhibición de las deubiquitinasas, de modo que revierte por completo su letalidad sobre las células tumorales. La terbutil hidroquinona, sin embargo, solamente tiene función antioxidante, de modo que reduce la capacidad del auranofin de causar la muerte celular, pero no la elimina completamente<sup>211</sup>. Por lo tanto, tanto la inhibición de la función proteasomal como de la tiorredoxina reductasa son elementos necesarios para el efecto antitumoral del auranofin.



**Figura 21.** Esquematación del mecanismo de acción del auranofin en la célula tumoral. Una vez en el interior de la célula, el auranofin es capaz de bloquear la actividad de la isoforma citoplasmática de la enzima redox tiorredoxina reductasa, causando un aumento de radicales libres que contribuye a la muerte de la célula; además, es capaz de reducir la expresión de la isoforma 2, que se expresa en la mitocondria. Por último, puede inhibir a las deubiquitinasas asociadas a la subunidad 19S del proteasoma, lo que de forma indirecta provoca el bloqueo de la degradación proteica que lleva a cabo este orgánulo de forma normal.

Este descubrimiento plantea la posibilidad de que los complejos de oro(I) puedan actuar como complejos **multidiana** o **“multitarget”**, siendo capaces de atacar a la célula tumoral por varias vías simultáneamente. Anteriormente, mencionábamos que el efecto del oxaliplatino se ve potenciado al ser administrado junto con otros fármacos que actúan siguiendo distintos mecanismos, ya que, entre otros beneficios, se consigue reducir la aparición de resistencias<sup>121</sup>. Cuando se interfiere con una sola diana, a la célula tumoral le resulta relativamente sencillo desarrollar un mecanismo para solventar el

problema. En el caso del oxaliplatino o el cisplatino, consistiría en sobreexpresar los sistemas de reparación del DNA<sup>83,84,128</sup>. Sin embargo, cuando la acción de varios componentes celulares se ve afectada, como ocurre al utilizar cócteles de medicamentos o compuestos *multitarget*, la célula tumoral tiene más complicado proteger todas las dianas afectadas, aumentando así las probabilidades de éxito de la quimioterapia.

## 1.6. FARMACOCINÉTICA. LA ALBÚMINA SÉRICA COMO TRANSPORTADOR DE FÁRMACOS

Hasta el momento, la presente memoria se ha centrado en el análisis **farmacodinámico** de distintos compuestos con acción antitumoral, es decir, en el efecto que dichos compuestos causan sobre el organismo, tanto sobre las células cancerígenas como las sanas. No obstante, para desarrollar el medicamento quimioterapéutico ideal que se mencionaba en el apartado 1.3 no solo debe prestarse atención a la farmacodinamia, sino también a sus propiedades farmacocinéticas. La **farmacocinética** es, en cierto modo, un concepto complementario al de la farmacodinamia, puesto que estudia el efecto del organismo sobre el fármaco. Desde que el fármaco es administrado al paciente hasta que llega a la región del organismo sobre la que debe actuar, es susceptible de verse afectado por alguno de los procesos de Liberación, Absorción, Distribución, Metabolismo y Excreción, que se agrupan bajo el acrónimo LADME<sup>212</sup>.

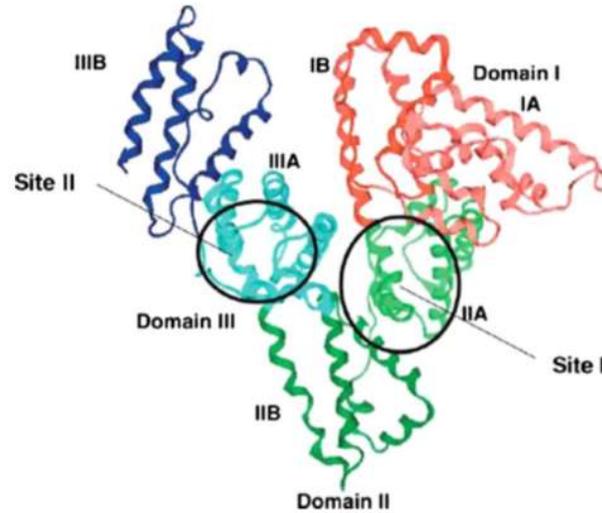
El primero de estos parámetros, la liberación del fármaco, no es aplicable en todas las situaciones. Hace referencia a la salida del compuesto de la forma en la que ha sido administrado, por lo que es un concepto especialmente relevante cuando se recurre a *nanocarriers* o similares, puesto que la cantidad de fármaco que finalmente sea liberado en la zona donde ha de actuar es un claro determinante para la efectividad de la terapia<sup>212,213</sup>. Los procesos de liberación controlada son una tendencia en alza, puesto que pueden mejorar la eficacia del tratamiento, al permitir una salida localizada en la región de interés, a la par que reducen sus posibles efectos secundarios. Esta dualidad se ha mencionado ya en el apartado 1.4 al discutir acerca del uso de nanoportadores como estrategia para disminuir la toxicidad del cisplatino sobre los tejidos sanos. En concreto, recurrir a nanopartículas de oro para vehiculizar al cisplatino ha supuesto una mejora considerable de sus propiedades farmacocinéticas, de acuerdo con los resultados obtenidos por Comenge *et al.*<sup>114</sup>

De igual manera, no todos los fármacos pasan por procesos de absorción, ya que se define como el paso de los compuestos a la corriente sanguínea y, por consiguiente, se limita a aquellos medicamentos que no han sido administrados por vía endovenosa<sup>212</sup>. La absorción es especialmente relevante para aquellos fármacos que son administrados por vía oral, puesto que condiciona sobremanera su disponibilidad final. Uno de los factores que más influyen sobre estos procesos es la lipoficidad del fármaco, ya que determina la velocidad a la que es absorbido por el tracto gastrointestinal. Es por ello que resulta de gran interés estimar el carácter lipófilo del complejo, que viene representado en términos del LogP del mismo. Este parámetro da una idea acerca del carácter lipófilo o hidrófilo de un compuesto, así como de su potencial facilidad para atravesar la membrana lipídica de una célula<sup>213</sup>. El modo de administración del cisplatino, entre otros, se ve condicionado por este parámetro. Al ser un fármaco cuya solubilidad en agua es baja, suele ser administrado de forma endovenosa en lugar de

oral. No obstante, utilizando formulaciones que aumenten su solubilidad en agua, como una solución de nano-hidroxiapatita, es posible no solo administrarlo por vía oral sino además lograr un efecto comparable al que se consigue con la administración endovenosa. Teniendo en cuenta que a un paciente oncológico le resulta más cómoda una administración por vía oral que endovenosa, tener en cuenta estos principios a la hora de desarrollar nuevas terapias es clave para contribuir a la mejora de la calidad de vida del paciente<sup>214</sup>.

La distribución de un fármaco comienza una vez que se encuentra en el torrente sanguíneo, por lo que es un proceso que sufren todos los medicamentos independientemente de su formulación, forma de administración y características básicas. Consiste en el transporte hasta la región sobre la que debe ejercer su efecto terapéutico y en su retorno a la circulación sistémica para ser excretado una vez termina su función<sup>212</sup>. Aquí entran en juego las proteínas plasmáticas, puesto que los fármacos son capaces de unirse a ellas con mayor o menor afinidad, lo que facilita su transporte por el torrente sanguíneo. La fuerza de esta interacción fármaco-proteína plasmática será otro de los parámetros con una fuerte influencia sobre la biodisponibilidad final del compuesto en el tejido<sup>213</sup>. De entre las distintas proteínas presentes en el plasma, la albúmina sérica es una de las principales implicadas en la distribución de los fármacos.

La albúmina sérica (*Human Serum Albumin*; HSA) es la proteína más abundante del plasma, suponiendo entre un 55 y un 60% del cómputo global de proteínas. Se trata de una macromolécula de pequeño tamaño (tiene un peso molecular de 67 kDa aproximadamente<sup>215</sup>), cargada negativamente, muy estable y con una vida media larga. Entre sus diversas funciones en el organismo se encuentra la de actuar como transportador de diversas sustancias, a saber, óxido nítrico, hormonas, ácidos biliares, bilirrubina, algunas endotoxinas bacterianas, metales y fármacos<sup>216,217</sup>. Existen varios sitios hidrófobos en la proteína a los que pueden unirse las citadas moléculas, aunque en el caso de los fármacos los más importantes son los denominados sitio I y sitio II (Figura 22). Al sitio I también se le denomina sitio de unión a warfarina; otros ejemplos de fármacos que se sabe que son capaces de unirse a esta región son los antiinflamatorios no esteroideos como la fenilbutazona o el salicilato. El sitio II, por su parte, recibe el nombre de sitio de unión a la benzodiazepina, aunque también se sabe que pueden unirse en esta zona el diazepam y el ibuprofeno. El sitio I es de mayor tamaño y más flexible que el sitio II, en el que las uniones a fármacos están condicionadas por la estereoselectividad<sup>217,218</sup>.



**Figura 22.** Estructura cristalográfica de la BSA. Se muestran indicados los bolsillos hidrofóbicos de unión a compuestos (sitios I y II). Fuente: Cai *et al. Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects.* 372 (2010) 35-40<sup>219</sup>.

En cuanto al tipo de unión que se establece entre fármaco y HSA, pueden entrar en juego interacciones hidrofóbicas, uniones electrostáticas, formación de complejos metal-albúmina y enlaces covalentes. Estos últimos pueden ser reversibles o irreversibles. Una unión fármaco-albúmina reversible permite que la proteína actúe como un reservorio del compuesto, con lo que se puede aumentar su biodisponibilidad, ya que el compuesto se va liberando conforme disminuye su concentración en plasma. Por su parte, una unión demasiado fuerte puede afectar negativamente al metabolismo del fármaco y a su posterior excreción. Además de estas consecuencias a nivel terapéutico, estas uniones pueden causar modificaciones en la estructura y, por consiguiente, en la función de la albúmina, así como promover la formación de aductos proteicos a nivel renal y hepático, causando daños en ambos órganos<sup>217,218</sup>. No obstante, una unión demasiado débil podría tener un efecto similar en cuanto a la biodisponibilidad del fármaco, puesto que se vería dificultada su distribución por el organismo.

Finalmente, además de transportar al fármaco por el torrente sanguíneo, la unión a la albúmina sérica puede influir sobre su entrada en la célula, ya que se cree que existen mecanismos que facilitan la captación de esta proteína por parte de las células<sup>220</sup>. En este sentido, aquellos fármacos que sean transportados por la albúmina sérica podrían gozar de una mayor biodisponibilidad que aquellos que no lo son debido a su papel como reservorio antes mencionado y a los mecanismos de captación de esta proteína.

Algunos investigadores aglutinan los procesos de metabolismo y excreción bajo un único término, eliminación, puesto que ambos conceptos hacen referencia al conjunto de reacciones que tienen como último fin la salida del fármaco del organismo. Estos dos procesos se resumen en que el compuesto original sufre una serie de reacciones

enzimáticas destinadas a cambiar sus propiedades químicas, dando lugar a nuevos metabolitos cuya excreción es más sencilla. Generalmente, estos cambios metabólicos están orientados a aumentar la solubilidad de la molécula de partida. Entre las enzimas que se encargan del metabolismo de los fármacos, que se encuentran en su mayoría en el hígado, destaca el citocromo p450. Finalmente, estos metabolitos serán eliminados, en su mayoría por vía renal<sup>212,213</sup>.

También la albúmina sérica interviene en estos dos procesos. Su impacto sobre el metabolismo de los fármacos se debe a que posee una cierta actividad enzimática y puede inducir modificaciones sobre la estructura del fármaco. Por ejemplo, se ha observado que el sitio I presenta actividad esterasa, lo que le permite convertir al ácido acetilsalicílico en ácido salicílico<sup>221</sup>. Al margen de esta actividad enzimática intrínseca a esta proteína, también puede facilitar la entrada del fármaco en el tejido hepático para que enzimas como el ya mencionado citocromo p450 puedan ejercer su efecto sobre el fármaco, gracias a los mecanismos de captación de la albúmina que poseen las células<sup>220,222</sup>. En cuanto a su papel en la excreción de los fármacos, se ha observado que bajas concentraciones en sangre de HSA pueden promover un aumento de la eliminación de algunos anticuerpos monoclonales como por ejemplo el infliximab, lo que se traduce en un fallo de la terapia puesto que su biodisponibilidad baja considerablemente<sup>223</sup>.

En definitiva, a la hora de evaluar el uso potencial de un fármaco debe evaluarse no solo su mecanismo de acción, sino que también se deben tener en cuenta los procesos farmacocinéticos, ya que condicionarán su efecto terapéutico final.

## 1.7. OBJETIVOS

En vista de lo enunciado anteriormente, es necesario dar con nuevos agentes quimioterapéuticos que cumplan los criterios de eficacia y seguridad para poner freno al incesante número de muertes causadas por el CRC, así como para mejorar la calidad y esperanza de vida de los pacientes. Para alcanzar esta meta, estos nuevos fármacos deberán dirigirse contra dianas específicas del cancer colorrectal, para así evitar daños sobre los tejidos sanos. En este sentido, el ideal de la medicina personalizada sostiene que aquellas proteínas que son de gran relevancia para el desarrollo de la masa tumoral y que, además, se encuentren sobreexpresadas, como pueden ser la tiorredoxina reductasa, alguno de los componentes del sistema ubiquitina-proteasoma o la enzima ciclooxigenasa, podrían ser la clave para el diseño de nuevas estrategias terapéuticas, a diferencia de las actuales basadas en fármacos de platino que interfieren con una macromolécula ubicua como es el ADN.

Por consiguiente, el objetivo principal de esta tesis doctoral consistió en encontrar posibles alternativas a los fármacos basados en platino que se utilizan a día de hoy. A raíz de lo expuesto anteriormente en relación a la afinidad natural por los derivados de oro(III) y la tiorredoxina reductasa o el proteasoma, se recurrió a esta clase de compuestos por su potencial antitumoral frente al cáncer colorrectal. No obstante, no se perseguía el bloqueo de una única diana de CRC, sino que el fin último fue la obtención de agentes multidiana capaces de alterar la actividad de más de una diana molecular del cáncer colorrectal, puesto que su eficacia terapéutica es mayor que la de aquellos fármacos que inhiben una única diana. Además, se buscaba identificar nuevos fármacos capaces de inducir muerte celular alternativa a la apoptosis, ya que podrían resultar de gran interés en el tratamiento de tumores resistentes a la misma.

Además de aprovechar las características que de por sí poseen los derivados de oro(III), se pretendió buscar nuevas formas de incrementar su efecto terapéutico haciendo uso del prometedor potencial de los polifenoles como agentes quimioterapéuticos. Dicho estudio se puede llevar a cabo siguiendo dos estrategias distintas. Por un lado, analizando el efecto de una nueva combinación de fármacos compuesta por un derivado de oro(III) y un extracto vegetal como una posible estrategia para mejorar la eficacia terapéutica del fármaco metálico y/o reducir sus efectos secundarios, tal y como se ha descrito que ocurre con el cisplatino. Por otro lado, evaluando el efecto del uso de moléculas del tipo polifenol, tal es el caso de la unidad 3-hidroxiflavona como ligando de coordinación en cuanto al efecto antitumoral de una serie de nuevos alquinos derivados de oro(III).



## Referencias

---

- (1) Real Academia de la Lengua. Diccionario de la lengua española. Definición de cáncer <https://dle.rae.es/cáncer>.
- (2) Organización Mundial de la Salud. Definición de cáncer <https://www.who.int/topics/cancer/es/>.
- (3) Suresh, S. Biomechanics and Biophysics of Cancer Cells. *Acta Biomater.* **2007**, 3 (4), 413–438. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2007.04.002>.
- (4) Haites, N. Oncogenes. In *Encyclopedia of Genetics*; Brenner, S., Miller, J. H., Eds.; Academic Press, 2001; pp 1370–1372.
- (5) Grumolato, L.; Aaronson, S. A. Oncogenes and Signal Transduction. In *The Molecular Basis of Cancer*; Mendelsohn J., Howley P.M., Israel M.A., Gray J.W., Thompson C.B., Eds.; Saunders: Philadelphia, 2015; pp 19–34.
- (6) Zong, W. X.; Rabinowitz, J. D.; White, E. Mitochondria and Cancer. *Mol. Cell* **2016**, 61 (5), 667–676. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.02.011>.
- (7) Pavlova, N. N.; Thompson, C. B. The Emerging Hallmarks of Cancer Metabolism. *Cell Metab.* **2016**, 23 (1), 27–47. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.12.006>.
- (8) Azordegan, N.; Fraser, V.; Le, K.; Hillyer, L. M.; Ma, D. W. L.; Fischer, G.; Moghadasian, M. H. Carcinogenesis Alters Fatty Acid Profile in Breast Tissue. *Mol. Cell. Biochem.* **2013**, 374 (1–2), 223–232. <https://doi.org/10.1007/s11010-012-1523-4>.
- (9) Sociedad Española de Oncología Médica. *Las Cifras Del Cáncer En España*; Madrid, 2019.
- (10) Bray, F.; Ferlay, J.; Soerjomataram, I.; Siegel, R. L.; Torre, L. A.; Jemal, A. Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA. Cancer J. Clin.* **2018**, 68 (6), 394–424. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>.
- (11) Asociación Española Contra el Cáncer. Observatorio AECC. Informes incidencia 2019: Desglosado por comunidades autónomas <http://observatorio.aecc.es/#datos-informes>.
- (12) Mármol, I.; Sánchez-de-Diego, C.; Dieste, A. P.; Cerrada, E.; Yoldi, M. J. R. Colorectal Carcinoma: A General Overview and Future Perspectives in Colorectal Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, 18 (1), 197. <https://doi.org/10.3390/ijms18010197>.
- (13) Arnold, M.; Sierra, M. S.; Laversanne, M.; Soerjomataram, I.; Jemal, A.; Bray, F. Global Patterns and Trends in Colorectal Cancer Incidence and Mortality. *Gut* **2017**, 66 (4), 683–691. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2015-310912>.
- (14) Center, M. M.; Jemal, A.; Ward, E. International Trends in Colorectal Cancer Incidence Rates. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **2009**, 18 (6), 1688–1694. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-09-0090>.
- (15) Servicio Aragonés de Salud. *Programa de Detección Precoz de Cáncer de Colon y Recto*; Zaragoza, 2015.
- (16) Garrido Botella, A.; Garrido Gómez, E.; Moreira, V. F.; López, A.; Román, S. Pólipos de

- Colon. *Rev. Esp. Enf. Dig.* **2007**, *99* (1), 48.
- (17) Arévalo, F.; Aragón, V.; Alva, J.; Perez Narrea, N.; Cerrillo, G.; Montes, P.; Monge, E. Pólipos Colorrectales: Actualización En El Diagnóstico. *Rev. gastroenterol. Perú* **2012**, *32* (2), 123–133.
- (18) Leslie, A.; Carey, F. A.; Pratt, N. R.; Steele, R. J. C.; Leslie, M. A. The Colorectal Adenoma-Carcinoma Sequence. *Br. J. Surg.* **2002**, *89*, 845–860.
- (19) Perea, J.; Lomas, M.; Hidalgo, M. Bases Moleculares Del Cáncer Colorrectal: ¿Hacia Un Manejo Individualizado? *Rev. Española Enfermedades Dig.* **2011**, *103* (1), 29–35.
- (20) Nguyen, H. T.; Duong, H. Q. The Molecular Characteristics of Colorectal Cancer: Implications for Diagnosis and Therapy. *Oncol. Lett.* **2018**, *16* (1), 9–18. <https://doi.org/10.3892/ol.2018.8679>.
- (21) Mármol, I.; Quero, J.; Rodríguez-Yoldi, M. J. Modifiable and Non-Modifiable Risk Factors of Colorectal Cancer. In *Advances in Health and Disease vol. 7*; Duncan, L. T., Ed.; Nova Science Publishers Inc. : New York, 2018; pp 67–116.
- (22) Van Duijnhoven, F. J. B.; Botma, A.; Winkels, R.; Nagengast, F. M.; Vasen, H. F. A.; Kampman, E. Do Lifestyle Factors Influence Colorectal Cancer Risk in Lynch Syndrome? *Fam. Cancer* **2013**, *12* (2), 285–293. <https://doi.org/10.1007/s10689-013-9645-8>.
- (23) Dashti, S. G.; Win, A. K.; Hardikar, S. S.; Glombicki, S. E.; Mallenahalli, S.; Thirumurthi, S.; Peterson, S. K.; You, Y. N.; Buchanan, D. D.; Figueiredo, J. C.; Campbell, P. T.; Gallinger, S.; Newcomb, P. A.; Potter, J. D.; Lindor, N. M.; Le Marchand, L.; Haile, R. W.; Hopper, J. L.; Jenkins, M. A.; Basen-Engquist, K. M.; Lynch, P. M.; Pande, M. Physical Activity and the Risk of Colorectal Cancer in Lynch Syndrome. *Int. J. Cancer* **2018**, *143* (9), 2250–2260. <https://doi.org/10.1002/ijc.31611>.
- (24) Contreras García, E.; Zaragoza Marti, A. Influence of Food or Food Groups Intake on the Occurrence and / or Protection of Different Types of Cancer: Systematic Review. *Nutr. Hosp.* **2019**, *37* (1), 169–192. <https://doi.org/10.20960/nh.02588>.
- (25) Fliss-Isakov, N.; Kariv, R.; Webb, M.; Ivancovsky, D.; Margalit, D.; Zelber-Sagi, S. Mediterranean Dietary Components Are Inversely Associated with Advanced Colorectal Polyps: A Case-Control Study. *World J. Gastroenterol.* **2018**, *24* (24), 2617–2627. <https://doi.org/10.3748/wjg.v24.i24.2617>.
- (26) Zinöcker, M. K.; Lindseth, I. A. The Western Diet–Microbiome-Host Interaction and Its Role in Metabolic Disease. *Nutrients* **2018**, *10* (3), 365. <https://doi.org/10.3390/nu10030365>.
- (27) Oliveira Fuster, G.; González-Molero, I. Probióticos y Prebióticos En La Práctica Clínica. *Nutr. Hosp.* **2007**, *22* (2), 26–34.
- (28) Kunzmann, A. T.; Coleman, H. G.; Huang, W. Y.; Kitahara, C. M.; Cantwell, M. M.; Berndt, S. I. Dietary Fiber Intake and Risk of Colorectal Cancer and Incident and Recurrent Adenoma in the Prostate, Lung, Colorectal, and Ovarian Cancer Screening Trial. *Am. J. Clin. Nutr.* **2015**, *102* (4), 881–890. <https://doi.org/10.3945/ajcn.115.113282>.
- (29) Ocvirk, S.; Wilson, A. S.; Appolonia, C. N.; Thomas, T. K.; O’Keefe, S. J. D. Fiber, Fat, and Colorectal Cancer: New Insight into Modifiable Dietary Risk Factors. *Curr Gastroenterol Rep* **2019**, *21* (11), 62. <https://doi.org/10.1007/s11894-019-0725-2>.

- (30) Hendler, R.; Zhang, Y. Probiotics in the Treatment of Colorectal Cancer. *Medicines* **2018**, *5* (3), 101. <https://doi.org/10.3390/medicines5030101>.
- (31) Di Ferdinando, M.; Brunetti, C.; Agati, G.; Tattini, M. Multiple Functions of Polyphenols in Plants Inhabiting Unfavorable Mediterranean Areas. *Environ. Exp. Bot.* **2014**, *103*, 107–116. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2013.09.012>.
- (32) Lattanzio, V.; Lattanzio, V. M. T.; Cardinali, A. Role of Polyphenols in the Resistance Mechanisms of Plants Against Fungal Pathogens and Insects. In *Phytochemistry: Advances in Research*; Imperato, F., Ed.; Research Signpost: 37/661 (2), Fort P.O., Trivandrum-695 023, Kerala, India , 2006; pp 24–67.
- (33) Lavola, A.; Maukonen, M.; Julkunen-Tiitto, R. Variability in the Composition of Phenolic Compounds in Winter-Dormant *Salix Pyrolifolia* in Relation to Plant Part and Age. *Phytochemistry* **2018**, *153*, 102–110. <https://doi.org/10.1016/J.PHYTOCHEM.2018.05.021>.
- (34) Karalija, E.; Muratović, E.; Tarkowski, P.; Zeljkovic, S. C. Variation in Phenolic Composition of *Knautia Arvensis* in Correlation with Geographic Area and Plant Organ. *Nat. Prod. Commun.* **2017**, *12* (4), 545–548.
- (35) Jiménez-Moreno; Cimminelli; Volpe; Ansó; Esparza; Mármol; Rodríguez-Yoldi; Ancín-Azpilicueta. Phenolic Composition of Artichoke Waste and Its Antioxidant Capacity on Differentiated Caco-2 Cells. *Nutrients* **2019**, *11* (8), 1723. <https://doi.org/10.3390/nu11081723>.
- (36) Sagaert, X.; Vanstapel, A.; Verbeek, S. Tumor Heterogeneity in Colorectal Cancer: What Do We Know So Far? *Pathobiology* **2018**, *85* (1–2), 72–84. <https://doi.org/10.1159/000486721>.
- (37) De Rosa, M.; Pace, U.; Rega, D.; Costabile, V.; Duraturo, F.; Izzo, P.; Delrio, P. Genetics, Diagnosis and Management of Colorectal Cancer (Review). *Oncol. Rep.* **2015**, *34* (3), 1087–1096. <https://doi.org/10.3892/or.2015.4108>.
- (38) Feo, L.; Polcino, M.; Nash, G. M. Resection of the Primary Tumor in Stage IV Colorectal Cancer: When Is It Necessary? *Surg. Clin. North Am.* **2017**, *97* (3), 657–669. <https://doi.org/10.1016/j.suc.2017.01.012>.
- (39) Binefa, G.; Rodríguez-Moranta, F.; Teule, À.; Medina-Hayas, M. Colorectal Cancer: From Prevention to Personalized Medicine. *World J. Gastroenterol.* **2014**, *20* (22), 6786–6808. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i22.6786>.
- (40) Xu, X.; Lai, Y.; Hua, Z. C. Apoptosis and Apoptotic Body: Disease Message and Therapeutic Target Potentials. *Biosci. Rep.* **2019**, *39* (1), BSR20180992. <https://doi.org/10.1042/BSR20180992>.
- (41) Saraste, A.; Pulkki, K. Morphologic and Biochemical Hallmarks of Apoptosis. *Cardiovasc. Res.* **2000**, *45* (3), 528–537.
- (42) Chu, W. M. Tumor Necrosis Factor. *Cancer Lett.* **2013**, *328* (2), 222–225. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2012.10.014>.
- (43) D’Arcy, M. S. Cell Death: A Review of the Major Forms of Apoptosis, Necrosis and Autophagy. *Cell Biol. Int.* **2019**, *43* (6), 582–592. <https://doi.org/10.1002/cbin.11137>.

- (44) Tummers, B.; Green, D. R. Caspase-8: Regulating Life and Death. *Immunol. Rev.* **2017**, *277* (1), 76–89. <https://doi.org/10.1111/imr.12541>.
- (45) Park, S.; De Leon, M.; Devarajan, P. Cisplatin Induces Apoptosis in LLC-PK1 Cells via Activation of Mitochondrial Pathways. *J. Am. Soc. Nephrol* **2002**, *13* (4), 858–865.
- (46) Hassan, M.; Watari, H.; Abualmaaty, A.; Ohba, Y.; Sakuragi, N. Apoptosis and Molecular Targeting Therapy in Cancer. *Biomed. Res. Int.* **2014**, *2014*, 150845. <https://doi.org/10.1155/2014/150845>.
- (47) Prem, C.; Reddy, V. Cell Cycle: Regulatory Events in G1-S Transition of Mammalian Cells. *J. Cell. Biochem.* **1994**, *54* (4), 379–386.
- (48) Kousholt, A. N.; Menzel, T.; Sørensen, C. S. Pathways for Genome Integrity in G2 Phase of the Cell Cycle. *Biomolecules* **2012**, *2* (4), 579–607. <https://doi.org/10.3390/biom2040579>.
- (49) Barnum, K. J.; O'Connell, M. J. Cell Cycle Regulation by Checkpoints. *Methods Mol. Biol.* **2014**, *1170*, 29–40. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0888-2\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0888-2_2).
- (50) Chen, J. The Cell-Cycle Arrest and Apoptotic Functions of P53 in Tumor Initiation and Progression. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2016**, *6* (3), a026104. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a026104>.
- (51) Aubrey, B. J.; Kelly, G. L.; Janic, A.; Herold, M. J.; Strasser, A. How Does P53 Induce Apoptosis and How Does This Relate to P53-Mediated Tumour Suppression? *Cell Death Differ.* **2018**, *25* (1), 104–113. <https://doi.org/10.1038/cdd.2017.169>.
- (52) Dipaola, R. S. To Arrest or Not To G 2-M Cell-Cycle Arrest Commentary Re: A. K. Tyagi et Al., Silibinin Strongly Synergizes Human Prostate Carcinoma DU145 Cells to Doxorubicin-Induced Growth Inhibition, G 2-M Arrest. *Clin. Cancer Res* **2002**, *8* (11), 3512–3519.
- (53) Basu, A.; Ghosh, P.; Bhattacharjee, A.; Patra, A. R.; Bhattacharya, S. Prevention of Myelosuppression and Genotoxicity Induced by Cisplatin in Murine Bone Marrow Cells: Effect of an Organovanadium Compound Vanadium(III)-L-Cysteine. *Mutagenesis* **2015**, *30* (4), 509–517. <https://doi.org/10.1093/mutage/gev011>.
- (54) Dertinger, S. D.; Avlasevich, S. L.; Torous, D. K.; Bemis, J. C.; Phonethepswath, S.; Labash, C.; Carlson, K.; Mereness, J.; Cottom, J.; Palis, J.; MacGregor, J. T. Persistence of Cisplatin-Induced Mutagenicity in Hematopoietic Stem Cells: Implications for Secondary Cancer Risk Following Chemotherapy. *Toxicol. Sci.* **2014**, *140* (2), 307–314. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfu078>.
- (55) Pfeffer, C. M.; Singh, A. T. K. Apoptosis: A Target for Anticancer Therapy. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19* (2), 448. <https://doi.org/10.3390/ijms19020448>.
- (56) Gerl, R.; Vaux, D. L. Apoptosis in the Development and Treatment of Cancer. *Carcinogenesis* **2005**, *26* (2), 263–270. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgh283>.
- (57) Pistritto, G.; Trisciuglio, D.; Ceci, C.; Garuf, A.; D'Orazi, G. Apoptosis as Anticancer Mechanism: Function and Dysfunction of Its Modulators and Targeted Therapeutic Strategies. *Aging (Albany NY)* **2016**, *8* (4), 603–619. <https://doi.org/doi:10.18632/aging.100934>.
- (58) Park, N.; Chun, Y. J. Auranofin Promotes Mitochondrial Apoptosis by Inducing Annexin

- A5 Expression and Translocation in Human Prostate Cancer Cells. *J. Toxicol. Environ. Heal. - Part A Curr. Issues* **2014**, *77*, 1467–1476. <https://doi.org/10.1080/15287394.2014.955834>.
- (59) Jendrossek, V. The Intrinsic Apoptosis Pathways as a Target in Anticancer Therapy. *Curr Pharm Biotechnol* **2012**, *13* (8), 1426–1438. <https://doi.org/DOI:10.2174/138920112800784989>.
- (60) Richardson, A.; Kaye, S. B. Pharmacological Inhibition of the Bcl-2 Family of Apoptosis Regulators as Cancer Therapy. *Curr Mol Pharmacol* **2008**, *1* (3), 244–254. <https://doi.org/0.2174/1874467210801030244>.
- (61) Fantin, V. R.; Leder, P. Mitochondriotoxic Compounds for Cancer Therapy. *Oncogene* **2006**, *25* (34), 4787–4797. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209599>.
- (62) Eun, H. S.; Min, K. S.; Jeong, L. H.; Vetrivel, P.; Saralamma, V. V. G.; Doo, H. J.; Hee, K. E.; Joon, L. S.; Sup, K. G. Scutellarein Induces Fas-Mediated Extrinsic Apoptosis and G2/M Cell Cycle Arrest in Hep3B Hepatocellular Carcinoma Cells. *Nutrients* **2019**, *11* (2), 263. <https://doi.org/10.3390/nu11020263>.
- (63) Gowda Saralamma, V. V.; Nagappan, A.; Hong, G. E.; Lee, H. J.; Yumnam, S.; Raha, S.; Heo, J. D.; Lee, S. J.; Lee, W. S.; Kim, E. H.; Kim, G. S. Poncirin Induces Apoptosis in AGS Human Gastric Cancer Cells through Extrinsic Apoptotic Pathway by Up-Regulation of Fas Ligand. *Int. J. Mol. Sci.* **2015**, *16* (9), 22676–22691. <https://doi.org/10.3390/ijms160922676>.
- (64) Chen, W. T.; Hsu, F. T.; Liu, Y. C.; Chen, C. H.; Hsu, L. C.; Lin, S. S. Fluoxetine Induces Apoptosis through Extrinsic/Intrinsic Pathways and Inhibits ERK/NF-KB-Modulated Anti-Apoptotic and Invasive Potential in Hepatocellular Carcinoma Cells in Vitro. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20* (3), 757. <https://doi.org/10.3390/ijms20030757>.
- (65) Yang, P. Y.; Hu, D. N.; Kao, Y. H.; Lin, I. C.; Chou, C. Y.; Wu, Y. C. Norcantharidin Induces Apoptosis in Human Prostate Cancer Cells through Both Intrinsic and Extrinsic Pathways. *Pharmacol. Reports* **2016**, *68* (5), 874–880. <https://doi.org/10.1016/j.pharep.2016.04.010>.
- (66) Shi, X.; Liu, S.; Kleeff, J.; Friess, H.; Büchler, M. W. Acquired Resistance of Pancreatic Cancer Cells towards 5-Fluorouracil and Gemcitabine Is Associated with Altered Expression of Apoptosis-Regulating Genes. *Oncology* **2002**, *62* (4), 354–362. <https://doi.org/10.1159/000065068>.
- (67) Pan, S. T.; Li, Z. L.; He, Z. X.; Qiu, J. X.; Zhou, S. F. Molecular Mechanisms for Tumour Resistance to Chemotherapy. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **2016**, *43* (8), 723–737. <https://doi.org/10.1111/1440-1681.12581>.
- (68) Chen, D.; Yu, J.; Zhang, L. Necroptosis: An Alternative Cell Death Program Defending against Cancer. *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Cancer* **2016**, *1865* (2), 228–236. <https://doi.org/10.1016/J.BBCAN.2016.03.003>.
- (69) He, S.; Huang, S.; Shen, Z. Biomarkers for the Detection of Necroptosis. *Cell. Mol. Life Sci.* **2016**, *73* (11–12), 2177–2181. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2192-3>.
- (70) Nailwal, H.; Chan, F. K. M. Necroptosis in Anti-Viral Inflammation. *Cell Death Differ.* **2019**, *26* (1), 4–13. <https://doi.org/10.1038/s41418-018-0172-x>.
- (71) Jorgensen, I.; Rayamajhi, M.; Miao, E. A. Programmed Cell Death as a Defence against

- Infection. *Nat. Rev. Immunol.* **2017**, *17* (3), 151–164. <https://doi.org/10.1038/nri.2016.147>.
- (72) Metzsig, M. O.; Fuchs, D.; Tagscherer, K. E.; Gröne, H. J.; Schirmacher, P.; Roth, W. Inhibition of Caspases Primes Colon Cancer Cells for 5-Fluorouracil-Induced TNF- $\alpha$ -Dependent Necroptosis Driven by RIP1 Kinase and NF-KB. *Oncogene* **2016**, *35* (26), 3399–3409. <https://doi.org/10.1038/onc.2015.398>.
- (73) Rohde, K.; Kleinesudeik, L.; Roesler, S.; Löwe, O.; Heidler, J.; Schröder, K.; Wittig, I.; Dröse, S.; Fulda, S. A Bak-Dependent Mitochondrial Amplification Step Contributes to Smac Mimetic/Glucocorticoid-Induced Necroptosis. *Cell Death Differ.* **2017**, *24* (1), 83–97. <https://doi.org/10.1038/cdd.2016.102>.
- (74) Zhang, Y.; Su, S. S.; Zhao, S.; Yang, Z.; Zhong, C. Q.; Chen, X.; Cai, Q.; Yang, Z. H.; Huang, D.; Wu, R.; Han, J. RIP1 Autophosphorylation Is Promoted by Mitochondrial ROS and Is Essential for RIP3 Recruitment into Necrosome. *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 14329. <https://doi.org/10.1038/ncomms14329>.
- (75) Tummers, B.; Green, D. R. Caspase-8: Regulating Life and Death. *Immunol. Rev.* **2017**, *277* (1), 76–89. <https://doi.org/10.1111/imr.12541>.
- (76) Hönscheid, P.; Datta, K.; Muders, M. H. Autophagy: Detection, Regulation and Its Role in Cancer and Therapy Response. *Int. J. Radiat. Biol.* **2014**, *90* (8), 628–635. <https://doi.org/10.3109/09553002.2014.907932>.
- (77) Lorente, J.; Velandia, C.; Leal, J. A.; Garcia-Mayea, Y.; Lyakhovich, A.; Kondoh, H.; LLeonart, M. E. The Interplay between Autophagy and Tumorigenesis: Exploiting Autophagy as a Means of Anticancer Therapy. *Biol. Rev.* **2018**, *93* (1), 152–165. <https://doi.org/10.1111/brv.12337>.
- (78) Yu, T. C.; Guo, F.; Yu, Y.; Sun, T.; Ma, D.; Han, J.; Qian, Y.; Kryczek, I.; Sun, D.; Nagarsheth, N.; Chen, Y.; Chen, H.; Hong, J.; Zou, W.; Fang, J. Y. Fusobacterium Nucleatum Promotes Chemoresistance to Colorectal Cancer by Modulating Autophagy. *Cell* **2017**, *170* (3), 548-563.e16. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.07.008>.
- (79) Li, X.; Zhou, Y.; Li, Y.; Yang, L.; Ma, Y.; Peng, X.; Yang, S.; Liu, J.; Li, H. Autophagy: A Novel Mechanism of Chemoresistance in Cancers. *Biomed. Pharmacother.* **2019**, *119*, 109415. <https://doi.org/10.1016/J.BIOPHA.2019.109415>.
- (80) Li, Y. J.; Lei, Y. H.; Yao, N.; Wang, C. R.; Hu, N.; Ye, W. C.; Zhang, D. M.; Chen, Z. S. Autophagy and Multidrug Resistance in Cancer. *Chin. J. Cancer* **2017**, *36* (1), 52. <https://doi.org/10.1186/s40880-017-0219-2>.
- (81) Lin, J. F.; Lin, Y. C.; Tsai, T. F.; Chen, H. E.; Chou, K. Y.; Hwang, T. I. S. Cisplatin Induces Protective Autophagy through Activation of BECN1 in Human Bladder Cancer Cells. *Drug Des. Devel. Ther.* **2017**, *11*, 1517–1533. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S126464>.
- (82) Zhang, X.-Y.; Zhang, M.; Cong, Q.; Zhang, M.-X.; Zhang, M.-Y.; Lu, Y.-Y.; Xu, C.-J. Hexokinase 2 Confers Resistance to Cisplatin in Ovarian Cancer Cells by Enhancing Cisplatin-Induced Autophagy. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2018**, *95*, 9–16. <https://doi.org/10.1016/J.BIOCEL.2017.12.010>.
- (83) Amable, L. Cisplatin Resistance and Opportunities for Precision Medicine. *Pharmacol. Res.* **2016**, *106*, 27–36. <https://doi.org/10.1016/J.PHRS.2016.01.001>.

- (84) Galluzzi, L.; Senovilla, L.; Vitale, I.; Michels, J.; Martins, I.; Kepp, O.; Castedo, M.; Kroemer, G. Molecular Mechanisms of Cisplatin Resistance. *Oncogene* **2012**, *31* (15), 1869–1883. <https://doi.org/10.1038/onc.2011.384>.
- (85) Ghosh, S. Cisplatin: The First Metal Based Anticancer Drug. *Bioorg. Chem.* **2019**, *88*, 102925. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2019.102925>.
- (86) Pérez-Hernández, M.; Arias, A.; Martínez-García, D.; Pérez-Tomás, R.; Quesada, R.; Soto-Cerrato, V. Targeting Autophagy for Cancer Treatment and Tumor Chemosensitization. *Cancers (Basel)*. **2019**, *11* (10), 1599. <https://doi.org/10.3390/cancers11101599>.
- (87) Liu, L.; Wang, S.; Shao, Y.; Shi, J.; Wang, W.; Chen, W.; Ye, Z.; Jiang, J.; Fang, Q.; Zhang, G.; Xuan, Z. Hydroxychloroquine Potentiates the Anti-Cancer Effect of Bevacizumab on Glioblastoma via the Inhibition of Autophagy. *Biomed. Pharmacother.* **2019**, *118*, 109339. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.109339>.
- (88) Hall, T. M.; Tétreault, M. P.; Hamilton, K. E.; Whelan, K. A. Autophagy as a Cytoprotective Mechanism in Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *Curr. Opin. Pharmacol.* **2018**, *41*, 12–19. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2018.04.003>.
- (89) Das, C. K.; Linder, B.; Bonn, F.; Rothweiler, F.; Dikic, I.; Michaelis, M.; Cinatl, J.; Mandal, M.; Kögel, D. BAG3 Overexpression and Cytoprotective Autophagy Mediate Apoptosis Resistance in Chemoresistant Breast Cancer Cells. *Neoplasia* **2018**, *20* (3), 263–279. <https://doi.org/10.1016/j.neo.2018.01.001>.
- (90) Sharma, K.; Le, N.; Alotaibi, M.; Gewirtz, D. A. Cytotoxic Autophagy in Cancer Therapy. *Int. J. Mol. Sci.* **2014**, *15* (6), 10034–10051. <https://doi.org/10.3390/ijms150610034>.
- (91) Tompkins, K. D.; Thorburn, A. Regulation of Apoptosis by Autophagy to Enhance Cancer Therapy. *Yale J. Biol. Med.* **2019**, *92* (4), 707–718.
- (92) Fernández-López, J. A.; Fernández-Fidalgo, M.; Cieza, A. Los Conceptos de Calidad de Vida, Salud y Bienestar Analizados Desde La Perspectiva de La Clasificación Internacional Del Funcionamiento (CIF). *Rev Esp Salud Pública* **2010**, *84*, 169–184.
- (93) Urzúa, A. M.; Caqueo-Urizar, A. Calidad de Vida: Una Revisión Teórica Del Concepto. *Ter. Psicológica* **2012**, *30* (1), 61–71.
- (94) Li, J.; Liu, X. Incremental Patient Care Program Decreases Anxiety, Reduces Depression and Improves the Quality of Life in Patients with Colorectal Cancer Receiving Adjuvant Chemotherapy. *Exp. Ther. Med.* **2019**, *18* (4), 2789–2798. <https://doi.org/10.3892/etm.2019.7877>.
- (95) Sánchez-Gundín, J.; Fernández-Carballido, A. M.; Torres-Suárez, A. I.; Barreda-Hernández, D. Quality of Life in Non-Metastatic Colorectal Cancer Patients in Folfox or Xelox Therapy. *Farm. Hosp.* **2019**, *43* (2), 56–60. <https://doi.org/10.7399/fh.11156>.
- (96) Mayrbäurl, B.; Giesinger, J. M.; Burgstaller, S.; Piringner, G.; Holzner, B.; Thaler, J. Quality of Life across Chemotherapy Lines in Patients with Advanced Colorectal Cancer: A Prospective Single-Center Observational Study. *Support. Care Cancer* **2016**, *24* (2), 667–674. <https://doi.org/10.1007/s00520-015-2828-0>.
- (97) Naito, Y.; Urasaki, T. Precision Medicine in Breast Cancer. *Chinese Clin. Oncol.* **2018**, *7* (3), 29. <https://doi.org/10.21037/cco.2018.06.04>.

- (98) McDonald, E. S.; Clark, A. S.; Tchou, J.; Zhang, P.; Freedman, G. M. Clinical Diagnosis and Management of Breast Cancer. *J. Nucl. Med.* **2016**, *57*, 9S-16S. <https://doi.org/10.2967/jnumed.115.157834>.
- (99) Lech, G.; Słotwiński, R.; Słodkowski, M.; Krasnodębski, I. W. Colorectal Cancer Tumour Markers and Biomarkers: Recent Therapeutic Advances. *World J. Gastroenterol.* **2016**, *22* (5), 1745–1755. <https://doi.org/10.3748/wjg.v22.i5.1745>.
- (100) Rosenberg, B.; Van Camp, L.; Krigas, T. Inhibition of Cell Division in Escherichia Coli by Electrolysis Products from a Platinum Electrode. *Nature* **1965**, *205*, 698–699.
- (101) Fennell, D. A.; Summers, Y.; Cadranel, J.; Benepal, T.; Christoph, D. C.; Lal, R.; Das, M.; Maxwell, F.; Visseren-Grul, C.; Ferry, D. Cisplatin in the Modern Era: The Backbone of First-Line Chemotherapy for Non-Small Cell Lung Cancer. *Cancer Treat. Rev.* **2016**, *44*, 42–50. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2016.01.003>.
- (102) Dasari, S.; Bernard Tchounwou, P. Cisplatin in Cancer Therapy: Molecular Mechanisms of Action. *Eur. J. Pharmacol.* **2014**, *740*, 364–378. <https://doi.org/10.1016/J.EJPBAR.2014.07.025>.
- (103) Saber, M. M.; Al-mahallawi, A. M.; Nassar, N. N.; Stork, B.; Shouman, S. A. Targeting Colorectal Cancer Cell Metabolism through Development of Cisplatin and Metformin Nano-Cubosomes. *BMC Cancer* **2018**, *18* (1), 822. <https://doi.org/10.1186/s12885-018-4727-5>.
- (104) Chválová, K.; Brabec, V.; Kašpárková, J. Mechanism of the Formation of DNA-Protein Cross-Links by Antitumor Cisplatin. *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35* (6), 1812–1821. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm032>.
- (105) Marullo, R.; Werner, E.; Degtyareva, N.; Moore, B.; Altavilla, G.; Ramalingam, S. S.; Doetsch, P. W. Cisplatin Induces a Mitochondrial-ROS Response That Contributes to Cytotoxicity Depending on Mitochondrial Redox Status and Bioenergetic Functions. *PLoS One* **2013**, *8* (11), e81162. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0081162>.
- (106) Moloney, J. N.; Cotter, T. G. ROS Signalling in the Biology of Cancer. *Semin. Cell Dev. Biol.* **2018**, *80*, 50–64. <https://doi.org/10.1016/J.SEMCDB.2017.05.023>.
- (107) Nerush, A. S.; Shchukina, K. M.; Balalaeva, I. V.; Orlova, A. G. Hydrogen Peroxide in the Reactions of Cancer Cells to Cisplatin. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **2019**, *1863* (4), 692–702. <https://doi.org/10.1016/J.BBAGEN.2019.01.013>.
- (108) Sheth, S.; Mukherjea, D.; Rybak, L. P.; Ramkumar, V. Mechanisms of Cisplatin-Induced Ototoxicity and Otoprotection. *Front. Cell. Neurosci.* **2017**, *11*, 338. <https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00338>.
- (109) Volarevic, V.; Djokovic, B.; Jankovic, M. G.; Harrell, C. R.; Fellabaum, C.; Djonov, V.; Arsenijevic, N. Molecular Mechanisms of Cisplatin-Induced Nephrotoxicity: A Balance on the Knife Edge between Renoprotection and Tumor Toxicity. *J. Biomed. Sci.* **2019**, *26* (1), 25. <https://doi.org/10.1186/s12929-019-0518-9>.
- (110) Shahid, F.; Farooqui, Z.; Khan, F. Cisplatin-Induced Gastrointestinal Toxicity: An Update on Possible Mechanisms and on Available Gastroprotective Strategies. *Eur. J. Pharmacol.* **2018**, *827*, 49–57. <https://doi.org/10.1016/J.EJPBAR.2018.03.009>.
- (111) Cervantes, A. *Resistencia a La Quimioterapia: Mecanismos y Vías de Modulación*; 2018.

- (112) Peer, D.; Karp, J. M.; Hong, S.; Farokhzad, O. C.; Margalit, R.; Langer, R. Nanocarriers as an Emerging Platform for Cancer Therapy. *Nat Nanotechnol* . **2007**, 2 (12), 751–760.
- (113) Mármol, I.; Quero, J.; Rodríguez-Yoldi, M. J.; Cerrada, E. Gold as a Possible Alternative to Platinum-Based Chemotherapy for Colon Cancer Treatment. *Cancers (Basel)*. **2019**, 11 (6), 780. <https://doi.org/10.3390/cancers11060780>.
- (114) Comenge, J.; Sotelo, C.; Romero, F.; Gallego, O.; Barnadas, A.; Parada, T. G. C.; Domínguez, F.; Puentes, V. F. Detoxifying Antitumoral Drugs via Nanoconjugation: The Case of Gold Nanoparticles and Cisplatin. *PLoS One* **2012**, 7 (10), e47562. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047562>.
- (115) Mirrahimi, M.; Abed, Z.; Beik, J.; Shiri, I.; Shiralizadeh Dezfuli, A.; Mahabadi, V. P.; Kamran Kamrava, S.; Ghaznavi, H.; Shakeri-Zadeh, A. A Thermo-Responsive Alginate Nanogel Platform Co-Loaded with Gold Nanoparticles and Cisplatin for Combined Cancer Chemo-Photothermal Therapy. *Pharmacol. Res.* **2019**, 143, 178–185. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2019.01.005>.
- (116) Davidi, E. S.; Dreifuss, T.; Motiei, M.; Shai, E.; Bragilovski, D.; Lubimov, L.; Kindler, M. J. J.; Popovtzer, A.; Don, J.; Popovtzer, R. Cisplatin-Conjugated Gold Nanoparticles as a Theranostic Agent for Head and Neck Cancer. *Head Neck* **2018**, 40 (1), 70–78. <https://doi.org/10.1002/hed.24935>.
- (117) Zhao, X.; Pan, J.; Li, W.; Yang, W.; Qin, L.; Pan, Y. Gold Nanoparticles Enhance Cisplatin Delivery and Potentiate Chemotherapy by Decompressing Colorectal Cancer Vessels. *Int. J. Nanomedicine* **2018**, 13, 6207–6221. <https://doi.org/10.2147/IJN.S176928>.
- (118) Hossen, S.; Hossain, M. K.; Basher, M. K.; Mia, M. N. H.; Rahman, M. T.; Uddin, M. J. Smart Nanocarrier-Based Drug Delivery Systems for Cancer Therapy and Toxicity Studies: A Review. *J. Adv. Res.* **2019**, 15, 1–18. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2018.06.005>.
- (119) Lebwohl, D.; Canetta, R. Clinical Oncology Update Clinical Development of Platinum Complexes in Cancer Therapy: An Historical Perspective and an Update. *Eur J Cancer* **1998**, 34 (10), 1522–1534.
- (120) Ho, G. Y.; Woodward, N.; Coward, J. I. G. Cisplatin versus Carboplatin: Comparative Review of Therapeutic Management in Solid Malignancies. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **2016**, 102, 37–46. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2016.03.014>.
- (121) Alcindor, T.; Beauger, N. Oxaliplatin: A Review in the Era of Molecularly Targeted Therapy. *Curr Oncol* **2011**, 18 (1), 18–25.
- (122) Mehmood, R. K. Review of Cisplatin and Oxaliplatin in Current Immunogenic and Monoclonal Antibodies Perspective. *Oncol. Rev.* **2014**, 5 (3), 97–108. <https://doi.org/10.4081/oncol.2014.256>.
- (123) Santoro, V.; Jia, R.; Thompson, H.; Nijhuis, A.; Jeffery, R.; Kiakos, K.; Silver, A. R.; Hartley, J. A.; Hochhauser, D. Role of Reactive Oxygen Species in the Abrogation of Oxaliplatin Activity by Cetuximab in Colorectal Cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* **2016**, 108 (6), djv394. <https://doi.org/10.1093/jnci/djv394>.
- (124) McQuade, R. M.; Carbone, S. E.; Stojanovska, V.; Rahman, A.; Gwynne, R. M.; Robinson, A. M.; Goodman, C. A.; Bornstein, J. C.; Nurgali, K. Role of Oxidative Stress in Oxaliplatin-Induced Enteric Neuropathy and Colonic Dysmotility in Mice. *Br. J. Pharmacol.* **2016**, 173 (24), 3502–3521. <https://doi.org/10.1111/bph.13646>.

- (125) Zanardelli, M.; Micheli, L.; Nicolai, R.; Failli, P.; Ghelardini, C.; Di Cesare Mannelli, L. Different Apoptotic Pathways Activated by Oxaliplatin in Primary Astrocytes vs. Colorectal Cancer Cells. *Int. J. Mol. Sci.* **2015**, *16* (3), 5386–5399. <https://doi.org/10.3390/ijms16035386>.
- (126) Marchetti, P.; Galla, D. A. ; Russo, F. P.; Ricevuto, E.; Flati, V.; Porzio, G.; Ficarella, C.; Cifone, M. G. Apoptosis Induced by Oxaliplatin in Human Colon Cancer HCT15 Cell Line. *Anticancer Res* **2004**, *24* (1), 219–226.
- (127) Hato, S. V.; Khong, A.; De Vries, I. J. M.; Lesterhuis, W. J. Molecular Pathways: The Immunogenic Effects of Platinum-Based Chemotherapeutics. *Clin. Cancer Res.* **2014**, *20* (11), 2831–2837. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-13-3141>.
- (128) Martinez-Balibrea, E.; Martínez-Cardus, A.; Gines, A.; Ruiz De Porras, V.; Moutinho, C.; Layos, L.; Manzano, J. L.; Buges, C.; Bystrup, S.; Esteller, M.; Abad, A. Tumor-Related Molecular Mechanisms of Oxaliplatin Resistance. *Mol. Cancer Ther.* **2015**, *14* (8), 1767–1776. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-14-0636>.
- (129) Boulikas, T.; Vougiouka, M. Recent Clinical Trials Using Cisplatin, Carboplatin and Their Combination Chemotherapy Drugs (Review). *Oncol Rep* **2004**, *11* (3), 559–595. <https://doi.org/https://doi.org/10.3892/or.11.3.559>.
- (130) Kanai, M.; Kobayashi, S.; Fujiwara, Y.; Marubashi, S.; Miyamoto, A.; Shiomi, H.; Kubo, S.; Ikuta, S.; Yanagimoto, H.; Terajima, H.; Kodama, Y.; Seo, S.; Morita, S.; 15, T.; Ajiki, M. D.; Nagano, H.; Ioka, T. A Multi-Institution Phase II Study of Gemcitabine/Cisplatin/S-1 (GCS) Combination Chemotherapy for Patients with Advanced Biliary Tract Cancer (KHBO 1002). *Cancer Chemother Pharmacol* . **2015**, *75* (2), 293–300. <https://doi.org/doi:10.1007/s00280-014-2648-9>.
- (131) Chen, C.-H.; Yang, H.-J.; Shun, C.-T.; Huang, C.-Y.; Huang, K.-H.; Yu, H.-J.; Pu, Y.-S. A Cocktail Regimen of Intravesical Mitomycin-C, Doxorubicin, and Cisplatin (MDP) for Non-Muscle-Invasive Bladder Cancer. *Urol. Oncol. Semin. Orig. Investig.* **2012**, *30* (4), 421–427. <https://doi.org/10.1016/J.UROLONC.2010.06.012>.
- (132) Sasaki, T.; Seto, T.; Yamanaka, T.; Kunitake, N.; Shimizu, J.; Kodaira, T.; Nishio, M.; Kozuka, T.; Takahashi, T.; Harada, H.; Yoshimura, N.; Tsutsumi, S.; Kitajima, H.; Kataoka, M.; Ichinose, Y.; Nakagawa, K.; Nishimura, Y.; Yamamoto, N.; Nakanishi, Y. A Randomised Phase II Trial of S-1 plus Cisplatin versus Vinorelbine plus Cisplatin with Concurrent Thoracic Radiotherapy for Unresectable, Locally Advanced Non-Small Cell Lung Cancer: WJOG5008L. *Br. J. Cancer* **2018**, *119* (6), 675–682. <https://doi.org/10.1038/s41416-018-0243-2>.
- (133) Han, Y.; Jo, H.; Cho, J. H.; Dhanasekaran, D. N.; Song, Y. S. Resveratrol as a Tumor-Suppressive Nutraceutical Modulating Tumor Microenvironment and Malignant Behaviors of Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20* (4), 925. <https://doi.org/10.3390/ijms20040925>.
- (134) Lightbourn, A. V; Thomas, R. D. Crude Edible Fig (*Ficus Carica*) Leaf Extract Prevents Diethylstilbestrol (DES)-Induced DNA Strand Breaks in Single-Cell Gel Electrophoresis (SCGE)/Comet Assay: Literature Review and Pilot Study. *J. Bioequiv. Availab.* **2019**, *11* (2), 19–28. <https://doi.org/10.35248/0975-0851.19.11.389>.
- (135) Pagliara, V.; Nasso, R.; Di Donato, P.; Finore, I.; Poli, A.; Masullo, M.; Arcone, R. Lemon Peel Polyphenol Extract Reduces Interleukin-6-Induced Cell Migration, Invasiveness, and

- Matrix Metalloproteinase-9/2 Expression in Human Gastric Adenocarcinoma MKN-28 and AGS Cell Lines. *Biomolecules* **2019**, 9 (12), 833. <https://doi.org/10.3390/biom9120833>.
- (136) Chaves, F. M.; Pavan, I. C. B.; da Silva, L. G. S.; de Freitas, L. B.; Rostagno, M. A.; Antunes, A. E. C.; Bezerra, R. M. N.; Simabuco, F. M. Pomegranate Juice and Peel Extracts Are Able to Inhibit Proliferation, Migration and Colony Formation of Prostate Cancer Cell Lines and Modulate the Akt/MTOR/S6K Signaling Pathway. *Plant Foods Hum. Nutr.* **2019**, 75 (1), 54–62. <https://doi.org/10.1007/s11130-019-00776-0>.
- (137) Abroodi, Z.; Sajedi, N.; Nikbakht, M.; Soleimani, M. Estrogen Receptor Beta (ER $\beta$ ) May Act as Mediator in Apoptotic Induction of Grape Seed Extract (GSE). *Asian Pacific J. Cancer Prev.* **2019**, 20 (12), 3729–3734. <https://doi.org/10.31557/APJCP.2019.20.12.3729>.
- (138) Tang, X.; Yan, L.; Zhu, L.; Jiao, D.; Chen, J.; Chen, Q. Salvianolic Acid A Reverses Cisplatin Resistance in Lung Cancer A549 Cells by Targeting C-Met and Attenuating Akt/MTOR Pathway. *J. Pharmacol. Sci.* **2017**, 135 (1), 1–7. <https://doi.org/10.1016/J.JPHS.2017.06.006>.
- (139) Zhang, Y.; Wang, X.; Han, L.; Zhou, Y.; Sun, S. Green Tea Polyphenol EGCG Reverse Cisplatin Resistance of A549/DDP Cell Line through Candidate Genes Demethylation. *Biomed. Pharmacother.* **2015**, 69, 285–290. <https://doi.org/10.1016/J.BIOPHA.2014.12.016>.
- (140) Sharma, R.; Gatchie, L.; Williams, I. S.; Jain, S. K.; Vishwakarma, R. A.; Chaudhuri, B.; Bharate, S. B. Glycyrrhiza Glabra Extract and Quercetin Reverses Cisplatin Resistance in Triple-Negative MDA-MB-468 Breast Cancer Cells via Inhibition of Cytochrome P450 1B1 Enzyme. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2017**, 27 (24), 5400–5403. <https://doi.org/10.1016/J.BMCL.2017.11.013>.
- (141) Sinha, S.; Sharma, S.; Vora, J.; Shah, H.; Srivastava, A.; Shrivastava, N. Mucuna Pruriens (L.) DC Chemo Sensitize Human Breast Cancer Cells via Downregulation of Prolactin-Mediated JAK2/STAT5A Signaling. *J. Ethnopharmacol.* **2018**, 217, 23–35. <https://doi.org/10.1016/J.JEP.2018.02.006>.
- (142) Brahmi, D.; Ayed, Y.; Hfaiedh, M.; Bouaziz, C.; Mansour, H. Ben; Zourgui, L.; Bacha, H. Protective Effect of Cactus Cladode Extract against Cisplatin Induced Oxidative Stress, Genotoxicity and Apoptosis in Balb/c Mice: Combination with Phytochemical Composition. *BMC Complement. Altern. Med.* **2012**, 12, 111. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-12-111>.
- (143) Rjeibi, I.; Feriani, A.; Saad, A. Ben; Sdayria, J.; Saidi, I.; Ncib, S.; Souid, S.; Allagui, M. S.; Hfaiedh, N. Lycium Europaeum Extract: A New Potential Antioxidant Source against Cisplatin-Induced Liver and Kidney Injuries in Mice. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2018**, 2018, 1630751. <https://doi.org/10.1155/2018/1630751>.
- (144) Mohamadi Yarijani, Z.; Godini, A.; Madani, S. H.; Najafi, H. Reduction of Cisplatin-Induced Renal and Hepatic Side Effects in Rat through Antioxidative and Anti-Inflammatory Properties of Malva Sylvestris L. Extract. *Biomed. Pharmacother.* **2018**, 106, 1767–1774. <https://doi.org/10.1016/J.BIOPHA.2018.07.115>.
- (145) Khalaf, A. A.; Hussein, S.; Tohamy, A. F.; Marouf, S.; Yassa, H. D.; Zaki, A. R.; Bishayee, A. Protective Effect of Echinacea Purpurea (Immulant) against Cisplatin-Induced

- Immunotoxicity in Rats. *DARU, J. Pharm. Sci.* **2019**, *27* (1), 233–241. <https://doi.org/10.1007/s40199-019-00265-4>.
- (146) Afsar, T.; Razak, S.; Khan, M. R.; Almajwal, A. Acacia Hydaspica Ethyl Acetate Extract Protects against Cisplatin-Induced DNA Damage, Oxidative Stress and Testicular Injuries in Adult Male Rats. *BMC Cancer* **2017**, *17* (1), 883. <https://doi.org/10.1186/s12885-017-3898-9>.
- (147) Almeer, R. S.; Abdel Moneim, A. E. Evaluation of the Protective Effect of Olive Leaf Extract on Cisplatin-Induced Testicular Damage in Rats. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2018**, *2018*, 8487248. <https://doi.org/10.1155/2018/8487248>.
- (148) Afsar, T.; Razak, S.; Almajwal, A.; Shabbir, M.; Khan, M. R. Evaluating the Protective Potency of Acacia Hydaspica R. Parker on Histological and Biochemical Changes Induced by Cisplatin in the Cardiac Tissue of Rats. *BMC Complement. Altern. Med.* **2019**, *19* (1), 182. <https://doi.org/10.1186/s12906-019-2575-8>.
- (149) Ibrahim, M. A.; Bakhaat, G. A.; Tammam, H. G.; Mohamed, R. M.; El-Naggar, S. A. Cardioprotective Effect of Green Tea Extract and Vitamin E on Cisplatin-Induced Cardiotoxicity in Mice: Toxicological, Histological and Immunohistochemical Studies. *Biomed. Pharmacother.* **2019**, *113*, 108731. <https://doi.org/10.1016/J.BIOPHA.2019.108731>.
- (150) Bossi, P.; Cortinovis, D.; Fatigoni, S.; Cossu Rocca, M.; Fabi, A.; Seminara, P.; Ripamonti, C.; Alfieri, S.; Granata, R.; Bergamini, C.; Agustoni, F.; Bidoli, P.; Nolè, F.; Pessi, M. A.; Macchi, F.; Michellini, L.; Montanaro, F.; Roila, F. A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Multicenter Study of a Ginger Extract in the Management of Chemotherapy-Induced Nausea and Vomiting (CINV) in Patients Receiving High-Dose Cisplatin. *Ann. Oncol.* **2017**, *28* (10), 2547–2551. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdx315>.
- (151) Nguyen, C.; Baskaran, K.; Pupulin, A.; Ruvinov, I.; Zaitoon, O.; Grewal, S.; Scaria, B.; Mehadli, A.; Vegh, C.; Pandey, S. Hibiscus Flower Extract Selectively Induces Apoptosis in Breast Cancer Cells and Positively Interacts with Common Chemotherapeutics. *BMC Complement. Altern. Med.* **2019**, *19* (1), 98. <https://doi.org/10.1186/s12906-019-2505-9>.
- (152) Liu, W.; Wu, T.-C.; Hong, D.-M.; Hu, Y.; Fan, T.; Guo, W.-J.; Xu, Q. Carnosic Acid Enhances the Anti-Lung Cancer Effect of Cisplatin by Inhibiting Myeloid-Derived Suppressor Cells. *Chin. J. Nat. Med.* **2018**, *16* (12), 907–915. [https://doi.org/10.1016/S1875-5364\(18\)30132-8](https://doi.org/10.1016/S1875-5364(18)30132-8).
- (153) Huaizhi, Z.; Yuantao, N. China's Ancient Gold Drugs. *Gold Bull.* **2001**, *34* (1), 24–29.
- (154) Kenny, S. L. *Gold: A Cultural Encyclopedia*, 2nd ed.; ABC-CLIO, LCC: Santa Barbara, 2011.
- (155) Koch, R. Über Bakteriologische Forschung. *Dtsch. Med. Wochenstr.* **1890**, *16*, 756–757.
- (156) Ramos, E. P.; Yanet, L.; Rodríguez, R.; Loyola, M. P.; Ramos, P.; Rojas, E.; Ly, R.; Loyola, P.; La, M. La Tuberculosis a Través de La Historia: Un Enemigo de La Humanidad. *Rev haban cienc méd* **2018**, *17* (3), 353–363.
- (157) Forestier, J. Rheumatoid Arthritis and Its Treatment by Gold Salts The Results of Six Years' Experience. *J. Lab. Clin. Med.* **1935**, *20*, 827–840. <https://doi.org/https://doi.org/10.5555/uri:pil:S0022214335904991>.

- (158) Alessio, E. Gold-Based Therapeutic Agents A New Perspective. In *Bioinorganic Medicinal Chemistry*; John Wiley & Sons, Ed.; 2011; pp 118–136.
- (159) Fricker, S. P. Medical Uses of Gold Compounds: Past, Present and Future. *Gold Bull.* **1996**, *29* (2), 53–60.
- (160) Eisler, R. Chrysotherapy: A Synoptic Review. *Inflamm. Res.* **2003**, *52* (12), 487–501. <https://doi.org/10.1007/s00011-003-1208-2>.
- (161) Fries, J. F.; Bloch, D.; Spitz, P.; Mitchell, D. M. Cancer in Rheumatoid Arthritis: A Prospective Long-Term Study of Mortality. *Am. J. Med.* **1985**, *78* (1), 56–59. [https://doi.org/10.1016/0002-9343\(85\)90247-5](https://doi.org/10.1016/0002-9343(85)90247-5).
- (162) Shin, D. W.; Kwon, Y. J.; Ye, D. J.; Baek, H. S.; Lee, J. E.; Chun, Y. J. Auranofin Suppresses Plasminogen Activator Inhibitor-2 Expression through Annexin A5 Induction in Human Prostate Cancer Cells. *Biomol. Ther.* **2017**, *25* (2), 177–185. <https://doi.org/10.4062/biomolther.2016.223>.
- (163) He, M.-F.; Gao, X.-P.; Li, S.-C.; He, Z.-H.; Chen, N.; Wang, Y.-B.; She, J.-X. Anti-Angiogenic Effect of Auranofin on HUVECs in Vitro and Zebrafish in Vivo. *Eur. J. Pharmacol.* **2014**, *740*, 240–247. <https://doi.org/10.1016/J.EJPHAR.2014.07.034>.
- (164) Chen, X.; Zhou, H. J.; Huang, Q.; Lu, L.; Min, W. Novel Action and Mechanism of Auranofin in Inhibition of Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-3-Dependent Lymphangiogenesis. *Anticancer Agents Med Chem* **2014**, *14* (7), 946–954. <https://doi.org/10.2174/1871520614666140610102651>.
- (165) Fiskus, W.; Saba, N.; Shen, M.; Ghias, M.; Liu, J.; Gupta, S. Das; Chauhan, L.; Rao, R.; Gunewardena, S.; Schorno, K.; Austin, C. P.; Maddocks, K.; Byrd, J.; Melnick, A.; Huang, P.; Wiestner, A.; Bhalla, K. N. Auranofin Induces Lethal Oxidative and Endoplasmic Reticulum Stress and Exerts Potent Preclinical Activity against Chronic Lymphocytic Leukemia. *Cancer Res.* **2014**, *74* (9), 2520–2532. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-2033>.
- (166) Raninga, P. V.; Lee, A. C.; Sinha, D.; Shih, Y.-Y.; Mittal, D.; Makhale, A.; Bain, A. L.; Nanayakarra, D.; Tonissen, K. F.; Kalimutho, M.; Khanna, K. K. Therapeutic Cooperation Between Auranofin, a Thioredoxin Reductase Inhibitor and Anti-PD-L1 Antibody for Treatment of Triple-Negative Breast Cancer. *Int J Cancer* **2020**, *146* (1), 123–136. <https://doi.org/10.1002/ijc.32410>.
- (167) Zhang, X.; Selvaraju, K.; Saei, A. A.; D'Arcy, P.; Zubarev, R. A.; Arnér, E. S.; Linder, S. Repurposing of Auranofin: Thioredoxin Reductase Remains a Primary Target of the Drug. *Biochimie* **2019**, *162*, 46–54. <https://doi.org/10.1016/J.BIOCHI.2019.03.015>.
- (168) Maia, P.; Deflon, V.; Abram, U. Gold(III) Complexes in Medicinal Chemistry. *Futur. Med Chem* **2014**, *6* (13), 1515–1536. <https://doi.org/doi:10.4155/fmc.14.87>.
- (169) Bertrand, B.; Williams, M. R. M.; Bochmann, M. Gold(III) Complexes for Antitumor Applications: An Overview. *Chem. - A Eur. J.* **2018**, *24* (46), 11840–11851. <https://doi.org/10.1002/chem.201800981>.
- (170) Nardon, C.; Fregona, D. Gold(III) Complexes in the Oncological Preclinical Arena: From Aminoderivatives to Peptidomimetics. *Curr Top Med Chem* **2016**, *16* (3), 360–380. <https://doi.org/10.2174/1568026615666150827094500>.

- (171) Zou, T.; Lum, C. T.; Lok, C. N.; Zhang, J. J.; Che, C. M. Chemical Biology of Anticancer Gold(III) and Gold(I) Complexes. *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44* (24), 8786–8801. <https://doi.org/10.1039/c5cs00132c>.
- (172) Casini, A.; Hartinger, C.; Gabbiani, C.; Mini, E.; Dyson, P. J.; Keppler, B. K.; Messori, L. Gold(III) Compounds as Anticancer Agents: Relevance of Gold-Protein Interactions for Their Mechanism of Action. *J. Inorg. Biochem.* **2008**, *102* (3), 564–575. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2007.11.003>.
- (173) Che, C. M.; Sun, R. W. Y. Therapeutic Applications of Gold Complexes: Lipophilic Gold(III) Cations and Gold(I) Complexes for Anti-Cancer Treatment. *Chem. Commun.* **2011**, *47* (34), 9554–9560. <https://doi.org/10.1039/c1cc10860c>.
- (174) Ronconi, L.; Aldinucci, D.; Dou, Q. P.; Fregona, D. Latest Insights into the Anticancer Activity of Gold(III)-Dithiocarbamate Complexes. *Cancer Agents Med. Chem.* **2010**, *10*, 283–292.
- (175) Sun, R. W. Y.; Che, C. M. The Anti-Cancer Properties of Gold(III) Compounds with Dianionic Porphyrin and Tetradentate Ligands. *Coord. Chem. Rev.* **2009**, *253* (11–12), 1682–1691. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2009.02.017>.
- (176) Milacic, V.; Dou, Q. P. The Tumor Proteasome as a Novel Target for Gold(III) Complexes: Implications for Breast Cancer Therapy. *Coord. Chem. Rev.* **2009**, *253* (11–12), 1649–1660. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2009.01.032>.
- (177) Cinellu, M. A.; Minghetti, G. Gold(I) and Gold(III) Complexes with Anionic Oxygen Donor Ligands: Hydroxo, Oxo and Alkoxo Complexes. *Gold Bull.* **2002**, *35* (1), 11–20.
- (178) Radisavljević, S.; Čočić, D.; Jovanović, S.; Šmit, B.; Petković, M.; Milivojević, N.; Planojević, N.; Marković, S.; Petrović, B. Synthesis, Characterization, DFT Study, DNA/BSA-Binding Affinity, and Cytotoxicity of Some Dinuclear and Trinuclear Gold(III) Complexes. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2019**, *24* (7), 1057–1076. <https://doi.org/10.1007/s00775-019-01716-8>.
- (179) Ronconi, L.; Marzano, C.; Zanello, P.; Corsini, M.; Miolo, G.; Maccà, C.; Trevisan, A.; Fregona, D. Gold(III) Dithiocarbamate Derivatives for the Treatment of Cancer: Solution Chemistry, DNA Binding, and Hemolytic Properties. *J. Med. Chem.* **2006**, *49* (5), 1648–1657. <https://doi.org/10.1021/jm0509288>.
- (180) Altaf, M.; Casagrande, N.; Mariotto, E.; Baig, N.; Kawde, A. N.; Corona, G.; Larcher, R.; Borghese, C.; Pavan, C.; Seliman, A. A.; Aldinucci, D.; Isab, A. A. Potent in Vitro and in Vivo Anticancer Activity of New Bipyridine and Bipyrimidine Gold (III) Dithiocarbamate Derivatives. *Cancers (Basel)*. **2019**, *11* (4), 474. <https://doi.org/10.3390/cancers11040474>.
- (181) Dandash, F.; Léger, D. Y.; Fidanzi-Dugas, C.; Nasri, S.; Brégier, F.; Granet, R.; Karam, W.; Diab-Assaf, M.; Sol, V.; Liagre, B. In Vitro Anticancer Activity of New Gold(III) Porphyrin Complexes in Colon Cancer Cells. *J. Inorg. Biochem.* **2017**, *177*, 27–38. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2017.08.024>.
- (182) Jacques, A.; Lebrun, C.; Casini, A.; Kieffer, I.; Proux, O.; Latour, J. M.; Sénèque, O. Reactivity of Cys4 Zinc Finger Domains with Gold(III) Complexes: Insights into the Formation of “Gold Fingers.” *Inorg. Chem.* **2015**, *54* (8), 4104–4113. <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.5b00360>.
- (183) Wenzel, M. N.; Bonsignore, R.; Thomas, S. R.; Bourissou, D.; Barone, G.; Casini, A.

- Cyclometalated Au(III) Complexes for Cysteine Arylation in Zinc Finger Protein Domains: Towards Controlled Reductive Elimination. *Chem. - A Eur. J.* **2019**, *25* (32), 7628–7634. <https://doi.org/10.1002/chem.201901535>.
- (184) Serratrice, M.; Edafe, F.; Mendes, F.; Scopelliti, R.; Zakeeruddin, S. M.; Grätzel, M.; Santos, I.; Cinellu, M. A.; Casini, A. Cytotoxic Gold Compounds: Synthesis, Biological Characterization and Investigation of Their Inhibition Properties of the Zinc Finger Protein PARP-1. *Dalt. Trans.* **2012**, *41* (11), 3287–3293. <https://doi.org/10.1039/c2dt11913g>.
- (185) Datta, D. On Pearson's HSAB Principle. *Inorg. Chem* **1992**, *31*, 2797–2800.
- (186) Mirabelli, C. K.; Sung, C.-M.; Zimmerman, J. P.; Hill, D. T.; Mong, S.; Crooke, S. T. Interactions of Gold Coordination Complexes with DNA. *Biochem. Pharmacol.* **1986**, *35* (9), 1427–1433. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(86\)90106-1](https://doi.org/10.1016/0006-2952(86)90106-1).
- (187) Labunskyy, V. M.; Hatfield, D. L.; Gladyshev, V. N. Selenoproteins: Molecular Pathways and Physiological Roles. *Physiol. Rev.* **2014**, *94* (3), 739–777. <https://doi.org/10.1152/physrev.00039.2013>.
- (188) Mahmood, D. F. D.; Abderrazak, A.; El Hadri, K.; Simmet, T.; Rouis, M. The Thioredoxin System as a Therapeutic Target in Human Health and Disease. *Antioxidants Redox Signal.* **2013**, *19* (11), 1266–1303. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.4757>.
- (189) Lu, J.; Holmgren, A. The Thioredoxin Antioxidant System. *Free Radic. Biol. Med.* **2014**, *66*, 75–87. <https://doi.org/10.1016/J.FREERADBIOMED.2013.07.036>.
- (190) Fernandes, A. P.; Holmgren, A. Glutaredoxins: Glutathione-Dependent Redox Enzymes With Functions Far Beyond a Simple Thioredoxin Backup System. *Antioxid Redox Signal* **2004**, *6* (1), 63–74. <https://doi.org/10.1089/152308604771978354>.
- (191) Maurice, M. M.; Nakamura, H.; Gringhuis, S.; Okamoto, T.; Yoshida, S.; Kullmann, F.; Lechner, S.; van der Voort, E. A.; Versendaal, J.; Muller-Ladner, U.; Yodoi, J.; Tak, P. P.; Breedveld, F. C.; Verweij, C. L. Expression of the Thioredoxin-Thioredoxin Reductase System in the Inflamed Joints of Patients With Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheum* **1999**, *42* (11), 2430–2439. [https://doi.org/10.1002/1529-0131\(199911\)42:11<2430::AID-ANR22>3.0.CO;2-6](https://doi.org/10.1002/1529-0131(199911)42:11<2430::AID-ANR22>3.0.CO;2-6).
- (192) Griffiths, H. R.; Bennett, S. J.; Olofsson, P.; Dunston, C. R. Thioredoxin as a Putative Biomarker and Candidate Target in Age-Related Immune Decline. *Biochem. Soc. Trans.* **2014**, *42* (4), 922–927. <https://doi.org/10.1042/BST20140162>.
- (193) Madeira, J. M.; Gibson, D. L.; Kean, W. F.; Klegeris, A. The Biological Activity of Auranofin: Implications for Novel Treatment of Diseases. *Inflammopharmacology* **2012**, *20* (6), 297–306. <https://doi.org/10.1007/s10787-012-0149-1>.
- (194) Omata, Y.; Folan, M.; Melissa, ; Regina, S. ; Messer, L. W.; Petra, ; Lockwood, E.; David, ; Hobbs, T.; Bouillaguet, S.; Sano, H.; Lewis, J. B.; Wataha, J. Sublethal Concentrations of Diverse Gold Compounds Inhibit Mammalian Cytosolic Thioredoxin Reductase (TrxR1). *Toxicol Vitro* **2006**, *20* (6), 882–890. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2006.01.012>.
- (195) Garcia, A.; Machado, R. C.; Grazul, R. M.; Lopes, M. T. P.; Corrêa, C. C.; Dos Santos, H. F.; De Almeida, M. V.; Silva, H. Novel Antitumor Adamantane-Azole Gold(I) Complexes as Potential Inhibitors of Thioredoxin Reductase. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2016**, *21* (2), 275–292. <https://doi.org/10.1007/s00775-016-1338-y>.

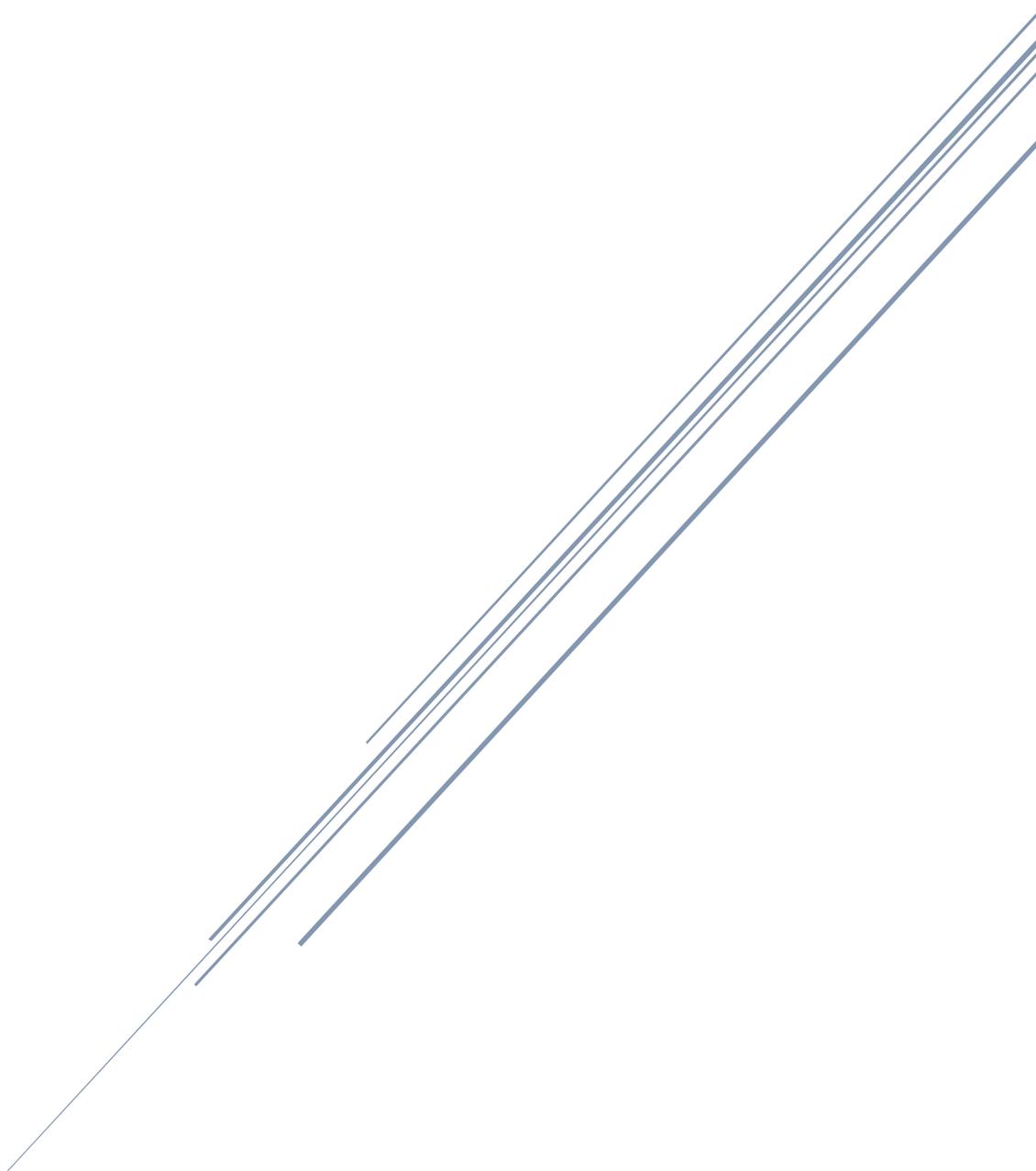
- (196) Curran, D.; Dada, O.; Müller-Bunz, H.; Rothemund, M.; Sánchez-Sanz, G.; Schobert, R.; Zhu, X.; Tacke, M. Synthesis and Cytotoxicity Studies of Novel NHC\*-Gold(I) Complexes Derived from Lepidiline A. *Molecules* **2018**, *23* (8), 2031. <https://doi.org/10.3390/molecules23082031>.
- (197) Vergara, E.; Casini, A.; Sorrentino, F.; Zava, O.; Cerrada, E.; Rigobello, M. P.; Bindoli, A.; Laguna, M.; Dyson, P. J. Anticancer Therapeutics That Target Selenoenzymes: Synthesis, Characterization, in Vitro Cytotoxicity, and Thioredoxin Reductase Inhibition of a Series of Gold(I) Complexes Containing Hydrophilic Phosphine Ligands. *ChemMedChem* **2010**, *5* (1), 96–102. <https://doi.org/10.1002/cmdc.200900370>.
- (198) Vergara, E.; Cerrada, E.; Clavel, C.; Casini, A.; Laguna, M. Thiolato Gold(i) Complexes Containing Water-Soluble Phosphane Ligands: A Characterization of Their Chemical and Biological Properties. *Dalt. Trans.* **2011**, *40* (41), 10927–10935. <https://doi.org/10.1039/c1dt10892a>.
- (199) Ross, C. A.; Poirier, M. A. Protein Aggregation and Neurodegenerative Disease. *Nat. Med.* **2004**, *10* (7), S10. <https://doi.org/10.1038/nm1066>.
- (200) Zheng, Q.; Huang, T.; Zhang, L.; Zhou, Y.; Luo, H.; Xu, H.; Wang, X. Dysregulation of Ubiquitin-Proteasome System in Neurodegenerative Diseases. *Front. Aging Neurosci.* **2016**, *8*, 303. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2016.00303>.
- (201) Myeku, N.; Duff, K. E. Targeting the 26S Proteasome To Protect Against Proteotoxic Diseases. *Trends Mol. Med.* **2018**, *24* (1), 18–29. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2017.11.006>.
- (202) Bhowmick, D. C.; Jeremic, A. Functional Proteasome Complex Is Required for Turnover of Islet Amyloid Polypeptide in Pancreatic  $\beta$ -Cells. *J. Biol. Chem.* **2018**, *293* (37), 14210–14223. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.002414>.
- (203) Press, M.; Jung, T.; König, J.; Grune, T.; Höhn, A. Protein Aggregates and Proteostasis in Aging: Amylin and  $\beta$ -Cell Function. *Mech. Ageing Dev.* **2019**, *177*, 46–54. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2018.03.010>.
- (204) Fernando, R.; Drescher, C.; Nowotny, K.; Grune, T.; Castro, J. P. Impaired Proteostasis during Skeletal Muscle Aging. *Free Radic. Biol. Med.* **2019**, *132*, 58–66. <https://doi.org/10.1016/J.FREERADBIOMED.2018.08.037>.
- (205) Ruegsegger, C. Proteostasis Impairment in ALS. *Brain Res.* **2016**, *1648*, 571–579. <https://doi.org/10.1016/J.BRAINRES.2016.03.032>.
- (206) Budenholzer, L.; Cheng, C. L.; Li, Y.; Hochstrasser, M. Proteasome Structure and Assembly. *J. Mol. Biol.* **2017**, *429* (22), 3500–3524. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2017.05.027>.
- (207) Bard, J. A. M.; Goodall, E. A.; Greene, E. R.; Jonsson, E.; Dong, K. C.; Martin, A. Structure and Function of the 26S Proteasome. *Annu Rev Biochem* **2018**, *87*, 697–724. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem>.
- (208) Saeki, Y.; Tanaka, K. Assembly and Function of the Proteasome. *Methods Mol. Biol.* **2012**, *832*, 315–337. [https://doi.org/10.1007/978-1-61779-474-2\\_22](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-474-2_22).
- (209) Melino, G. Discovery of the Ubiquitin Proteasome System and Its Involvement in Apoptosis. *Cell Death Differ.* **2005**, *12* (9), 1155–1157.

<https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401740>.

- (210) Thibaudeau, T. A.; Smith, D. M. A Practical Review of Proteasome Pharmacology. *Pharmacol. Rev.* **2019**, *71* (2), 170–197. <https://doi.org/10.1124/pr.117.015370>.
- (211) Liu, N.; Li, X.; Huang, H.; Zhao, C.; Liao, S.; Yang, C.; Liu, S.; Song, W.; Lu, X.; Lan, X.; Chen, X.; Yi, S.; Xu, L.; Jiang, L.; Zhao, C.; Dong, X.; Zhou, P.; Li, S.; Wang, S.; Shi, X.; Dou, P. Q.; Wang, X.; Liu, J. Clinically Used Antirheumatic Agent Auranofin Is a Proteasomal Deubiquitinase Inhibitor and Inhibits Tumor Growth. *Oncotarget* **2014**, *5* (14), 5453–5471. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.2113>.
- (212) Fort Casamartina, E.; Arribas Hortiguera, L.; Bleda Pérez, C.; Muñoz Sánchez, C.; Peiro Martínez, I.; Perayre Badía, M.; Clopés Estela, A. Interacción Entre Tratamientos Oncológicos y Soporte Nutricional. *Nutr Hosp* **2016**, *33* (1), 50–57.
- (213) Ruiz-García, A.; Bermejo, M.; Moss, A.; Casabo, V. G. Pharmacokinetics in Drug Discovery. *J. Pharm. Sci.* **2008**, *97* (2), 654–690. <https://doi.org/10.1002/jps.21009>.
- (214) Miyasaka, R.; Kikukawa, K.; Sakuma, S. Enhanced Solubility and Intestinal Absorption of Cisplatin by Coating with Nano-Hydroxyapatite. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* **2016**, *35*, 294–302. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2016.08.005>.
- (215) Sugio, S.; Kashima, A.; Mochizuki, S.; Noda, M.; Kobayashi, K. Crystal Structure of Human Serum Albumin at 2.5 Å Resolution. *Protein Eng* **1999**, *12* (6), 439–446. <https://doi.org/doi:10.1093/protein/12.6.439>.
- (216) Bairagi, U.; Mittal, P.; Mishra, B. Albumin: A Versatile Drug Carrier. *Austin Ther.* **2015**, *2* (2), 1021.
- (217) Larsen, M. T.; Kuhlmann, M.; Hvam, M. L.; Howard, K. A. Albumin-Based Drug Delivery: Harnessing Nature to Cure Disease. *Mol. Cell. Ther.* **2016**, *4* (1), 3. <https://doi.org/10.1186/s40591-016-0048-8>.
- (218) Bertucci, C.; Domenici, E. Reversible and Covalent Binding of Drugs to Human Serum Albumin: Methodological Approaches and Physiological Relevance. *Curr. Med. Chem.* **2002**, *9*, 1463.
- (219) Cai, H. H.; Zhong, X.; Yang, P. H.; Wei, W.; Chen, J.; Cai, J. Probing Site-Selective Binding of Rhodamine B to Bovine Serum Albumin. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **2010**, *372* (1–3), 35–40. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2010.09.017>.
- (220) Poulin, P.; Haddad, S. Albumin and Uptake of Drugs in Cells: Additional Validation Exercises of a Recently Published Equation That Quantifies the Albumin-Facilitated Uptake Mechanism(s) in Physiologically Based Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Modeling Research. *J. Pharm. Sci.* **2015**, *104* (12), 4448–4458. <https://doi.org/10.1002/jps.24676>.
- (221) Yang, F.; Bian, C.; Zhu, L.; Zhao, G.; Huang, Z.; Huang, M. Effect of Human Serum Albumin on Drug Metabolism: Structural Evidence of Esterase Activity of Human Serum Albumin. *J. Struct. Biol.* **2007**, *157* (2), 348–355. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2006.08.015>.
- (222) Baba, T.; Touchi, A.; Ito, K.; Yamaguchi, Y.; Yamazoe, Y.; Ohno, Y.; Sugiyama, Y. Effects of Serum Albumin and Liver Cytosol on CYP2C9- and CYP3A4-Mediated Drug Metabolism. *Drug Metab Pharmacokinet* **2002**, *17* (6), 522–531. <https://doi.org/doi:10.2133/dmpk.17.522>.

- (223) Sandborn, W. J. Tailoring Treatment to the Individual Patient: Drug Monitoring. *Dig. Dis.* **2014**, 32, 88–91. <https://doi.org/10.1159/000367834>.

# MATERIALS AND METHODS





## Synthesis of metallic complexes

Gold(I) and silver(I) complexes were synthesized by members of Inorganic Chemistry department of University of Zaragoza.

1. Synthesis of alkynyl gold(I) complexes coordinated with soluble phosphines PTA and DAPTA: [Au(C≡CPh)(PTA)] (**1a**), [Au(C≡CPh)(DAPTA)] (**1b**) and [Au(C≡C-2-NC<sub>5</sub>H<sub>4</sub>)(PTA)] (**2a**).

Described by Vergara *et al.*<sup>1</sup> To a solution of KOH (0.022 g, 0.385 mmol) in MeOH (*ca.* 10 ml) containing the alkyne (0.308 mmol) was added [AuCl(PR'<sub>3</sub>)] (PR'<sub>3</sub> = PTA, DAPTA) (0.257 mmol). Then, the mixture was stirred for *ca.* 20 h at room temperature; the precipitate was isolated by filtration, washed with methanol and diethyl ether and dried in air.

2. Synthesis of alkynyl gold(I) complexes derived from 3-hydroxyflavones

General procedure for the preparation of the 3-hydroxyflavones (**HL-1a-d**). NaOH (0.4 g) was added to a methanol (20 mL) solution of 2-hydroxyacetophenone (3.32 mmol) and benzaldehyde or the different para-substituted benzaldehydes (3.32 mmol). The reaction was refluxed for 3 h until it acquires an intense orange color. The reaction was cooled to room temperature and followed by the addition of NaOH (0.4 g) dissolved in 20 mL of water and 1.45 mL of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (33% w/v). After 3 h of stirring, the mixture was poured into an ice-water solution affording yellow solids, which were filtered off and dried in air.

General procedure for the preparation of the propargyl flavones (**HL-2a-d**). K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> in excess and propargylbromide (1.6 equivalents) were added to a solution of flavones **HL-1a-d**. The reaction was heated under reflux for 6 hours, and after this time, the excess of base was filtered off and the residue was evaporated to dryness.

Synthesis of **3a-d** and **4a-d** series was described by Mármol *et al.*<sup>2</sup> To a solution of KOH (0.225 mmol) in MeOH (*ca.* 10 mL) containing **L2a-d** (0.15 mmol) was added [AuCl(PR'<sub>3</sub>)] (PR'<sub>3</sub> = PPh<sub>3</sub>, PTA) (0.15 mmol). The corresponding solids precipitated in the methanolic solution, and were isolated by filtration after 20 h of stirring at room temperature, washed with methanol and diethyl ether, and dried *in vacuo*.

Synthesis of the [Au(L)(NHC)] complexes (series **5a-d** and **6a-d**). To a solution of KOH (0.35 mmol) in MeOH (*ca.* 10 mL) containing **La-d** (0.2 mmol) was added [AuCl(NHC)] (NHC = IMe, IPr) (0.18 mmol). The corresponding solution was evaporated to dryness after 8 h of stirring at room temperature. Dichloromethane (10 mL) was added and the solution was filtered over Celite, concentrated and the addition of diethyl ether lead to white solids, which isolated by filtration and dried in air.

**3. Synthesis of gold(I) and silver(I) complexes with N- or S-donor ligands derived from 2-anilino-pyridine**

Synthesis of the ligands  $\{(4\text{-pyCO})\text{N}(\text{Ph})(\text{py})\}$  (**L1**) and  $\{(2\text{-}(\text{C}_4\text{H}_4\text{S})\text{CO})\text{N}(\text{Ph})(\text{py})\}$  (**L2**). To a dichloromethane solution (10 mL) of 2-anilino-pyridine (0.3404 g, 2 mmol) under argon atmosphere was added  $\text{NEt}_3$  (0.2626 g, 2.6 mmol) and 4-chlorocarbonylpyridine (0.3560 g, 2 mmol) or 2-chlorocarbonylthiophene (0.2932 g, 2 mmol). The reaction was stirred for 24h at room temperature. The solution was washed with a saturated solution of  $\text{NaHCO}_3$  and then washed with dichloromethane (3x20mL) and dried with anhydrous  $\text{MgSO}_4$ . Then the solution was filtered through Celite and the solution was reduced to minimum volume under vacuum. The addition of n-hexane afforded a white solid which was filtered of and washed with n-hexane.

Synthesis of the complexes  $[\text{Au}(\text{L})(\text{PPh}_3)](\text{OTf})$  (**L1**, **7a**; **L2**, **7b**). To a dichloromethane solution (10 mL) of  $[\text{AuCl}(\text{PPh}_3)]$  (0.1484 g, 0.3 mmol) was added  $[\text{Ag}(\text{OTf})]$  (0.0848 g, 0.33 mmol). After 45 min of stirring protected from light, the white solid ( $\text{AgCl}$ ) was filtered through Celite and the solution was added to dichloromethane solution (10 mL) of **L1** (0.0743 g, 0.27 mmol) or **L2** (0.0757 g, 0.27 mmol). The reaction was stirred for 2h at room temperature. Then the solution was reduced to minimum volume under vacuum. A white solid was obtained and washed with n-hexane.

Synthesis of the complexes  $[\text{Ag}(\text{OTf})(\text{L})(\text{PPh}_3)]$  (**L1**, **8a**; **L2**, **8b**). To a dichloromethane solution (10 mL) of  $[\text{Ag}(\text{OTf})(\text{PPh}_3)]$  (0.1557 g, 0.3 mmol) was added **L1** or **L2** (0.3 mmol). After 45 min of stirring protected from light at room temperature, the solution was reduced to minimum volume under vacuum. A white solid was obtained and washed with n-hexane.

Synthesis of the complexes  $[\text{Ag}_2(\text{OTf})_2(\text{L})(\text{PPh}_3)_2]$  (**L1**, **9a**; **L2**, **9b**). To a dichloromethane solution (10 mL) of  $[\text{Ag}(\text{OTf})(\text{PPh}_3)]$  (0.1557 g, 0.6 mmol) was added **L1** or **L2** (0.3 mmol). After 45 min of stirring protected from light at room temperature, the solution was reduced to minimum volume under vacuum. A white solid was obtained and washed with n-hexane.

Synthesis of the complexes  $[\text{Ag}(\text{OTf})(\text{L})]_2$  (**L1**, **10a**; **L2**, **10b**). To a dichloromethane solution (10 mL) of  $[\text{Ag}(\text{OTf})]$  (0.051 g, 0.2 mmol) was added **L1** or **L2** (0.2 mmol). After 45 min of stirring protected from light at room temperature, the solution was reduced to minimum volume under vacuum. A white solid was obtained and washed with n-hexane.

Synthesis of the complexes  $[\text{Ag}(\text{OTf})(\text{L})_2]$  (**L1**, **11a**; **L2**, **11b**). To a dichloromethane solution (10 mL) of  $[\text{Ag}(\text{OTf})]$  (0.051 g, 0.2 mmol) was added **L1** or **L2** (0.4 mmol). After 45 min of stirring protected from light at room temperature, the solution was reduced to minimum volume under vacuum. A white solid was obtained and washed with n-hexane.

## Distribution coefficient calculation

N-octanol-water partition coefficient was determined by the shake-flask method. PBS buffered distilled water (100 ml, phosphate buffer  $[\text{PO}_4^{3-}] = 10 \mu\text{M}$ , 0.15 mM NaCl, pH 7.4) and 100 ml of n-octanol were shaken together 72h to allow saturation of both phases. Approximately 1 mg of each complex was mixed in 5 ml of aqueous and organic phase for 10 min respectively. The resultant emulsion was centrifuged to separate the phases and complex concentration on each one was determined by UV absorbance spectroscopy.  $\text{Log}P_{7.4}$  was defined as  $\log([\text{compound}_{(\text{organic})}]/[\text{compound}_{(\text{aqueous})}])$ .

## Study of complex-BSA interaction

A 1 mM stock solution of bovine serum albumin (A2153 Sigma-Aldrich) was prepared in PBS at pH 7.4 (real concentration was confirmed by UV-Vis spectroscopy,  $\epsilon_{280 \text{ nm}} = 43,284 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ). Gold complexes were dissolved on DMSO to achieve a 6 mM stock solution and six aliquots of 2.5  $\mu\text{l}$  were added to a 50 mM solution of BSA in PBS placed in a quartz cuvette of 1 cm optical path, giving rise to the final concentrations of 5, 10, 15, 20, 25 and 30  $\mu\text{M}$ . The fluorescence spectra were recorded on a Jobin-Yvon-Horiba fluorolog FL-3-11 spectrometer. The samples were excited at 295 nm and the emission spectra were recorded in a range from 310 to 450 nm with emission slits set to 1.6 nm. Samples were measured upon 4 min incubation with each gold aliquot. Fluorescence intensities of PBS and gold complexes were irrelevant under described conditions, as were the effect of the addition of gold aliquots and the effect of incubation time between measurements. Data were analyzed by using Stern-Volmer equation:  $F_0/F = 1 + K_{sv}[\text{gold complex}] = 1 + K_{q\tau_0}[\text{gold complex}]$ , in order to obtain Stern-Volmer Quenching constant ( $K_{sv}$ ).

The binding constant ( $K_b$ ) was quantified by using the modified Stern-Volmer equation:  $\log[(F_0-F)/F] = \log K_b + n \log[\text{gold complex}]$

## Preparation of *Rosa canina* extracts

*R. canina* rosehip extracts were provided by members of Applied Chemistry department from Public University of Navarra as described by Jiménez *et al.*<sup>3</sup>

Rosehips were harvested in 2014 from a field called Ca'l retor, located in Mariola Mountain, Alicante, Spain. Rosehip peel and pulp (10 g) were homogenized with ultraturax and then macerated for 24 h in a 250 mL acetone:water (80:20 v/v) solution. After this phase, the sample was lyophilized (Telstar, model Cryodos-50, Spain) to eliminate solvents and all the antioxidants are present in the residue obtained (Total Extract, TE). This extract was then fractionated using a solid phase chromatography to obtain three different antioxidants fractions. First of all, the residue was solved in sulphuric acid (5 ml, 0.5 M), the solution was centrifuged (15000 rpm, 30 min) and passed through a Chromabond C-18 cartridge (Scharlab S.L., Barcelona) previously conditioned (2 ml of

methanol and 5 ml of 5 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Polar substances, such as vitamin C, were extracted with 2 mL of 5 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Phenolic compounds retained in the cartridge, were eluted with methanol (2 ml) and distilled water (5 ml). From this solution, considered as purified rosehip extract, neutral and acidic phenols were extracted and fractioned. In brief, the purified rosehip extract pH was adjusted to 7.0 (using a 2 M NaOH solution) and passed through a preconditioned Chromabod cartridge with 8 mL of methanol followed by 4 mL of distilled-deionized water. The column was washed with 10 ml of distilled-deionized water and neutral phenols (**NP**) were eluted using methanol (12 ml). The effluent portion pH was adjusted to 2.0 (using 2.0 M HCl) and then it was passed through a cartridge preconditioned with methanol (8 ml) and HCl (4 ml, 0.01 M). Subsequently column was washed with HCl (5 ml, 0.01 M) and the retained fraction (acidic phenols, **AP**) was eluted using methanol (12 ml). The three fractions were dried using the lyophilizer and then were frozen at -80°C until dilution on cell culture medium for cell treatment (see below 'Cell treatment' section).

## Cell culture

Four different human cancer cell lines have been used during the previously discussed work. Details regarding their origin are summarized:

- Caco-2 cells: colorectal adenocarcinoma. Kindly provided by Dr. Edith Brot-Laroche (Université Pierre et Marie Curie-Paris 6 UMR S872, Les Cordeliers, France).
- HepG2 : hepatocellular carcinoma. Kindly provided by Dr. María Angeles Alava (Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Zaragoza, Spain).
- MCF-7: breast adenocarcinoma. Kindly provided by Dr. Carlos J. Ciudad and Dr. Verónica Noé (Departamento de Bioquímica y Fisiología, Facultad de Farmacia, Universidad de Barcelona, Spain).
- MDA-MB-231: breast adenocarcinoma. Kindly provided by Dr. Carlos J. Ciudad and Dr. Verónica Noé (Departamento de Bioquímica y Fisiología, Facultad de Farmacia, Universidad de Barcelona, Spain).

Cell lines were maintained in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> at 37°C. Cells (passages 20-40) were grown in Dulbecco's Modified Eagles medium (DMEM) (Gibco Invitrogen, Paisley, UK) supplemented with 20% fetal bovine serum, 1% non-essential amino acids, 1% penicillin (1000 U/ml), 1% streptomycin (1000 µg/ml) and 1% amphotericin (250 U/ml). Culture medium was replaced every two days and cells were passaged enzymatically with 0.25% trypsin-1 mM EDTA and sub-cultured on 25 cm<sup>2</sup> flasks at a density of 2·10<sup>4</sup> cells/cm<sup>2</sup>.

For assays on cancer cell models (undifferentiated Caco-2, HepG2, MCF-7 and MDA-231 cells), treatment was added 24h post-seeding and then incubated the required time for each experiment.

For assays on differentiated Caco-2 cells -a model of the gastrointestinal barrier-, cells were cultured on 96-wells plates under standard culture conditions for 7 to 9 days, until reaching 80% confluence as confirmed by optic microscopy observance. Traditionally, it was considered that differentiation was reached upon two weeks post-seeding; however, Natoli *et al.*<sup>4</sup> found that sub-culturing cells at 50% confluence for maintenance instead at 80% resulted in a high conservation of proliferative capacity, thus reaching differentiation faster. Treatment was added after this differentiation time without further considerations.

## Cell treatment

Gold(I) and silver(I) complexes were initially solved on DMSO to a concentration of 20 mM and then diluted on cell culture medium without fetal bovine serum (FBS) to the required work concentrations. *Rosa canina extracts* were solved on FBS-free medium to a concentration of 1 mg/ml and then diluted on FBS-free medium to the required work concentrations.

For treatment, cell culture medium was replaced with medium containing complexes and/or plant extracts and cells were incubated at 37°C for a variable time depending on the assay. Mock-treated cells or negative control was included on each experiment (cells treated with 3.5 nM DMSO).

When a pre-incubation with a selected compound was needed prior to cell treatment with metallic complexes/plant extract, those compounds were previously solved on the required solvent as summarized below and then diluted on FBS-free medium to work concentrations. Cells were pre-incubated at 37°C and then cell culture medium was replaced with medium containing metallic complexes and/or plant extracts for further incubation at 37°C.

- Necrostatin-1 (N9037, Sigma-Aldrich): 20 mg/ml DMSO
- N-acetyl-cysteine (A9165, Sigma-Aldrich): 33 mg/ml DMSO
- SN-50 (481480, Sigma-Aldrich): already solved
- TNFR1 analog (SRP6389, Sigma-Aldrich): 50 µg/mL PBS (phosphate buffered saline)
- Chloroquine (C6628, Sigma-Aldrich): 10 ml/ml PBS

## Cell proliferation determination

### 1. MTT assay

MTT assay depends on 3-(4,5-dimethyl-2-thiazoyl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) (CT01-5 Sigma-Aldrich). Mitochondrial dehydrogenase from viable cells is able to reduce MTT reactive to formazan, a reaction that can be followed spectrophotometrically due to the color change from yellow to blue<sup>5</sup>. MTT reactive was solved on DMSO to a concentration of 5 mg/ml.

Cells were plated in 96-well plates at a density of 4000 cells per well, incubated 24h under standard cell culture conditions (for assays with cancer models) and then treated and incubated the required time for each determination. After such incubation with treatment, 10  $\mu$ l of 5 mg/ml MTT solution were added to each well and cells were then incubated for 3 h at 37°C. Medium was replaced by inversion and 100  $\mu$ l DMSO were added to each well to solve formazan crystals. Plates were shaken 5 min and absorbance was measured at 560 nm with DTX 800 (Beckman Coulter) (chapter 1) or SPECTROstar Nano (BMG Labtech) (chapters 2-4). Absorbance was proportional to number of living cells and converted to percentage of cell viability comparing to data obtained from negative control.

### 2. SRB assay

The sulforhodamine B (SRB) assay is considered as an indirect method to determine cell viability, and it is recommended for those situations when MTT assay should be avoided<sup>6,7</sup>. This method is based on the capacity of SRB to bind cell proteins, thus the amount of dye might be correlated to cell mass<sup>8</sup>.

Cells were plated in 96-well plates at a density of 4000 cells per well, incubated 24h under standard cell culture conditions (for assays with cancer models) and then treated and incubated the required time for each determination. After such incubation with treatment, cells were fixed with 500 g/l trichloroacetic acid for 1h at 4°C, washed with PBS and stained with 4g/l of SRB for 20 min at room temperature covered from light. Plates were washed three times with 10 ml/l of acetic acid to remove unbounded dye and protein-bound dye was extracted with 10 mmol/l Tris base. Absorbance was measured at 540/620 nm with SPECTROstar Nano (BMG Labtech) and considered equivalent to cell viability. Results were expressed as percentage of cell viability comparing to data obtained from negative control.

## IC<sub>50</sub> and Selectivity Index calculation

For IC<sub>50</sub> calculation, a stock solution of gold(I) and silver(I) complexes in DMSO was added to cells in a concentration range of:

- 1.25-20  $\mu\text{M}$  for complexes **1a**, **1b**, **2a**, **3a-d**, **4a-d**, **10-11a**, **7-9b** and **11b** on cancer cell models.
- 5-80  $\mu\text{M}$  for complexes **5a-d** and **6a-d** on undifferentiated Caco-2 cells.
- 0.31-5  $\mu\text{M}$  for complexes **7a**, **8a**, **9a**, **10b** on undifferentiated Caco-2 cells, **11b** on MCF-7 cells and **7b** on MDA-231 cells.
- 20, 40, 60, 80, 100  $\mu\text{M}$  for free ligands on cancer cell models except **L1** and **L2** on MCF-7 and MDA-231 cells (1.25-20  $\mu\text{M}$ ).

Upon 72h incubation with complexes, cell viability was determined with the assays previously described and absorbance was converted into percentage of growth inhibition. To determine  $\text{IC}_{50}$  value, percentage of cell viability *versus* complex concentration was plotted, then concentration required to reach 50% of cell viability was extrapolated.

Selectivity Index was calculated as previously described by Badisa *et al.*<sup>9</sup>

$$\text{SI} = \frac{\text{IC}_{50} \text{ non-cancer tissue}}{\text{IC}_{50} \text{ cancerous tissue}}$$

## Quantification of apoptotic and necrotic populations

Caco-2 cells were plated on 25  $\text{cm}^2$  flasks at a density of 300,000 cell per flask, incubated 24h under standard cell culture condition and then exposed to treatment the required time (24 or 48h). For annexin V-FITC and propidium iodide double staining, cells were collected by trypsinization and transferred to flow cytometry tubes, then washed twice with PBS, resuspended in 100  $\mu\text{l}$  of annexin V binding buffer (10 mM HEPES/NaOH pH 7.4, 140 mM NaCl, 2.5 mM  $\text{CaCl}_2$ ) and 5  $\mu\text{l}$  of annexin V-FITC and 5  $\mu\text{l}$  of propidium iodide were added to each sample. After 15 min incubation at room temperature protected from light, 400  $\mu\text{l}$  of 1X annexin binding buffer were added and fluorescence intensity was measured with FACSARIA BD for 1h. Signal intensity was further analyzed with FASCDIVA BD.

## Analysis of executioner caspases activation with fluorescence microscopy

Caco-2 cells were plated in 96-well plates at a density of 4000 cells per well, then incubated 24h under standard cell culture conditions and exposed to  $\text{IC}_{50}$  value of  $[\text{Au}(\text{C}\equiv\text{C}-2\text{-NC}_5\text{H}_4)(\text{PTA})]$  (**2a**) for 24h. Cell culture medium was removed and replaced with *CellEvent<sup>TM</sup> Caspase-3/7 detection reagent* (C10423, ThermoFisher), previously diluted in PBS (90  $\mu\text{l}/\text{ml}$ ). After 10 min incubation, fluorescence was observed by using confocal microscopy in a Nikon Eclipse Ti<sup>®</sup> inverted fluorescence microscope, coupled with a confocal module. Excitation and emission settings were 488 and 590/50 nm respectively. Fluorescence intensity was analyzed with Fiji software.

## Determination of BAX, Bcl-2, activated caspase 3 and activated caspase 9 protein levels by flow cytometry

Caco-2 cells were plated on 25 cm<sup>2</sup> flasks at a density of 300,000 cell per flask, incubated 24h under standard cell culture condition and then exposed to IC<sub>50</sub> value of [Au(C≡CPh)(PTA)] (**1a**) for 24h. After treatment, cells were collected by trypsinization and then fixed in 0.01 % formaldehyde for 15 min and centrifuged 5 min at 300 g. For cell membrane disruption, pellet was suspended in 100 µl of 0.5% v/v in PBS digitonin solution and incubated 15 min at room temperature covered from light. After incubation, cells were washed with 2 ml PBS containing 0.1% digitonin and centrifuged 300 g 5 min. 2 µl of the corresponding antibody (listed below) were added to each sample and the resultant mixture was incubated 1h at room temperature. Finally, cells were centrifuged 5 min at 500 g, washed twice with PBS and resuspended in 400 µl of PBS. Fluorescence was analyzed with FACSARRAY BD equipped with an argon ion laser.

- Anti-BAX antibody [T22-A] (ab139543, Abcam).  $\lambda(\text{Ex}) = 493 \text{ nm}$ ;  $\lambda(\text{Em}) = 528 \text{ nm}$ .
- Anti-Bcl-2 antibody [Bcl-2/100] (272337, Abcam).  $\lambda(\text{Ex}) = 645 \text{ nm}$ ;  $\lambda(\text{Em}) = 660 \text{ nm}$ .
- *Caspase 9 (active) Red Staining Kit* (ab65619, Abcam).  $\lambda(\text{Ex}) = 394\text{-}400 \text{ nm}$ ;  $\lambda(\text{Em}) = 495\text{-}505 \text{ nm}$ .
- Anti-active caspase 3 antibody, clone 92-605 (559565, Biosciences).  $\lambda(\text{Ex}) = 494 \text{ nm}$ ;  $\lambda(\text{Em}) = 520 \text{ nm}$ .

## Measurement of caspase 3 and 8 activation by colorimetric assays

Caco-2 cells were grown at 25 cm<sup>2</sup> flasks at a density of 300.000 cells per flask and incubated overnight under standard culture conditions. Cells were then exposed to IC<sub>50</sub> of [Au(L1)(PPh<sub>3</sub>)](TfO) (**7a**) and [Ag(TfO)(L1)(PPh<sub>3</sub>)] (**8a**) for 24h, then collected by trypsinization for caspase 3 and 8 activity determination.

- *Caspase 8 Assay Kit* (ab39700, Abcam) was used for colorimetric determination of caspase 8 activation. Treated Caco-2 cells were manipulated according to manufacturer's instructions and absorbance was measured at 400 nm with SPECTROstar Nano (BMG Labtech). Protein concentration was determined by Bradford method.
- For caspase 3 activation measurement, *Caspase 3 Assay Kit, Colorimetric* (CASP-3-C Sigma Aldrich) was used. Treated Caco-2 cells were manipulated according to manufacturer's instructions and absorbance was measured at 405 nm with SPECTROstar Nano (BMG Labtech). Protein concentration was determined by Bradford method as previously described.

## Flow cytometry mitochondrial membrane potential assay

Caco-2 cells were plated on 25 cm<sup>2</sup> flasks at a density of 300,000 cell per flask, incubated 24h under standard cell culture condition and then exposed to treatment the required time (24 or 48h). After treatment, cells were collected by trypsinization, washed twice with PBS and resuspended in PBS at a concentration of 1·10<sup>6</sup> cells/ml. 5 µl of 10 µM cationic dye 1,1',3,3,3'-hexamethylindodicarbo-cyanine iodide were added to each sample and incubated 15 min at 37°C. Then, 400 µl of PBS were added to each tube and Fluorescence was analyzed by flow cytometry using a FACSARRAY BD equipped with an argon ion laser. Excitation and emission settings were 633 and 658 nm respectively.

### Quantification of cytochrome c release

This assay is based on the method proposed by Christensen *et al.*<sup>10</sup> and consists on a two-step permeabilization with digitonin and saponin. Digitonin is able to lyse cell membrane but maintains mitochondrial integrity, thus cytoplasmatic cytochrome c that has been released from damaged mitochondria is lost. Then, saponin is used to permeabilize the remaining mitochondria and the total amount of not-released cytochrome c can be determined.

Caco-2 cells were plated on 25 cm<sup>2</sup> flasks at a density of 300,000 cell per flask, incubated 24h under standard cell culture condition and then exposed to IC<sub>50</sub> of [Au(C≡CPh)(PTA)] (**1a**) for 24h. After treatment, cells were collected by trypsinization and resuspended in 100 µl of ice-cold permeabilization buffer I (100 mM KCl, 50 µg/ml digitonin in PBS). After 5 min incubation, 100 µl of 4% paraformaldehyde in PBS were added to each sample, then centrifuged 5 min at 500 g at 4°C. Supernatant was removed and pellet was resuspended in 4% paraformaldehyde. Upon 20 min incubation at room temperature, samples were washed three times with PBS and resuspended in 200 µl of permeabilization buffer II (0.05% saponin, 3% BSA in PBS). Samples were incubated 15 min at room temperature and 2 µl of anti-cytochrome c antibody (7H8.2C12) (NB100, Novus Biologicals) were added. After 1h incubation at room temperature, cells were centrifuged at 500 g for 5 min, washed twice with PBS and resuspended in 400 µl of PBS. Fluorescence was analyzed with flow cytometry using a FACSARRAY BD equipped with an argon ion laser. Excitation and emission settings were 488 and 575 nm respectively.

### Progression on cell cycle phases analysis

Caco-2 cells were plated on 25 cm<sup>2</sup> flasks at a density of 300,000 cell per flask, incubated 24h under standard cell culture condition and then exposed to treatment the required time (24 or 48h). Cells were then collected by trypsinization and fixed in 70% ice-cold ethanol, stored at 4°C 24h and centrifuged for 5 min at 2500 rpm. Cells were then rehydrated in PBS and stained with 50 µg/ml of propidium iodide solution containing 100 µg/ml of RNase A. Stained cells were analyzed for DNA content in FACSARRAY BD equipped with an argon ion laser. Red fluorescence emitted by propidium iodide was collected using a 620 nm long pass filter as a measure of the

amount of DNA bounded to the dye and cell cycle distribution was displayed on a linear scale. Percentages of cells on each cell cycle phase were calculated with MODIFIT 3.0 verity software.

### ***In vitro* DNA binding assay**

Complexes [Au(C≡CPh)(PTA)] (**1a**) and [Au(C≡C-2-NC<sub>5</sub>H<sub>4</sub>)(PTA)] (**2a**) were incubated at 37°C with 3 nM pIRES2-EGFP (5308 pb) plasmid (Catalog #6029-1). Mobility of plasmid upon treatment was then analyzed by electrophoresis on a 1% (w/v) agarose gel at 90 V/cm at 25°C in Tris-acetate/EDTA buffer for 30 min. Gel was stained in 0.5 g/ml (w/v) ethidium bromide and bands were visualized with UVP gel scanner.

### **DNA isolation**

Caco-2 cells were plated on 75 cm<sup>2</sup> flasks at a density of 500,000 cells per flask, incubated 24h under standard cell culture conditions and then exposed to IC<sub>50</sub> value of [Au(C≡CPh)(PTA)] (**1a**) or [Au(C≡C-2-NC<sub>5</sub>H<sub>4</sub>)(PTA)] (**2a**) for 24h. Cells were then collected by tripsinization and centrifuged at 3500 rpm for 5 min. Pellet was washed twice with 1 ml of PBS and cells were lysated with 1 ml of the lysis buffer (5 M NaCl, 1 M Tris-HCl pH 8, 0.5 M EDTA pH 8, 10% SDS, miliQ water, 20 µl proteinase K). The resultant preparation was incubated 19 h at 50-60°C. Upon incubation, 250 µl of 5 M NaCl were added to each sample and mixture was centrifuged at 13,000 rpm for 5 min. Supernatant was isolated and 2 ml of 100% ethanol were added, then samples were centrifuged at 10,000 rpm for 10 min. Pellet was washed with 1.5 ml of 70% ethanol and centrifuged at 10,000 rpm for 10 min. Finally, pellet was resuspended in 50 µl of Tris-EDTA pH 8 and heated to 40°C for 5 min.

Isolated DNA was analyzed by SDS-PAGE using 2% (w/v) agarose gel containing 10 µg/ml of ethidium bromide (85 V, 45 min).

### **Measurement of recombinant TrxR1 activity**

This assay is based on the capacity of reduced TrxR to react with 5,5-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB), a colorimetric reaction that can be followed spectrophotometrically due to the increase in yellow color intensity with time<sup>11</sup>.

Recombinant human TrxR1 (SRP6081, Sigma Aldrich) was incubated in a 96-wells plate with different concentrations of [Au(C≡CPh)(PTA)] (**1a**) or [Au(C≡C-2-NC<sub>5</sub>H<sub>4</sub>)(PTA)] (**2a**) previously dissolved on 25 µl of PBS pH 7.4 to achieve the desired concentration. Cell-free solution was shaken for 15 min at room temperature and then incubated 30 min at 37°C. Then, 25 µl of reaction buffer (500 µl PBS pH 7.4, 80 µl 100 mM EDTA pH 7.5, 20 µl 0.05% BSA, 100 µl 20 mM NADPH, 300 µl distilled water) were added to each well. Finally, reaction was started by adding 25 µl of 20 mM DTNB dissolved in 100% ethanol.

Absorbance at 405 nm was recorded each 10 s for 6 min using DTX 800 (Beckman Coulter).

In order to convert absorbance data in percentage of TrxR activity, the following calculations were performed:

$$\text{TrxR1 activity} = \frac{\Delta\text{Abs}}{\epsilon \cdot t \cdot ([\text{Prot}] \cdot 1000)}$$

where  $\Delta\text{Abs} = \text{Abs}_{\text{Last cycle}} - \text{Abs}_{\text{SO}}$ ,  $\epsilon_{\text{DTNB}} = 14,150 \text{ M} \cdot \text{cm}^{-1}$  and  $[\text{Prot}]$  was determined with Bradford method. TrxR1 activity value obtained from complex-free samples (negative control) was considered as 100% of activity, and the rest of conditions were expressed in consequence.

For protein concentration determination using Bradford method, a standard curve with known concentrations of BSA (50-1200  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) was plotted. Then, 2  $\mu\text{l}$  of sample were mixed with 100  $\mu\text{l}$  of 1/5 diluted Bradford reagent (#5000006, Bio-Rad). Samples were shaken and incubated for 10 min at room temperature, then absorbance at 595 nm was measured with DTX 800 (Beckman Coulter) (chapter 1) or SPECTROstar Nano (BMG Labtech) (chapters 2-4). Protein concentration of each sample was determined by extrapolation on standard curve.

## Determination of cellular TrxR activity

The previously described DTNB assay can be performed also on lysated cells after drug treatment. However, an important modification must be performed prior to analysis. Given the presence of other cellular NADPH oxidoreductases able to reduce DTNB<sup>11</sup>, a specific TrxR inhibitor must be added to some of the samples to determine which amount of DTNB reduction is a consequence of non-inhibited TrxR from treated cells.

Caco-2 cells were grown in 96-wells plates at a density of 4000 cells per well, and after overnight incubation under standard culture conditions, were exposed to treatment for the required incubation time. Then, cell culture medium was removed and replaced with 25  $\mu\text{l}$  of lysis buffer (5 M NaCl, 1 M Tris-HCl pH 8, 0.5 M EDTA pH 8, 10% SDS, miliQ water, EDTA-free protease inhibitor cocktail). Samples were shaken for 15 min at room temperature and 25  $\mu\text{l}$  of 0.625  $\mu\text{M}$  auranofin (diluted on PBS) (inhibitor samples) or 25  $\mu\text{l}$  of PBS (inhibitor-free samples) were added. Samples were shaken for 5 min at room temperature and incubated for 15 min at 37°C. 25  $\mu\text{l}$  of the reaction mix (500  $\mu\text{l}$  PBS pH 7.4, 80  $\mu\text{l}$  100 mM EDTA pH 7.5, 20  $\mu\text{l}$  0.05% BSA, 100  $\mu\text{l}$  20 mM NADPH, 300  $\mu\text{l}$  distilled water) were added to each sample and reaction was then started by adding 25  $\mu\text{l}$  of 20 mM DTNB dissolved in 100% ethanol. Absorbance at 405 nm was recorded each 10 s for 6 min using DTX 800 (Beckman Coulter).

In order to convert absorbance data in percentage of TrxR activity, the following calculations were performed:

$$\text{TrxR activity} = \frac{\Delta\text{Abs}}{\varepsilon \cdot t \cdot ([\text{Prot}] \cdot 1000)}$$

where  $\Delta\text{Abs} = (\text{Abs}_{\text{Last cycle inhibitor-free}} - \text{Abs}_{\text{Last cycle inhibitor}}) - (\text{Abs}_{\text{SO inhibitor-free}} - \text{Abs}_{\text{SO inhibitor}})$ ,  $\varepsilon_{\text{DTNB}} = 14,150 \text{ M} \cdot \text{cm}^{-1}$  and  $[\text{Prot}]$  was determined with Bradford method. TrxR activity value obtained from complex-free samples (negative control) was considered as 100% of activity, and the rest of conditions were expressed in consequence.

### **TXNRD1 mRNA quantification**

Prior to mRNA quantification, total RNA of Caco-2 cells grown in 75 cm<sup>2</sup> flasks at a density of 500,000 cells per flask and incubated 24h with IC<sub>50</sub> value of [Au(C≡CPh)(PTA)] (**1a**) was isolated. Upon treatment, cell culture medium was removed and replaced with 650 µl of TRI Reagent® (9424, Sigma Aldrich). Cells were harvested with a scraped and mixed with 130 µl of chloroform. After 10 min incubation at room temperature, mix was centrifuged at 13000 rpm 10 min. Upper phase was collected and incubated 10 min at room temperature with 430 µl of isopropanol. Mix was then centrifuged at 13000 rpm for 15 min and pellet was washed with 75% ethanol and centrifuged again at 13000 rpm for 5 min. Resultant pellet was dried at room temperature and hydrated with 25 µl of free-nuclease water for 2-3 h.

5 µg of isolated RNA were cleaned up with *Turbo DNA-free kit* (AM1907, Ambion) and RNA integrity was further analyzed with electrophoresis on a 1% (w/v) agarose gel at 90 V/cm at 25°C in Tris-acetate/EDTA buffer for 30 min. Presence of protein and/or DNA contamination in the samples were checked with Nanodrop™ 1000 (Thermoscientific). Cleaned RNA was retrotranscribed using *ThermoScientific First Strand cDNA synthesis kit* (R1362, ThermoScientific) and 50 µM Oligod(T)<sub>20</sub> primers. *TXNRD1* mRNA was quantified by qRT-PCR using FastStart Universal SYBR Green Master (Rox) (FSUSGMMRO, Roche) and CXR.

Primers used for qRT-PCR were 5'AAGGAACGCTCTCGGAATTG3' and 5'GATAAGCCTTCAAGTTGGACC3'. Gene expression modification was quantified by 2- $\Delta\text{Ct}$ , using cyclophilin B as housekeeping gene.

### **Determination of TrxR protein levels by flow cytometry**

Caco-2 cells were plated on 25 cm<sup>2</sup> flasks at a density of 300,000 cell per flask, incubated 24h under standard cell culture condition and then exposed to IC<sub>50</sub> value of [Au(C≡CPh)(PTA)] (**1a**) for 24h. After treatment, cells were collected by trypsinization and then fixed in 0.01 % formaldehyde for 15 min and centrifuged 5 min at 300 g. For cell membrane disruption, pellet was suspended in 100 µl of 0.5% v/v in PBS digitonin

solution and incubated 15 min at room temperature covered from light. After incubation, cells were washed with 2 ml PBS containing 0.1% digitonin and centrifuged 300 g 5 min. 2 µl of - Recombinant Anti-TXNRD1 antibody [EPNCIR129] (Alexa Fluor® 647) (ab203261, Abcam).  $\lambda(\text{Ex}) = 652 \text{ nm}$ ;  $\lambda(\text{Em}) = 668 \text{ nm}$ . were added to each sample and the resultant mixture was incubated 1h at room temperature. Finally, cells were centrifuged 5 min at 500 g, washed twice with PBS and resuspended in 400 µl of PBS. Fluorescence was analyzed with FACSARRAY BD equipped with an argon ion laser.

## Measurement of cellular GR activity

Glutathione reductase activity can be followed spectrophotometrically due to the loss of absorbance at 340 nm, consequence of NADPH oxidation<sup>12</sup>.

Caco-2 cells were grown in 96-wells plates at a density of 4000 cells per well, and after overnight incubation under standard culture conditions, were exposed to treatment for the required incubation time. Then, cell culture medium was removed and replaced with modified RIPA buffer (50 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, 1% SDS, 1% DOC, 1 mM NaF, miliQ water, EDTA-free protease inhibitor cocktail). Samples were shaken 20 min and 25 µl PBS were added to each well. Then, reaction mix (0.1 M Tris-HCl pH 8, 0.02 mM NADPH, miliQ water) was added to each sample and reaction was then started by adding 0.52 mM GSSG. Absorbance at 340 nm was recorded for 6 min DTX 800 (Beckman Coulter) (chapter 1) or SPECTROstar Nano (BMG Labtech) (chapters 3 and 4).

In order to convert absorbance data in percentage of GR activity, the following calculations were performed:

$$\text{GR activity} = \frac{|\Delta\text{Abs}|}{\epsilon \cdot t \cdot [\text{Prot}]}$$

where  $|\Delta\text{Abs}| = \text{Abs}_{\text{Last cycle}} - \text{Abs}_{\text{S}_0}$ ,  $\epsilon_{\text{GSSG}} = 373 \text{ M} \cdot \text{cm}^{-1}$  and  $[\text{Prot}]$  was determined with Bradford method. GR activity value obtained from complex-free samples (negative control) was considered as 100% of activity, and the rest of conditions were expressed in consequence.

## Measurement of intracellular ROS levels

2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H<sub>2</sub>DCF-DA) is a cell-permeable probe that becomes fluorescent when oxidized (DCF), thus fluorescence signal is considered as a direct measurement of intracellular ROS levels<sup>13</sup>. A stock solution of 3981 µM was prepared on methanol, then diluted on PBS to the required work concentration.

Caco-2 cells were grown in 96-wells plates at a density of 4000 cells per well, and after overnight incubation under standard culture conditions, were exposed to treatment for the required incubation time. Then, cells were washed twice with PBS and

incubated 20 min with 100  $\mu$ l of 20 mM H<sub>2</sub>DCF-DA (410217, Sigma Aldrich) at 37°C covered from light. Cells were washed three times with PBS and 100  $\mu$ l of PBS were added to each well. Fluorescence was then analyzed with DTX 800 (Beckman Counter) (chapter 1) or FLUOstar Omega (BMG Labtech) (chapters 2-4). Excitation and emission settings were 485 and 535 nm respectively.

### Analysis of intracellular ROS levels by fluorescence microscopy

Caco-2 cells were plated in 96-well plates at a density of 4000 cells per well, then incubated 24h under standard cell culture conditions and exposed to IC<sub>50</sub> of [Au(C $\equiv$ C-2-NC<sub>5</sub>H<sub>4</sub>)(PTA)] (**2a**) for 80 min. Then, *CellROX<sup>®</sup> Deep Red Reagent* (C10422, ThermoFisher) was added to each well to a final concentration of 5  $\mu$ M. Cells were incubated 30 min at 37°C and fluorescence was analyzed using confocal microscopy in a Nikon Eclipse Ti<sup>®</sup> inverted fluorescence microscope, coupled with a confocal module. Excitation and emission settings were 644 and 665 nm respectively. Fluorescence intensity was analyzed with Fiji software.

### Determination of RIP-1 protein levels

Caco-2 cells were plated on 75 cm<sup>2</sup> flasks at a density of 500,000 cell per flask, incubated 24h under standard cell culture conditions and then exposed to IC<sub>50</sub> value of [Au(C $\equiv$ C-2-NC<sub>5</sub>H<sub>4</sub>)(PTA)] (**2a**) or **2a**+acidic polyphenols extract from *R. canina* (**DC**) for 24h. Cells were then collected by trypsinization and 100  $\mu$ l of fixation solution INTRACELL (Intra 100-T, Immunostep) were added to each 50  $\mu$ l of cells. The resultant mixture was then incubated for 5 min at room temperature and washed with PBS. Cells were resuspended on 50  $\mu$ l of PBS and 100  $\mu$ l of permeabilisation solution INTRACELL (Intra 100-T, Immunostep) along with 3  $\mu$ l anti-RIP-1 antibody (ab72139, Abcam) were added to each sample. After 1 h incubation at 4°C, cells were washed with 1 ml PBS and 50  $\mu$ l of permeabilisation solution INTRACELL (Intra 100-T, Immunostep) were added. Finally, secondary antibody goat anti-mouse ALEXA 488 was added and samples were incubated for 30 min at 4°C. Cells were washed and resuspended on 200  $\mu$ l of PBS and fluorescence was analyzed using FACSARRAY BD equipped with an argon ion laser.

### Measurement of autophagosomes formation

Caco-2 cells were seeded in 96-well plates at a density of 4·10<sup>3</sup> cells/well, grown 24h under standard cell culture conditions and then incubated with treatment for the required time. For autophagosomes formation, *Autophagy Assay Kit* (MAK138, Sigma Aldrich) was used according to manufacturer's instruction. Fluorescence intensity ( $\lambda_{\text{ex}}=360/\lambda_{\text{em}}=520$  nm) was measured with FLUOstar Omega (BMG Labtech). Fluorescence intensity was normalized with cell viability for assays at 24h incubation. The obtained values of fluorescence intensity are considered as a reflection of total autophagosomes formation.

## Determination of lysosomal alkalization

Caco-2 cells were plated on 25 cm<sup>2</sup> flasks at a density of 300,000 cell per flask, incubated 24h under standard cell culture conditions and then exposed to the corresponding treatment (Drug Combination (DC): [Au(C≡C-2-NC<sub>5</sub>H<sub>4</sub>)(PTA)] (**2a**) and acidic polyphenols from *Rosa canina*) for 24 or 48h. Cells were then collected by trypsinization and changes in lysosomal acid content were measured with *LysoTracker Green DND-26* (L7526, Molecular Probes). The dye was first diluted on DMEM to a concentration of 75 nM. Then, 1 mL of diluted *LysoTracker* was added to each 50 µL of cell sample. Cells were incubated 2h at room temperature covered from light and then were centrifuged 5 min at 1200 rpm. Pellet was resuspended on 200 µL of PBS and the fluorescence signal ( $\lambda_{\text{ex}}=504/\lambda_{\text{em}}=511$  nm) was analyzed by FACSARIA BD equipped with an argon ion laser.

## Measurement of COX-1/2 activity

Caco-2 cells were plated on 25 cm<sup>2</sup> flasks at a density of 300,000 cell per flask, incubated 24h under standard cell culture conditions and then exposed to IC<sub>50</sub> values of [Au(L2b)PPh<sub>3</sub>] (**3b**) or [Au(L2c)PTA] (**4c**) for 2 or 24h. Cell medium was collected and cells were scraped and lysed. COX-1/2 enzymatic activity of cell lysates was analyzed with *Cyclooxygenase (COX) Activity Assay Kit* (ab204699, Abcam) according to manufacturer's instructions. Fluorescence was measured with FLUOstar Omega Microplate Reader (BMG Labtech).

## Analysis of 20S proteasome activity

Caco-2 cells were grown at 25 cm<sup>2</sup> flasks at a density of 300.000 cells per flask and incubated overnight under standard culture conditions. Cells were exposed to IC<sub>50</sub> values of [Au(L1)(PPh<sub>3</sub>)](TfO) (**7a**) and [Ag(TfO)(L1)(PPh<sub>3</sub>)] (**8a**) for 24h, then collected by trypsinization, lysed with saponine (5 mg/ml in PBS) and centrifuged at 13000 rpm for 15 min at 4°C. Supernatant was further analyzed with Proteasome 20S Activity Assay Kit (MAK172, Sigma Aldrich) according manufacturer's instructions. Fluorescence was measured with FLUOstar Omega (BMG Labtech). Protein concentration was determined with Bradford method as previously described.

## Caco-2 spheroids generation

Caco-2 cells (3·10<sup>3</sup> cells per plate) were mixed with a high viscosity methylcellulose solution previously described by Ayuso *et al.*<sup>14</sup>. 100 µl of the resultant solution were seeded on a round-bottom 96-well plate. Spheroids were grown for 72h and incubated with rising concentrations of [Au(C≡C-2-NC<sub>5</sub>H<sub>4</sub>)(PTA)] (**2a**) (3, 4 and 5 µM) for 24h.

For cell viability measurement, spheroids were stained with Hoechst 33342 (4 mg/ml) and propidium iodide (4 mg/ml) for 30 min. Then, fluorescence was analyzed using

confocal microscopy in a Nikon Eclipse Ti® inverted fluorescence microscope, coupled with a confocal module and fluorescence intensity was analyzed with Fiji software.

### Disk diffusion test

A disk diffusion assay was used to determine the diameter of the inhibition zone of complexes **5a-d** and **6b-d** on selected bacteria strains (*E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. enterica*, *E. faecalis*, *L. monocytogenes*, *S. epidermidis*, *S. aureus*; see Table 17 on Chapter 3 for further details) and was performed following the method by Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI)<sup>15</sup>. Each disk (Oxoid, England) (6 mm in diameter) was impregnated with 10 µL of each gold complex or control (DMSO for negative control, phenol for positive control). Active cultures (0.5 McFarland) from all strains previously showed on Table 17 (see Chapter 3) were spread with a cotton swab onto Mueller-Hinton Agar (MHA, Oxoid, England). Plates were allowed to dry for 3 to 5 minutes. Flame sterilized tweezers were used to place the disks onto inoculated MHA plates, one disk in each of the eight equal parts. The plates were allowed to stand for 15 minutes and then they were inverted and incubated for 22 h ± 2 h at 37 °C ± 1 °C. Upon incubation, diameter of inhibition zone was measured.

### Statistical analysis

All assays were performed at least three times, and the obtained data were subjected to one-tailed Student's test. Differences were considered significant at  $p < 0.05$ .

## References

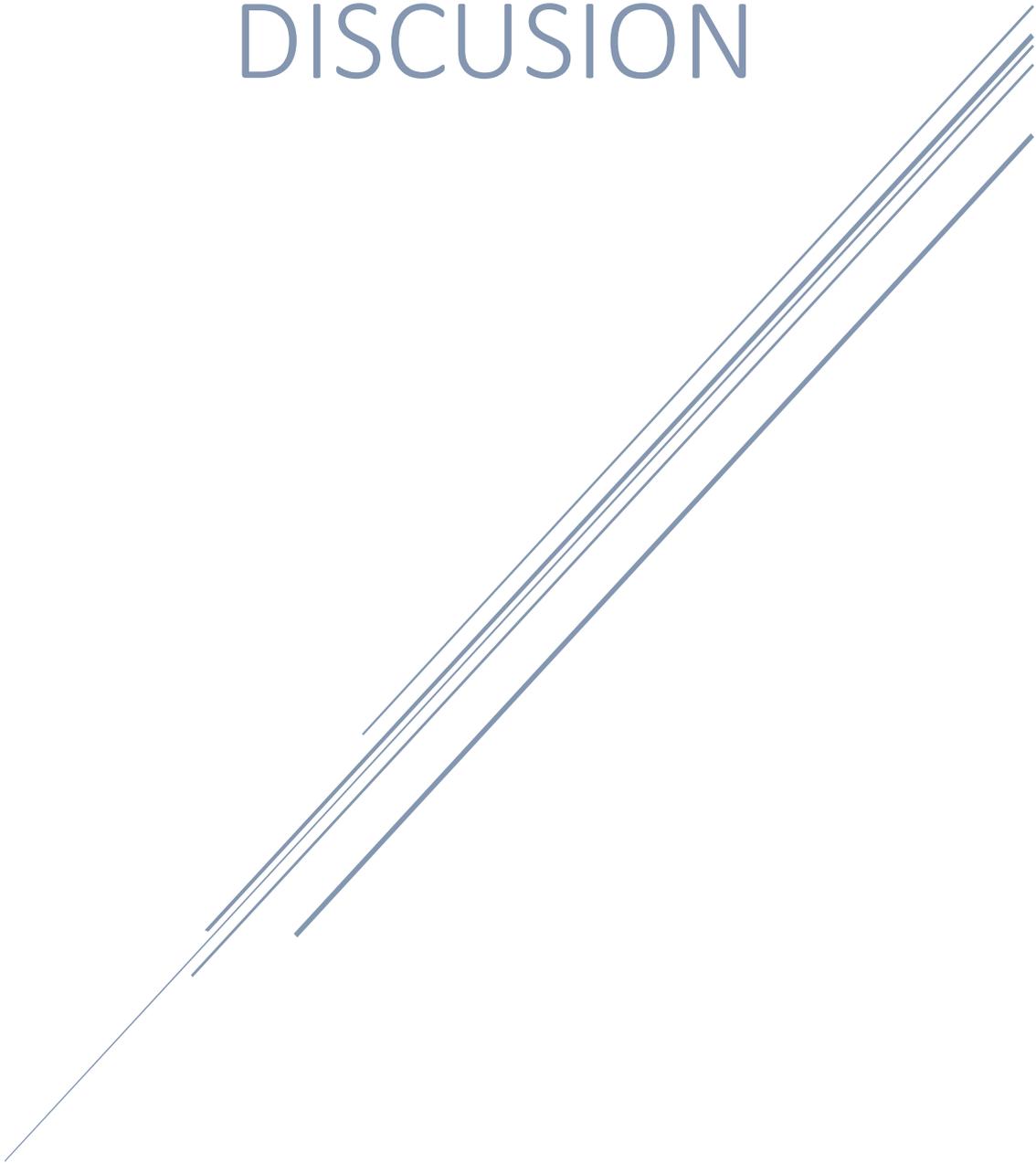
---

1. Vergara, E. *et al.* Antiproliferative activity of gold(I) alkyne complexes containing water-soluble phosphane ligands. *Organometallics* **29**, 2596–2603 (2010).
2. Mármol, I. *et al.* Alkynyl Gold(I) complexes derived from 3-hydroxyflavones as multi-targeted drugs against colon cancer. *Eur. J. Med. Chem.* **183**, (2019).
3. Jiménez, S. *et al.* Rosa canina extracts have antiproliferative and antioxidant effects on caco-2 human colon cancer. *PLoS One* **11**, e0159136 (2016).
4. Natoli, M., Leoni, B. D., D’Agnano, I. & Felsani, A. Good Caco-2 cell culture practices. *Toxicol. Vitr.* **26**, 1243–1246 (2012).
5. van Merloo, J., Kaspers, G. J. L. & Cloos, J. Cell sensitivity assays: the MTT assay. in *Cancer cell culture: methods and protocols* (ed. Cree, I. A.) vol. 731 237–245 (Springer Science, 2004).
6. Wang, P., Henning, S. M. & Heber, D. Limitations of MTT and MTS-based assays for measurement of antiproliferative activity of green tea polyphenols. *PLoS One* **5**, (2010).
7. Bruggisser, R., von Daeniken, K., Jundt, G., Schaffner, W. & Tullberg-Reinert, H. Interference of Plant Extracts, Phytoestrogens and Antioxidants with the MTT Tetrazolium Assay. *Planta Med.* **68**, 445–448 (1992).
8. Orellana, E. & Kasinski, A. Sulforhodamine B (SRB) Assay in Cell Culture to Investigate Cell Proliferation. *Bio Protoc* **6**, e1984 (2016).
9. Badisa, R. B., Mina, D. A., Latinw0, L. M. & Soliman, F. A. Selective Anticancer Activity of Neurotoxin 1-Methyl-4-Phenylpyridinium on Non-Small Cell Lung Adenocarcinoma A549 Cells. *Anticancer Res* **34**, 5447–52 (2014).
10. Christensen, M. E., Jansen, E. S., Sanchez, W. & Waterhouse, N. J. Flow cytometry based assays for the measurement of apoptosis-associated mitochondrial membrane depolarisation and cytochrome c release. *Methods* **61**, 138–145 (2013).
11. Cunniff, B., Snider, G. W., Fredette, N., Hondal, R. J. & Heintz, N. H. A direct and continuous assay for the determination of thioredoxin reductase activity in cell lysates. *Anal. Biochem.* **443**, 34–40 (2013).
12. Mannervik, B. Measurement of Glutathione Reductase Activity. *Curr Protoc Toxicol* **7**, 7.2.1-7.2.4 (1999).
13. Wang, X. & Roper, M. G. Measurement of DCF fluorescence as a measure of reactive oxygen species in murine islets of Langerhans. *Anal. Methods* **6**, 3019–3024 (2014).
14. Ayuso, J. M. *et al.* Study of the chemotactic response of multicellular spheroids in

a microfluidic device. *PLoS One* **10**, e0139515 (2015).

15. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard*. (2012).

# RESULTADOS Y DISCUSIÓN



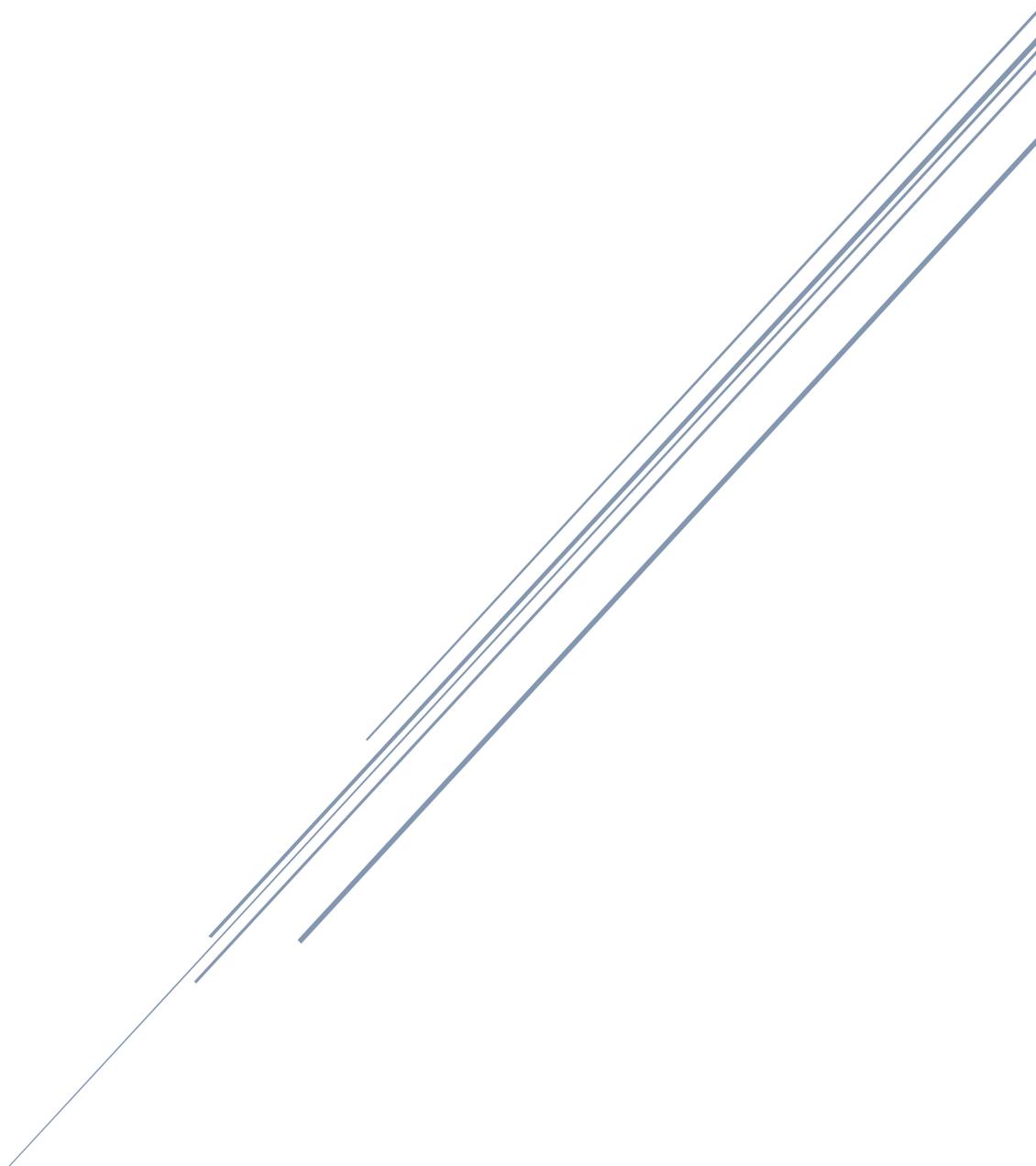


# CAPITULO 1

## ALQUINIL DERIVADOS DE ORO(I) CON FOSFINAS HIDROSOLUBLES

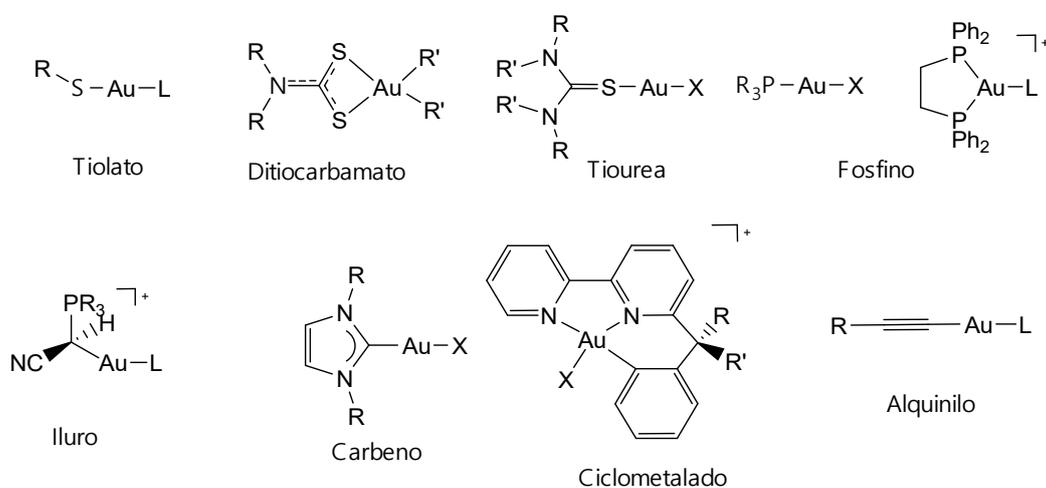
- *J Inorg Biochem.* **2017**; 166:108-121

- *J Inorg Biochem.* **2017**; 176:123-133





Una de las características más buscadas en los nuevos complejos de oro(I) diseñados tras descubrirse las propiedades antitumorales del auranofin es que sean altamente estables en el medio fisiológico. La razón principal es evitar la conversión del oro(I) a oro metálico, lo que conduciría a una pérdida de la actividad antitumoral y a una acumulación en exceso de oro metálico en el organismo. Para diseñar complejos estables, debe evitarse que los ligandos unidos al centro metálico se disocien en el medio biológico, es decir, antes de llegar a interactuar con las posibles dianas moleculares. Para ello, son necesarios ligandos capaces de establecer enlaces lo suficientemente fuertes con el metal. En la bibliografía científica se puede encontrar un gran número de ejemplos de complejos activos frente a diferentes modelos tumorales coordinados con diversos ligandos: tiolatos<sup>1,2</sup>, ditiocarbamatos<sup>3,4</sup>, tioureas<sup>5</sup>, fosfinas<sup>6</sup>, fosfoles<sup>7</sup>, carbenos N-heterocíclicos<sup>8,9</sup>, iluros<sup>10</sup>, alquinilos y ligandos ciclometalados<sup>11</sup> (Figura 23). De entre todos ellos, los **alquinil complejos de oro** constituyen una familia de derivados ampliamente estudiada en lo referente a su uso en campos como la luminiscencia, la catálisis o la ciencia de materiales<sup>12</sup>, aunque sus posibles aplicaciones biológicas han sido objeto de un menor número de investigaciones<sup>13</sup>. Los ligandos de tipo alquinilo se consideran fuertes dadores  $\sigma$  y  $\pi$ , lo que, de acuerdo con recientes estudios teóricos y espectroscópicos<sup>14</sup>, deriva en fuertes enlaces oro-ligando. Esta fortaleza de enlace da lugar a complejos con mayor estabilidad incluso en condiciones fisiológicas, lo que disminuye su capacidad de descomponerse a oro metálico.



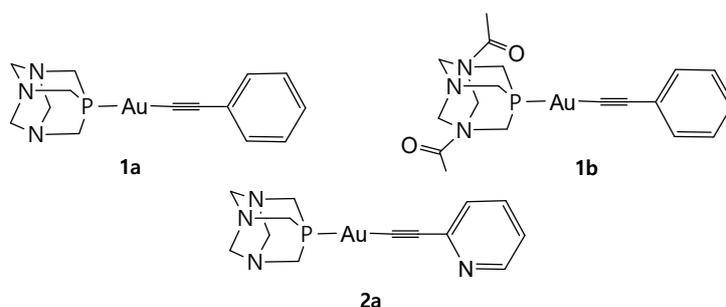
**Figura 23.** Familias de complejos de oro con diferentes ligandos que han mostrado actividad antitumoral.

Al discutir acerca de las propiedades terapéuticas del auranofin (ver apartado 1.5), se ha mencionado que el ligando trietilfosfina ( $PEt_3$ ) contribuye a aumentar la lipoficidad del complejo, lo que mejora su efecto biológico respecto al de sus predecesores. Esto es debido a que le permite atravesar las membranas biológicas con mayor facilidad y alcanzar sus dianas terapéuticas de manera más eficaz<sup>15-17</sup>. No obstante, también parece ser en parte responsable de la toxicidad observada en los estudios en humanos<sup>18</sup>. Por ello, se ha propuesto el uso de fosfinas solubles en agua para solventar esta situación



DAPTA (3,7-diacetil-1,3,7-triaza-5-fosfabiciclo[3.3.1]nonano) (Figura 24), que es unas siete veces más soluble en agua que la PTA. La coordinación del centro metálico a la fosfina PTA o DAPTA modifica por tanto su solubilidad, lo que debería traducirse en un mejor transporte por el torrente sanguíneo, pero en algunos casos puede condicionar también su efecto antitumoral. Svahn *et al.*<sup>26</sup> evaluaron el efecto antiproliferativo de una serie de complejos de oro(I) con 4-etinilanilina como ligando alquino además de las fosfinas PTA y DAPTA sobre la línea A2780 de carcinoma ovárico humano. Los autores observaron que el equivalente coordinado con DAPTA tenía una menor predisposición a entrar en la célula tumoral que su análogo de PTA. Esto se traducía en una menor citotoxicidad en términos de  $IC_{50}$  ( $17,4 \pm 1,0 \mu\text{M}$  y  $1,7 \pm 0,4 \mu\text{M}$  respectivamente). No obstante, el derivado coordinado a PTA resultó ser más dañino sobre un modelo no tumoral (fibroblastos humanos sanos) que su análogo de DAPTA ( $IC_{50}$  complejo PTA=  $19,0 \mu\text{M}$  frente a  $IC_{50}$  complejo DAPTA=  $70,4 \mu\text{M}$ ). Por tanto, en este caso en concreto la fosfina sólo influye en la capacidad del complejo de atravesar la membrana de la célula, no así en su selectividad como previamente habían observado Allardyce *et al.*<sup>22</sup> con un derivado de rutenio. No obstante, esta diferencia a nivel de acción anticancerígena de los complejos coordinados con PTA y DAPTA podría depender del tipo de célula. Esta hipótesis se ve apoyada por los resultados obtenidos por Andermark *et al.*<sup>27</sup> sobre las líneas celulares HT-29 y MDA-MB-231, quienes no observaron diferencias significativas entre los complejos de PTA o DAPTA con el ligando alquínilo 4-etinilanisol.

De acuerdo con lo desarrollado anteriormente acerca de la medicina personalizada, conocer el perfil bioquímico de un tumor concreto es necesario para predecir la efectividad de un tratamiento concreto. Para estudiar el efecto antitumoral de dos alquínil complejos de oro(I) con fenilacetileno y las fosfinas PTA y DAPTA como ligandos auxiliares,  $[\text{Au}(\text{C}\equiv\text{CPh})(\text{PTA})]$  (**1a**) y  $[\text{Au}(\text{C}\equiv\text{CPh})(\text{DAPTA})]$  (**1b**) (Figura 25), se escogió a la línea celular Caco-2 como modelo de carcinoma de colon humano poco agresivo. Ambos complejos fueron previamente sintetizados en nuestro grupo de investigación, y el complejo **1b** había sido anteriormente ensayado sobre dos modelos de cáncer de ovario (líneas A2780 y A2780*cisR*, resistente a cisplatino), obteniéndose valores comparables a los del auranofin<sup>28</sup>, lo que sugiere un interesante potencial antitumoral.



**Figura 25.** Estructura de los tres alquinil derivados de oro(I) de fórmulas químicas:  $[\text{Au}(\text{C}\equiv\text{CPh})(\text{PTA})]$  (**1a**);  $[\text{Au}(\text{C}\equiv\text{CPh})(\text{DAPTA})]$  (**1b**) y  $[\text{Au}(\text{C}\equiv\text{C-2-NC}_5\text{H}_4)(\text{PTA})]$  (**2a**) ensayados sobre la línea Caco-2.

La línea de carcinoma de colon humano Caco-2, que se obtuvo a partir de un tumor primario en el colon de un paciente varón y caucásico, se encuentra dentro de la clase 2 de modelo de cáncer de colon de acuerdo con la clasificación de Trainer *et al.* Las líneas que entran en este grupo se caracterizan por inducir tumores de forma lenta y progresiva cuando son inoculadas en un modelo murino<sup>29</sup>. Es por ello que se puede considerar a la línea Caco-2 como un modelo de carcinoma de colon poco agresivo. No obstante, debe tenerse en cuenta que esta línea es capaz de producir mucina cuando se encuentra en la fase de crecimiento exponencial. Los tumores mucinosos de colon son un tipo de carcinoma colónico que se caracteriza por producir grandes cantidades de la proteína mucina. A nivel mundial, entre un 10 y un 20% de todos los casos de CRC diagnosticados corresponden a tumores mucinosos. Por lo general, es más frecuente que estos tumores se diagnostiquen en pacientes menores de 50 años, siendo el tipo de carcinoma predominante en los menores de 20 años. Habitualmente, esta clase de tumores se detecta en estadios más avanzados, por lo que la quimioterapia suele ser la estrategia terapéutica elegida, aunque existen evidencias contradictorias acerca de su potencial metastático. Pero, dado que no se han encontrado diferencias significativas en cuanto a la tasa de supervivencia respecto a los tumores no mucinosos, los datos recogidos hasta el momento permiten concluir que ambas clases de carcinoma deberán seguir la misma opción de tratamiento, que dependerá del estadio en el que se encuentra la enfermedad (ver apartado 1.3, pág. 46; Figura 11)<sup>30,31</sup>. Sin embargo, el uso de fármacos lipófilos podría estar contraindicado debido a sus dificultades para atravesar la capa de mucina<sup>32</sup>.

Para comparar el efecto citotóxico de ambos complejos se calculó el valor de su  $\text{IC}_{50}$  tras 72h de incubación; se utilizaron cisplatino y auranofin como controles positivos. De acuerdo con los valores recogidos en la Tabla 4, puede observarse que el complejo  $[\text{Au}(\text{C}\equiv\text{CPh})(\text{PTA})]$  (**1a**) es aproximadamente el doble de eficaz que su homólogo **1b** coordinado con DAPTA. Es decir, este tipo concreto de tumor podría beneficiarse más de un tratamiento con complejos de oro coordinados con una fosfina cuya solubilidad en agua sea moderada. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que ambos complejos son mucho más eficaces que el cisplatino, por lo que podrían ser una interesante alternativa

a la terapia basada en platino. El auranofin, no obstante, resulta más efectivo que ambos, siendo su IC<sub>50</sub> aproximadamente 1,5 veces menor que el de **1a** y 3 veces menor que el de **1b**.

**Tabla 4.** Valores de IC<sub>50</sub> de los alquinil complejos de oro(I), así como de auranofin y cisplatin, obtenidos sobre células Caco-2 tras 72h de incubación (expresados como media ± desviación estándar) y valores de coeficiente de reparto calculados para los complejos metálicos.

Complejo	IC <sub>50</sub> (μM)	LogP <sub>7,4</sub>
[Au(C≡CPh)(PTA)] ( <b>1a</b> )	2,65 ± 1,1	0,4
[Au(C≡CPh)(DAPTA)] ( <b>1b</b> )	5,04 ± 1,5	0,39
[Au(C≡C-2-NC <sub>5</sub> H <sub>4</sub> )(PTA)] ( <b>2a</b> )	3,80 ± 1,1	-0,1
<b>Auranofin</b>	1,80 ± 0,10	-0,53 <sup>33</sup>
<b>Cisplatino</b>	37,24 ± 5,15	-2,53 <sup>34</sup>

En la Tabla 4 también se muestra el valor del log P (pH = 7,4) calculado para cada uno de los derivados, medido a partir del coeficiente de reparto agua/n-octanol según lo descrito en el apartado de Metodología. De acuerdo con lo desarrollado anteriormente (ver apartado 1.6), este dato proporciona una idea acerca del carácter hidrófilo o lipófilo de un compuesto y resulta de gran interés porque puede proporcionar una idea acerca del potencial uso clínico del mismo. Si un compuesto es muy hidrofílico va a sentir gran afinidad por los medios acuosos, de modo que su transporte por el torrente sanguíneo no supondrá un problema, pero podría no entrar a la célula debido al carácter lipófilo de la membrana plasmática. Por otro lado, los compuestos con un marcado carácter lipófilo pueden dar lugar a toxicidad por su entrada y acumulación en células no tumorales<sup>35</sup>. Por tanto, es preferible una relación balanceada entre ambos caracteres.

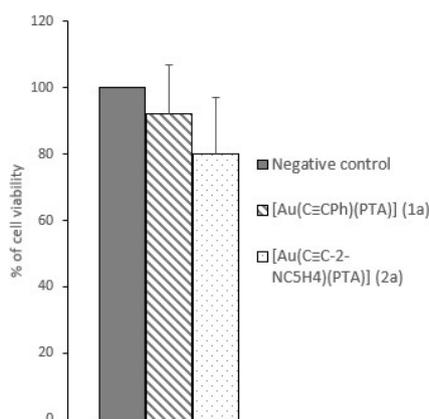
De acuerdo con los datos mostrados en la Tabla 4, ambos complejos **1a** y **1b** poseen valores de LogP en torno a 0,4, una cifra que sugiere que poseen un carácter ligeramente lipófilo. De esto puede deducirse que, en este caso concreto, la elección de la fosfina no parece condicionar la lipoficidad del derivado resultante. Por consiguiente, no puede considerarse que la lipoficidad de los derivados sea la responsable de que **1b** presente una menor capacidad antiproliferativa que **1a**. El hecho de que el complejo [Au(C≡CPh)(DAPTA)] (**1b**) muestre un menor efecto antiproliferativo que el del análogo [Au(C≡CPh)(PTA)] (**1a**) podría deberse a una capacidad más reducida de interaccionar con su diana terapéutica. Esta hipótesis podría verse apoyada por el estudio llevado a cabo por Vergara *et al.*<sup>36</sup>, en el cual analizaron el efecto antitumoral de una serie de derivados de oro(I) entre los que se encontraban los complejos [Au(SMePyrim)(PTA)] y [Au(SMePyrim)(DAPTA)]. Los autores observaron que el complejo con PTA mostraba un

mayor efecto antiproliferativo que el equivalente con DAPTA sobre dos modelos celulares de cáncer de ovario (líneas A2780 y A2780/R); posteriormente, al ensayar la actividad de las enzimas tioredoxina reductasa 1 y 2 y glutatión reductasa (GR) en presencia de ambos derivados encontraron que el complejo [Au(SMePyrin)(PTA)] podía inhibir con mayor eficacia la acción normal de las tres enzimas, siendo especialmente significativo su efecto sobre la GR. Dado que en el estudio actual se han obtenido resultados similares a los de Vergara *et al.*<sup>36</sup> en cuanto al efecto antiproliferativo de los complejos **1a** y **1b**, es posible que la presencia de la fosfina DAPTA impida una unión eficiente con la diana molecular de los complejos, estando por tanto facilitada la interacción diana-complejo en presencia de la fosfina PTA.

Por otra parte, se decidió estudiar la influencia de la molécula de alquino sobre las propiedades biológicas del complejo. Para ello, se evaluó el efecto antiproliferativo del derivado [Au(C≡C-2-NC<sub>5</sub>H<sub>4</sub>)(PTA)] (**2a**) (Figura 23), previamente sintetizado por nuestro grupo de investigación al igual que [Au(C≡CPh)(PTA)] (**1a**) y [Au(C≡CPh)(DAPTA)] (**1b**)<sup>28</sup>, cuya diferencia principal respecto al complejo **1a** es la presencia de una molécula de piridina en lugar del fenilo en el esqueleto del alquino. No se obtuvieron diferencias significativas en cuanto a su citotoxicidad en comparación con el complejo **1a** tras 72h de incubación sobre la línea Caco-2 (Tabla 4). Además, al igual que ocurría en el caso de **1a**, el complejo **2a** resulta mucho más eficaz que el cisplatino, pero no que el auranofin. No obstante, el ligando 2-etinil piridina sí parecía influir sobre la lipofilidad del derivado, puesto que en este caso presenta un valor de logP por debajo de 0. Este dato es indicativo de un carácter balanceado entre hidrófilo y lipófilo, aunque con una cierta tendencia hidrófila. Según lo desarrollado anteriormente, el complejo **2a** podría resultar menos tóxico que su análogo **1a**.

La línea Caco-2 posee la capacidad de diferenciarse espontáneamente a enterocitos maduros tras alcanzar la confluencia, lo que comienza aproximadamente tras 7-9 días en cultivo y culmina pasados 15-20 días. La diferenciación ocurre en condiciones estándar, y a diferencia de otros modelos, el grado de diferenciación de esta línea es muy alto, tanto a nivel morfológico como funcional. En cuanto a los cambios morfológicos, el más evidente es pasar del fenotipo redondeado y poco diferenciado típico de una célula tumoral a la polarización de un enterocito maduro, con un borde en cepillo con microvellosidades en el lado apical de la membrana. En el borde en cepillo se expresan las enzimas hidrolasas características de los enterocitos, entre ellas la lactasa, y son además completamente funcionales. Desarrollan asimismo uniones estrechas entre célula y célula, constituyendo un modelo aceptable de la barrera intestinal<sup>37</sup>. Es por ello que la línea Caco-2 se ha utilizado ampliamente en estudios de absorción de fármacos y otros compuestos, así como para predecir el comportamiento de la mucosa intestinal ante diversos estreses<sup>38-41</sup>. Curiosamente, de entre todos los parámetros que se modifican durante la diferenciación, destaca el cese de producción de mucina<sup>42</sup>.

Para obtener una primera idea acerca de la selectividad de **1a** y **2a**, se incubaron durante 72h sobre la línea Caco-2 diferenciada en cantidades equivalentes a sus IC<sub>50</sub> (Tabla 4). En ninguno de los dos casos se obtuvieron diferencias significativas respecto al control negativo, si bien es cierto que la reproducibilidad de los ensayos no fue la ideal (Figura 26). Los datos obtenidos parecen indicar que la mucosa intestinal podría tolerar bien el tratamiento con ambos derivados, aunque con estos datos preliminares no pueden descartarse que en un organismo vivo se produjesen trastornos gastrointestinales a consecuencia de la terapia. Serían necesarios estudios sobre modelos animales para ampliar la información al respecto.



**Figura 26.** Estudio de la toxicidad sobre un modelo *in vitro* de la mucosa intestinal. Efecto de 72h de incubación con **1a** (2,65  $\mu$ M) o **2a** (3,80  $\mu$ M) en la línea Caco-2 diferenciada.

Con [Au(C≡C-2-NC<sub>5</sub>H<sub>4</sub>)(PTA)] (**2a**) se llevó a cabo una segunda aproximación acerca de su toxicidad en tejidos sanos al calcular el valor de su IC<sub>50</sub> en células Caco-2 diferenciadas. A partir de este valor y del obtenido previamente en células indiferenciadas (Tabla 4), se calculó el valor del índice de selectividad (*Selectivity Index*; SI). Se usaron cisplatino y auranofin como controles positivos. Si bien en cuanto a su efectividad **2a** resulta menos potente que el auranofin, aunque esta diferencia no es demasiado pronunciada, su uso clínico podría suponer una ventaja considerable en cuanto a su toxicidad sobre tejidos sanos, ya que su SI es mucho mayor que el de este fármaco comercial (Tabla 5). Por consiguiente, los datos obtenidos hasta el momento apuntan hacia la posibilidad de que este nuevo derivado de oro reúna las características de eficacia y selectividad que mencionábamos necesarias para el quimioterápico ideal.

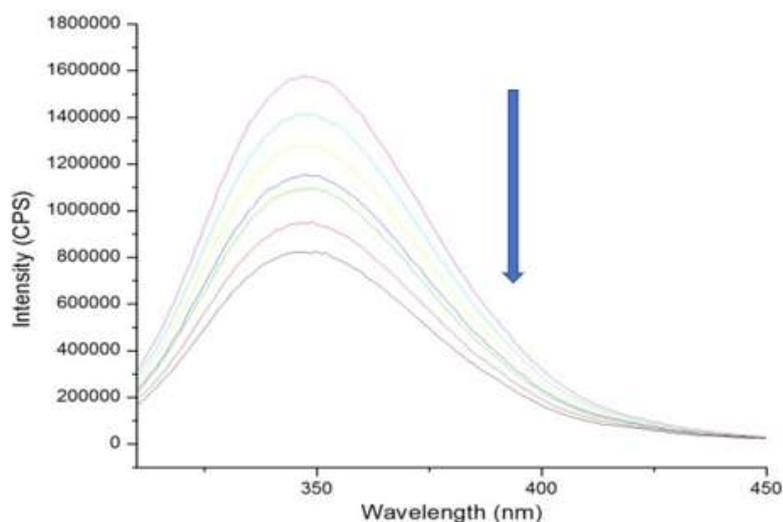
**Tabla 5.** Valores de IC<sub>50</sub> y SI de **2a**, así como de los fármacos comerciales cisplatino y auranofin, calculados tras 72h de incubación sobre células Caco-2 diferenciadas.

Complejo	IC <sub>50</sub> (μM)	SI
[Au(C≡C-2-NC <sub>5</sub> H <sub>4</sub> )(PTA)] ( <b>2a</b> )	51,04 ± 1,28	13,43
<b>Auranofin</b>	6,21 ± 0,44	3,45
<b>Cisplatin</b>	151,13 ± 58,12	3,31

Antes de profundizar en el mecanismo de acción de ambos complejos, se consideró que podría ser interesante obtener una idea preliminar acerca de sus propiedades farmacocinéticas, en concreto con aquellas relacionadas con su distribución en el organismo. De acuerdo con lo desarrollado en el apartado 1.6, la albúmina sérica es una de las principales implicadas en el transporte de gran parte de los fármacos por el torrente sanguíneo. Dado que la albúmina sérica bovina (*Bovin Serum Albumin*; BSA) presenta una homología del 75,6% con la HSA<sup>43</sup>, es posible utilizarla como modelo para predecir el comportamiento de un fármaco en presencia de la albúmina sérica humana. De los 583 residuos que constituyen a la BSA, destacan los triptófanos en posición 134, localizado en la superficie del subdominio IB, y en posición 212 en el bolsillo hidrofóbico del subdominio IIA. El interés de ambos residuos reside en que dotan a la proteína de fluorescencia intrínseca, y dado que el espectro de fluorescencia de una molécula está condicionado por su entorno, en caso de que una molécula establezca una interacción con la BSA se traducirá en una modificación de dicho espectro de fluorescencia. Este fenómeno se denomina desactivación o “*quenching*” de la fluorescencia, y se define como el descenso en la intensidad de la fluorescencia de una molécula debido a cambios conformacionales de la misma o a la interacción con moléculas adicionales<sup>44-46</sup>. Por lo tanto, se analizó el espectro de fluorescencia de la BSA en presencia de diferentes concentraciones del complejo [Au(C≡CPh)(PTA)] (**1a**) de acuerdo con el procedimiento descrito en la sección experimental. En la Figura 27 puede observarse que se produce un descenso en la fluorescencia de la proteína conforme se aumenta la concentración del complejo metálico.

Estos datos de fluorescencia fueron analizados para obtener la constante de desactivación de Stern-Volmer K<sub>SV</sub>. Para ello, se utilizó la ecuación de Stern-Volmer descrita en la sección experimental y se representó el valor F<sub>0</sub>/F (F<sub>0</sub> y F = intensidad en ausencia y presencia del complejo metálico **1a** respectivamente) frente a las concentraciones del mismo; la línea obtenida (Figura 28A) proporciona el valor de la constante de desactivación, que se recoge asimismo en la Tabla 6. De igual manera, se estudió la interacción entre BSA y el complejo metálico a diferentes temperaturas para elucidar el posible mecanismo a través del cual se producía dicha interacción. La

ecuación de Stern-Volmer modificada (ver sección experimental) permitió calcular la constante de enlace  $K_b$  o constante de asociación aparente, así como el número de sitios de unión o valor  $n$ . Ambos parámetros, que se recogen en la Tabla 6, pueden ser deducidos a partir de la pendiente y la ordenada en el origen, respectivamente, de la recta resultante de representar  $\log[(F_0-F)/F]$  versus concentración de **1a** (Figura 28B).



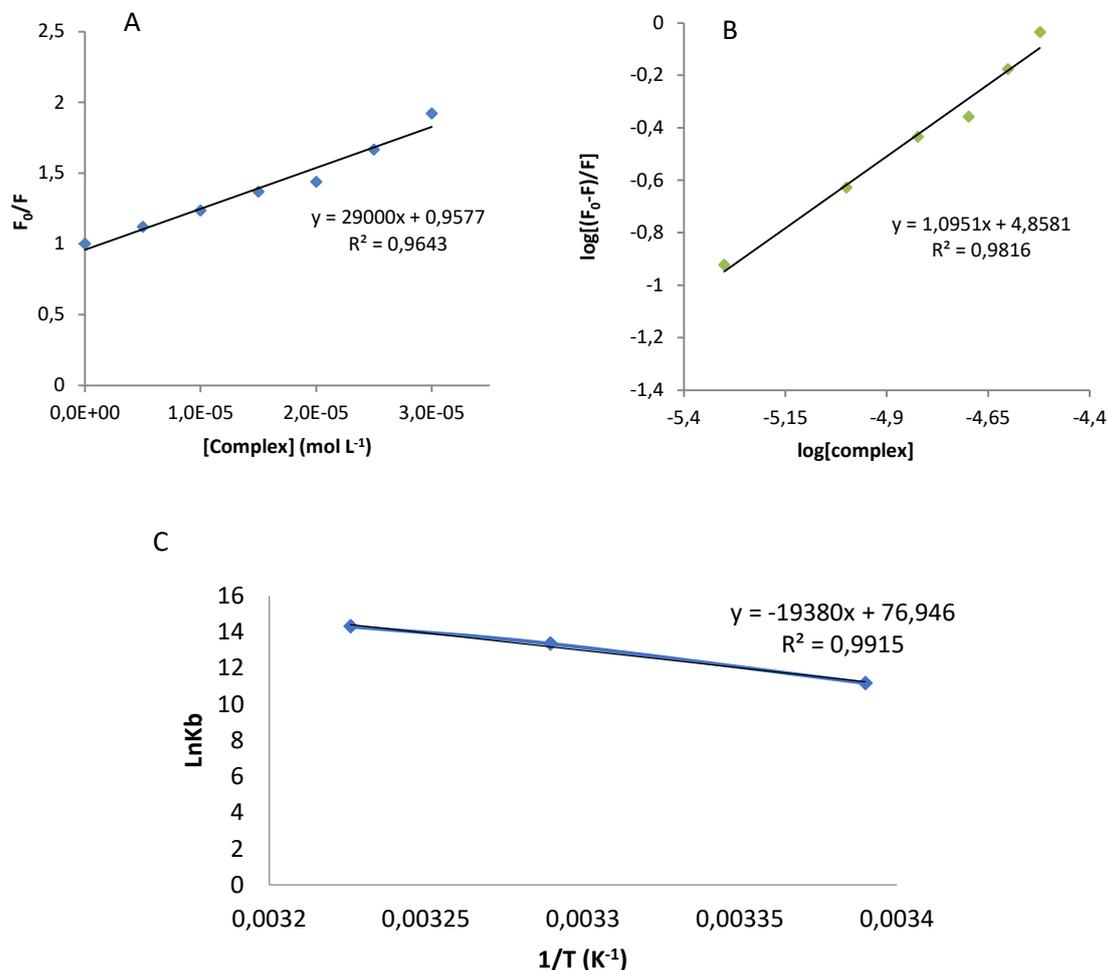
**Figura 27.** Estudio de la interacción de **1a** con la proteína BSA. Desactivación de la fluorescencia intrínseca de la BSA a 295 K en presencia de concentraciones crecientes de **1a** (5, 10, 15, 20, 25 y 30  $\mu\text{M}$ ). La flecha indica la disminución de la intensidad de la señal conforme aumenta la concentración del complejo metálico.

**Tabla 6.** Valores de la constante de desactivación ( $K_{sv}$ ), la constante de unión ( $K_b$ ) y los parámetros termodinámicos relativos a la interacción entre BSA y **1a** a diferentes temperaturas.

T (K)	n	$K_{sv}$ ( $\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot 10^4$ )	$K_b$ ( $\text{M}^{-1}$ )	$\Delta G^0$ ( $\text{KJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ )	$\Delta H^0$ ( $\text{KJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ )	$\Delta S^0$ ( $\text{J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$ )
295	1,09	2,9	$7,21\cdot 10^4$	-27,60	161,13	639,76
304	1,34	1,75	$6,38\cdot 10^5$	-33,36	161,13	639,76
310	1,44	1,61	$1,66\cdot 10^6$	-37,20	161,13	639,76

La constante de enlace  $K_b$  calculada a 295 K tiene un valor de  $7,21\cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$ , una cifra que, si bien es mayor que la obtenida por otros autores para la interacción entre cisplatino y HSA<sup>47</sup>, se trata de un dato muy próximo al de otros complejos de oro(I) y oro(III)<sup>48,49</sup>, ya que se encuentran dentro de un rango de entre  $10^3$  y  $10^4 \text{ M}^{-1}$ . Este resultado parece sugerir que **1a** es capaz de interaccionar significativamente con la

proteína BSA, lo que podría implicar que la BSA sería la principal responsable de transportarlo por el torrente sanguíneo.



**Figura 28.** A) Representación de la ecuación de Stern-Volmer que muestra la pérdida de fluorescencia de la BSA en presencia de concentraciones crecientes de **1a** a 295 K, a partir de la cual se obtiene el valor de  $K_{sv}$ . B) Representación de la ecuación modificada de Stern-Volmer que muestra la pérdida de fluorescencia de la BSA en presencia de concentraciones crecientes de **1a** a 295 K, a partir de la cual se obtiene el valor de  $K_b$ . C) Representación de  $\ln K_b$  frente a  $1/T$ .

En la Figura 28A se puede observar que se obtiene una relación lineal al representar  $F_0/F$  frente a la concentración del complejo metálico, lo que se corresponde con la existencia de un único mecanismo de desactivación de la señal luminiscente. Se han descrito dos tipos de mecanismos a través de los cuales puede producirse la desactivación de la fluorescencia. Por un lado, la desactivación de tipo estática tiene lugar cuando el agente desactivante forma un complejo no fluorescente al interactuar con el fluoróforo; por otro, cuando ambos agentes colisionan de forma continuada se habla de una desactivación dinámica<sup>50</sup>. Esta última depende de la difusión, de modo que altas temperaturas dan lugar a mayores coeficientes de difusión y por lo tanto a un mayor valor de la constante  $K_{sv}$ . El análisis de la interacción entre ambos agentes realizado

a diferentes temperaturas permite determinar el tipo de mecanismo según el cual se induce la desactivación de la fluorescencia. Según se recoge en la Tabla 6, los valores de ambas constantes  $K_{sv}$  y  $K_b$  disminuyen conforme se aumenta la temperatura, lo que implica que se forma un complejo entre la BSA y **1a**. Es decir, se trata de un mecanismo de desactivación de tipo estático<sup>50,51</sup>.

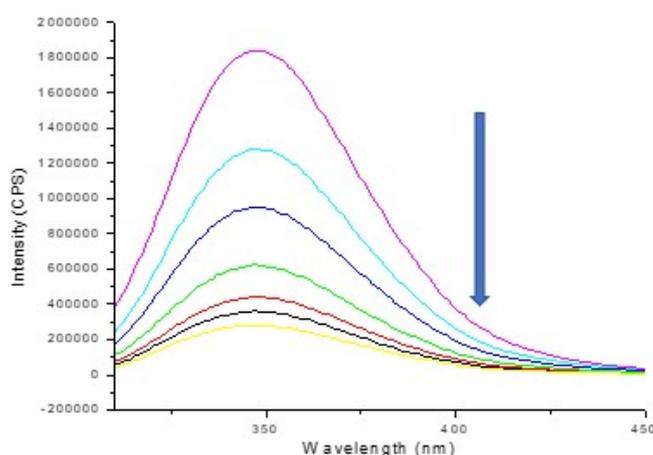
Finalmente, se calcularon los parámetros termodinámicos  $\Delta G^\circ$ ,  $\Delta H^\circ$ , y  $\Delta S^\circ$  con la ecuación de van't Hoff ( $\ln K_b = -\Delta H^\circ/RT + \Delta S^\circ/R$ ;  $K_b$  es la constante de unión a diferentes temperaturas y R la constante de los gases) para así poder determinar las fuerzas que permiten la interacción entre BSA y **1a**, pudiendo tratarse de interacciones de van der Waals, puentes de hidrógeno y/o atracciones de tipo electrostáticas e hidrofóbicas. La entalpía de intercambio  $\Delta H^\circ$  se calcula a partir de la pendiente de la línea obtenida al representar  $\ln K_b$  frente a  $1/T$  (figura 28C) y  $\Delta G^\circ$  se estima a partir de la ecuación  $\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T \Delta S^\circ$ . En este caso, se han obtenido valores de  $\Delta H^\circ$  y  $\Delta S^\circ$  por encima de 0 (Tabla 6), que indican la existencia de interacciones hidrofóbicas entre la proteína y el derivado metálico<sup>52</sup>. Por otro lado, el valor de  $\Delta G^\circ$  se encuentra por debajo de cero, lo que es indicativo de que este proceso tiene lugar de forma espontánea. Finalmente, al aumentar el número de sitios de unión (parámetro  $n$  de la Tabla 6) al inducirse el incremento de la temperatura, puede concluirse que existe un componente dinámico en la unión entre ambas moléculas.

A continuación, se llevó a cabo el mismo estudio con  $[Au(C\equiv C-2-NC_5H_4)(PTA)]$  (**2a**). Tal como puede apreciarse en la Figura 29, conforme se incrementaba la concentración del derivado se observaba un descenso en la fluorescencia de la BSA, de forma similar a lo que ocurría con su análogo **1a**. No obstante, al procesar los datos de fluorescencia obtenidos mediante la ecuación de Stern-Volmer y representar el cociente  $F_0/F$  frente a la concentración de **2a** se obtiene una curva ascendente (Figura 30A) en lugar de una recta como ocurría en el caso de **1a** (Figura 28A). Mientras que la recta indica la existencia de un único mecanismo de desactivación de la luminiscencia, la curva ascendente sugiere que coexisten los dos mecanismos previamente descritos. Asimismo, este patrón podría ser consecuencia de que el complejo metálico es capaz de unirse en más de un lugar de la proteína; en este supuesto, el complejo podría sentir una afinidad distinta por cada uno de estos sitios, o bien la proteína podría experimentar un cambio conformacional como consecuencia de la interacción, dejando así expuestos otros sitios de interacción que resultaban previamente inaccesibles<sup>50</sup>.

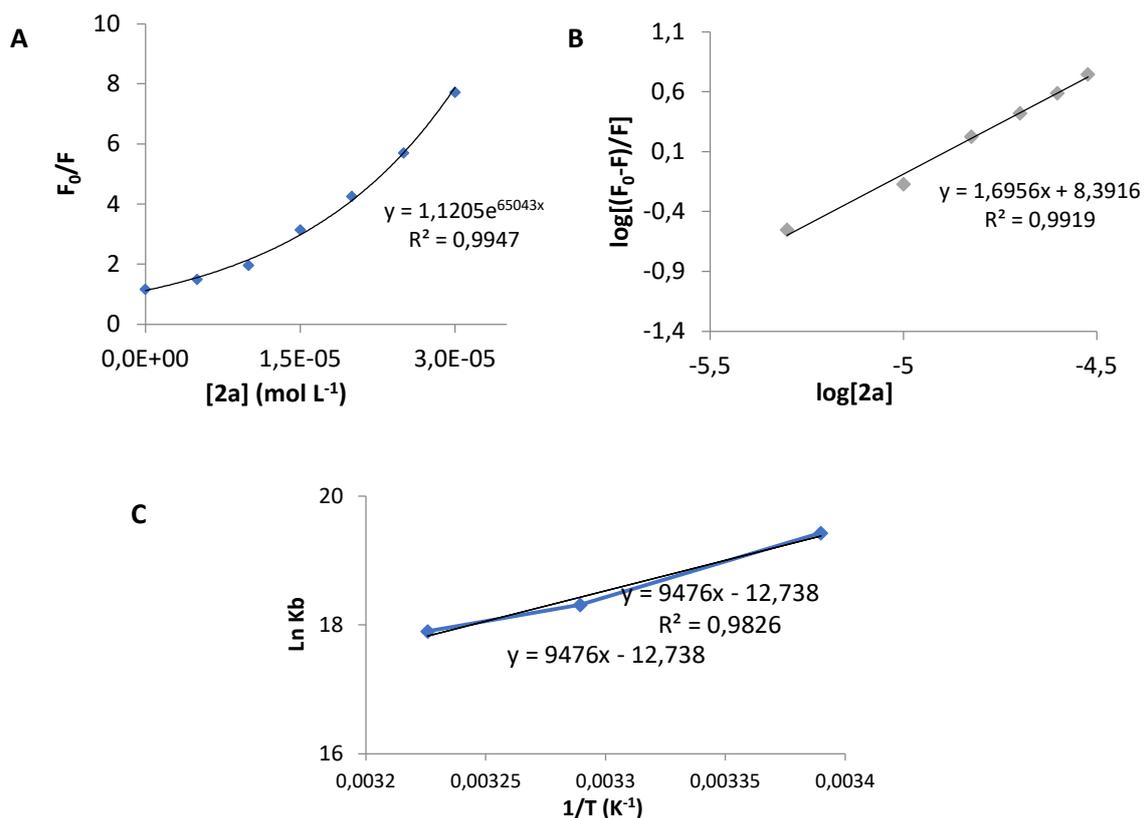
De nuevo, se estudió la interacción entre el complejo metálico y la proteína a distintas temperaturas para así poder determinar los valores de  $K_b$  a dichas temperaturas y calcular los parámetros termodinámicos  $\Delta H^\circ$ ,  $\Delta S^\circ$  y  $\Delta G^\circ$  (Tabla 7) tal y como lo habíamos medido en el caso del complejo  $[Au(C\equiv CPh)(PTA)]$  (**1a**). En este caso, el valor de la constante de enlace a temperatura ambiente es del orden de  $10^8 \text{ M}^{-1}$ , un valor muy superior al previamente calculado para el análogo **1a** (Tabla 6); esta cifra es más similar

a la hallada por Ji *et al.* al analizar la interacción entre una serie de nanopartículas de oro y la BSA<sup>53</sup>.

Finalmente, mediante el cálculo de los parámetros termodinámicos se ha determinado el tipo de enlaces que podrían mediar la interacción entre **2a** y la BSA. Al obtenerse un valor negativo para  $\Delta G^\circ$ , se puede concluir que el proceso es espontáneo, igual que pasaba en el caso anterior, aunque al calcular los valores de  $\Delta H^\circ$  y  $\Delta S^\circ$  encontramos otra diferencia con respecto a **1a**, dado que en este caso ambos se encuentran por debajo de cero; esto sugiere que la interacción entre el complejo **2a** y la BSA depende de la formación de enlaces de hidrógeno y fuerzas de Van der Waals<sup>54</sup>. Los resultados obtenidos hasta el momento apuntan a que ambos derivados de oro(I) son capaces de interactuar con la proteína BSA, de modo que es razonable suponer que la albúmina sérica podría ser la principal responsable de transportarlos por el torrente sanguíneo. No obstante, se han observado diferencias significativas en cuanto a la naturaleza de la interacción con la proteína entre los dos complejos, que podrían estar causadas por la presencia del nitrógeno adicional en la fórmula química de **2a**.



**Figura 29.** Estudio de la interacción de **2a** con la proteína BSA. Desactivación de la fluorescencia intrínseca de la BSA a 295 K en presencia de concentraciones crecientes de **2a** (5, 10, 15, 20, 25 y 30  $\mu\text{M}$ ). La flecha indica la disminución de la intensidad de la señal conforme aumenta la concentración del complejo metálico.



**Figura 30.** A) Representación de la ecuación de Stern-Volmer que representa la pérdida de fluorescencia de la BSA en presencia de concentraciones crecientes de **2a** a 295 K, a partir de la cual se obtiene el valor de  $K_{sv}$ . B) Representación de la ecuación modificada de Stern-Volmer que representa la pérdida de fluorescencia de la BSA en presencia de concentraciones crecientes de **2a** a 295 K, a partir de la cual se obtiene el valor de  $K_b$ . C) Representación de  $\ln K_b$  frente a  $1/T$ .

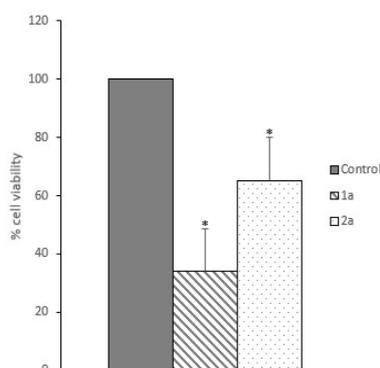
**Tabla 7.** Valores de la constante de desactivación ( $K_{sv}$ ), la constante de unión ( $K_b$ ) y los parámetros termodinámicos relativos a la interacción entre BSA y **1a** a diferentes temperaturas.

T (K)	n	$K_b$ ( $M^{-1}$ )	$\Delta G^0$ ( $KJ \cdot mol^{-1}$ )	$\Delta H^0$ ( $KJ \cdot mol^{-1}$ )	$\Delta S^0$ ( $J \cdot mol^{-1} \cdot K^{-1}$ )
295	1,70	$2,3 \cdot 10^8$	-78,78	-105,9	47,54
304	1,62	$8,98 \cdot 10^7$	-78,78	-105,9	46,58
310	1,60	$5,95 \cdot 10^7$	-78,78	-105,9	45,95

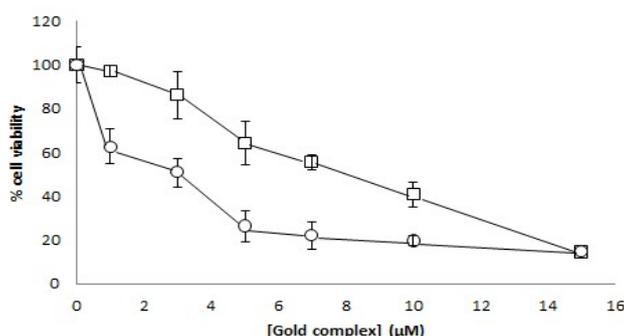
A continuación, se retomó el estudio relativo acerca del efecto antitumoral de ambos complejos  $[Au(C\equiv CPh)(PTA)]$  (**1a**) y  $[Au(C\equiv C-2-NC_5H_4)(PTA)]$  (**2a**). Para ello, se redujo el tiempo de exposición de 72 a 24h y todos los experimentos desarrollados a continuación fueron realizados sobre células Caco-2 indiferenciadas, añadiendo una cantidad equivalente al  $IC_{50}$  de los complejos que se muestra en la Tabla 4 salvo que se especifique

lo contrario. Al realizarse una primera determinación de la viabilidad celular con los parámetros especificados, puede observarse que ambos complejos son capaces de disminuir la proliferación del cultivo, si bien el complejo **1a** parece ser más efectivo que el **2a** (Figura 31A). Debido a ello, se quiso ahondar en el efecto antiproliferativo de **2a**. Con este fin, se realizó una curva dosis-respuesta a dos tiempos de incubación (24 y 72h) con el complejo **2a** para analizar el efecto de tiempo y concentración sobre su efecto citotóxico, encontrándose que era dependiente de ambos factores (Figura 31B). Estos datos sugieren que, para igualar el efecto antitumoral del complejo **1a** en un tiempo de incubación concreto, podría ser necesario aumentar la concentración de **2a**. Con esta primera aproximación se plantean dos escenarios: o bien el compuesto **2a** tiene más dificultades para acceder a la célula, y por consiguiente requiere más tiempo para ejercer su acción biológica, o bien sus mecanismos de acción difieren, siendo más lento el de dicho complejo.

A



B

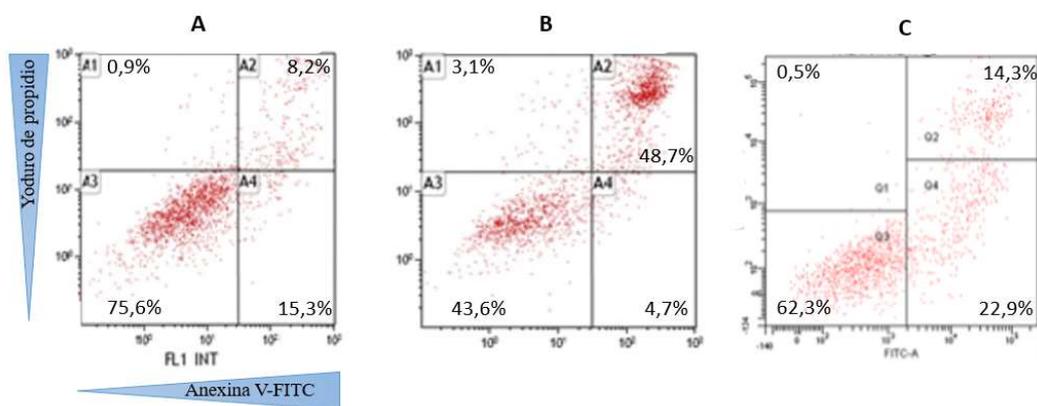


**Figura 31.** Análisis del efecto citotóxico sobre células Caco-2 indiferenciadas. A) Efecto de **1a** y **2a** tras 24h de incubación en células Caco-2 indiferenciadas en cantidades equivalentes a sus IC<sub>50</sub>. \*p<0,05 vs control negativo. B) Curva dosis-respuesta tras 24 (cuadrados) o 72h (círculos) de exposición con **2a**.

La siguiente etapa del estudio consistió en analizar el tipo de muerte inducida por ambos complejos sobre la línea Caco-2 tras 24h de incubación. Para ello, se recurrió a la doble tinción Anexina V-FITC (*Fluorescein isotiocyanate*) y yoduro de propidio<sup>55</sup>. Esta

técnica permite distinguir cuatro poblaciones celulares diferentes: células vivas, necróticas, en apoptosis temprana y en apoptosis tardía. Uno de los primeros eventos de la apoptosis consiste en la translocación del fosfolípido fosfatidilserina de la cara citoplasmática a la extracelular de la membrana plasmática. La anexina V es capaz de unirse a este fosfolípido, por lo que coordinarla con un compuesto fluorescente como el isotiocianato de fluoresceína permitirá identificar a las células en apoptosis temprana. El yoduro de propidio, por su parte, es capaz de unirse a los ácidos nucleicos, pero dado que no puede atravesar la membrana plasmática solo dará fluorescencia en aquellas células cuya membrana esté comprometida, que serán las necróticas y las que se encuentren en la fase tardía de la apoptosis; estas últimas, además, serán doble positivas porque también darán la señal FITC. Finalmente, las células vivas serán doble negativas.

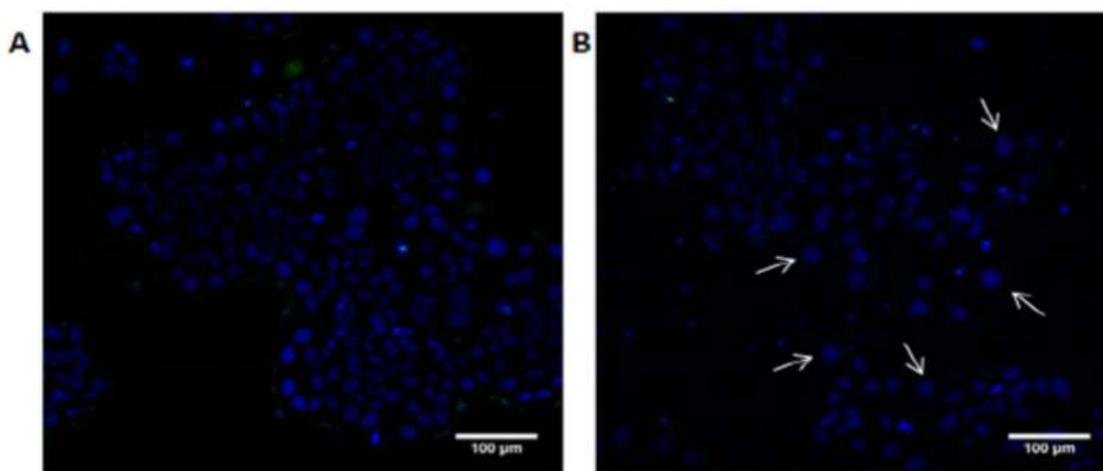
Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 32. En primer lugar, es destacable el hecho de que ninguno de los complejos estudiados induce aumentos significativos en el número de células necróticas, lo que es de interés clínico de acuerdo con lo desarrollado en el apartado 1.2<sup>56</sup>. En lo que respecta al complejo  $[\text{Au}(\text{C}\equiv\text{CPh})(\text{PTA})]$  (**1a**), puede observarse un considerable aumento del número de células en apoptosis tardía, lo que podría ser indicativo no solo de su capacidad de inducir apoptosis sino además de su ya mencionado posible rápido efecto biológico. No obstante, el resultado obtenido para su análogo  $[\text{Au}(\text{C}\equiv\text{C}-2\text{-NC}_5\text{H}_4)(\text{PTA})]$  (**2a**) es muy diferente, ya que en este caso solo se obtuvo un ligero aumento en la población celular en apoptosis tardía, junto con un incremento no significativo del número de células en apoptosis temprana.



**Figura 32.** Estudio de las poblaciones apoptóticas y necróticas en un cultivo de células Caco-2 indiferenciadas tras 24h de tratamiento con A) DMSO (control negativo; 2 μM); B) **1a** (IC<sub>50</sub>); C) **2a** (IC<sub>50</sub>). La Figura 28 se toma además como ejemplo para indicar la relación entre cada uno de los cuadrantes del histograma y la fluorescencia de las dos sondas utilizadas. Células vivas: ausencia de fluorescencia. Células necróticas: fluorescencia yoduro de propidio. Células en apoptosis temprana: fluorescencia FITC. Células en apoptosis tardía: doble fluorescencia.

A pesar de que la hipótesis inicial de que **1a** actúa a mayor velocidad que **2a** parece estar validada por los resultados mostrados en las Figuras 31A y 32, el ligero aumento

en el número de células en apoptosis tardía inducido en respuesta al tratamiento con **2a** no permite aplicar el principio de Ockham y aceptar como válida esta suposición, ya que la disminución en la viabilidad del cultivo reflejada en la Figura 31A no puede explicarse únicamente con ese leve incremento de células en apoptosis tardía. Esto obliga a buscar alternativas a la hipótesis inicial, entre las que se encuentran suponer que **2a** no causa la muerte de las células tumorales mediante la inducción de apoptosis. Para comprobarlo, se estudió mediante doble tinción fluorescente Hoechst 33342 y *CellEvent Caspase-3/7 Green detection reagent* la activación de las caspasas ejecutoras 3 y 7 tras 24h de exposición a **2a** (Figura 33). Al no encontrarse evidencias de la activación de dichas proteasas, se pudo concluir que el derivado causaba la muerte celular a través de un mecanismo independiente de caspasas, lo que podría descartar la inducción de apoptosis. La imagen de fluorescencia revela, además, otros dos datos de gran relevancia. El primero de ellos, una efectiva disminución de la población celular en respuesta al tratamiento que concuerda con la Figura 31A. El segundo y de mayor interés, el aumento del volumen celular como consecuencia de la incubación con **2a**. Esta característica morfológica no es propia de las células apoptóticas, ya que este tipo de muerte celular cursa con un encogimiento del volumen celular<sup>57,58</sup>. Si bien se han documentado casos en los que un agente quimioterapéutico puede inducir apoptosis por vías que no requieren la activación de las caspasas, la formación de los cuerpos apoptóticos parece ser una etapa común y obligatoria<sup>59-61</sup>. Por tanto, la ausencia de este marcador, junto con la ya mencionada no activación de caspasas ejecutoras, permite concluir que **2a** induce un tipo de muerte distinto tanto a apoptosis como a necrosis.

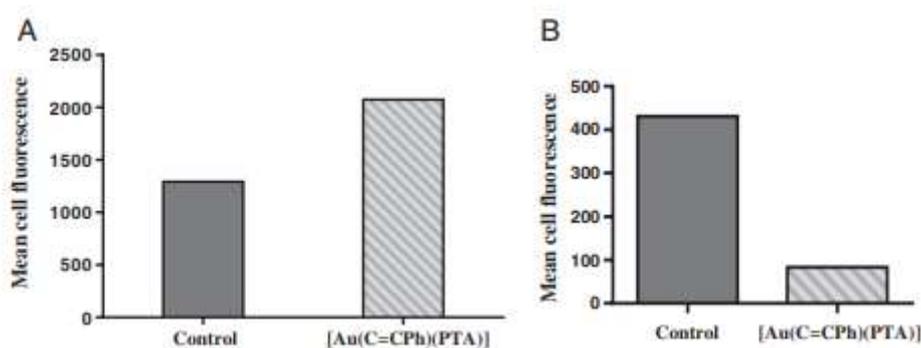


**Figura 33.** Doble tinción con Hoechst 33342 (azul) y *CellEvent Caspase-3/7 Green detection reagent* (verde) tras 24h de incubación con **2a** (IC<sub>50</sub>). Se marcan con flechas blancas células cuyo volumen ha aumentado de forma apreciable.

Llegados a este punto, había quedado patente que la respuesta celular variaba considerablemente dependiendo de a qué complejo fuese expuesta, por lo que se vio necesario estudiar por separado el efecto biológico de cada uno de ellos. Así pues, se decidió continuar caracterizando el tipo de apoptosis inducida por el complejo

[Au(C≡CPh)(PTA)] (**1a**). Dada la tendencia habitual de los fármacos quimioterapéuticos, incluidos el cisplatino<sup>62</sup> y el auranofin<sup>63</sup>, de inducir apoptosis intrínseca, se optó por analizar algunos de los principales marcadores de esta ruta (ver apartado 1.2, pág. 36; Figura 7), a saber: niveles de las proteínas pro y anti-apoptóticas, liberación del citocromo c y activación de las caspasas 9 y 3<sup>56,64</sup>.

Se escogió BAX como modelo de proteína pro-apoptótica y Bcl-2 como modelo de proteína anti-apoptótica. Tras 24h de incubación con **1a** a su IC<sub>50</sub>, se observa una ruptura del equilibrio debido tanto a un incremento de 1,6 veces en los niveles de BAX (Figura 34A) como a un descenso de 5,2 veces en la cantidad relativa de Bcl-2 (Figura 34B). Es decir, se produce un aumento de la proporción de proteína pro-apoptótica concomitante con una reducción en la de proteína anti-apoptótica, lo cual permitiría a las proteínas pro-apoptóticas iniciar la formación de poros en la membrana externa mitocondrial<sup>56,64</sup> (ver apartado 1.2, pág. 36; Figura 7).



**Figura 34.** Análisis del equilibrio entre proteínas pro y anti-apoptóticas tras 24h de incubación con **1a** (IC<sub>50</sub>). Todos los resultados se expresan como media de fluorescencia. A) Medida de los niveles de la proteína pro-apoptótica BAX. B) Medida de los niveles de la proteína anti-apoptótica Bcl-2.

Al comparar ambas gráficas, puede resultar curioso que el valor numérico del descenso en los niveles de Bcl-2 sea cuantitativamente mucho mayor que el aumento en la proporción de BAX (5,2 respecto a 1,6). Esto podría ser debido a la mutación E204X que posee la línea Caco-2 en *TP53*<sup>65</sup>. Dicho gen está directamente implicado en la inducción de apoptosis en aquellas células cuyo ADN está dañando, de modo que contribuye a garantizar que se mantenga la integridad del genoma. Entraría, por lo tanto, en el grupo de genes supresores de tumores. Entre sus funciones se cuentan modificar los niveles de expresión de las proteínas pro y anti-apoptóticas, por lo que es habitual que el proceso de transformación tumoral esté determinado por mutaciones en este gen; en el caso del CRC esto resulta especialmente importante, ya que alteraciones en *TP53* pueden ser las responsables de la transición de adenoma a carcinoma<sup>66-68</sup> (ver apartado 1.1, Figura 3).

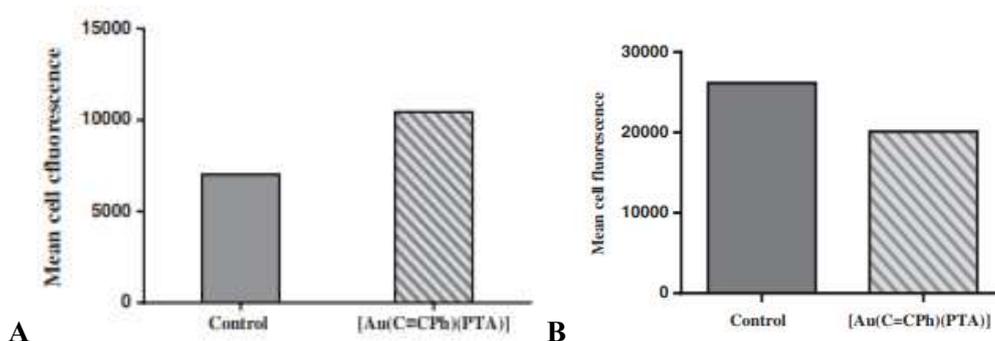
Cuando p53 funciona correctamente, induce una rápida sobreexpresión de BAX junto con una leve disminución de la expresión de Bcl-2<sup>69,70</sup>, que es lo contrario de lo que se

observa en la Figura 34 y lo que sugiere que este resultado puede ser debido a la citada mutación E204X. No todas las mutaciones que se producen en el gen *TP53* tienen los mismos efectos. Mientras que aquellas que dan lugar a una proteína p53 no funcional se asocian con niveles de BAX anormalmente bajos, las que se localizan en el motivo que interacciona con el ADN (*loop-sheet-helix motif*) inducen una sobreexpresión de la proteína pro-apoptótica, lo cual se correlaciona, sorprendentemente, con una peor prognosis<sup>71,72</sup>. En el caso concreto del CRC, la sobreexpresión de BAX suele estar relacionada con una mayor agresividad del tumor y una capacidad de metastatizar más alta<sup>73</sup>. Como se mencionaba anteriormente, la línea Caco-2 es de las que poseen unos niveles anormalmente altos de BAX debido a la mutación E204X de *TP53*<sup>65</sup>, por lo que en este caso concreto la inducción de la apoptosis tendrá una mayor dependencia de la disminución en Bcl-2 que del aumento en BAX, quedando así explicados los datos de la Figura 34.

Dado que al romperse el equilibrio entre proteínas pro y anti-apoptóticas se induce la permeabilización de la membrana externa mitocondrial, produciéndose un descenso en el potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\psi$ ) y la liberación del citocromo c entre otros<sup>56</sup> (ver apartado 1.2; Figura 7), se estudiaron ambos parámetros en respuesta a la incubación con el complejo **1a**. En situación basal, el funcionamiento de la cadena transportadora de electrones genera un gradiente de protones a través de la membrana interna mitocondrial. En consecuencia, la matriz mitocondrial posee naturalmente carga negativa, por lo que se puede analizar la integridad de este orgánulo recurriendo a sondas catiónicas fluorescentes. Las mitocondrias cuyo  $\Delta\psi$  no esté alterado tenderán a acumular las sondas en su interior, lo que se traducirá en un aumento de la fluorescencia con respecto a aquellas que estén despolarizadas<sup>74</sup>. De acuerdo con esto, la menor señal fluorescente que se observa tras incubar el cultivo de células Caco-2 con **1a** en comparación con el control negativo sugiere un incremento en el número de células con un valor alterado de su potencial mitocondrial en respuesta al tratamiento (Figura 35A).

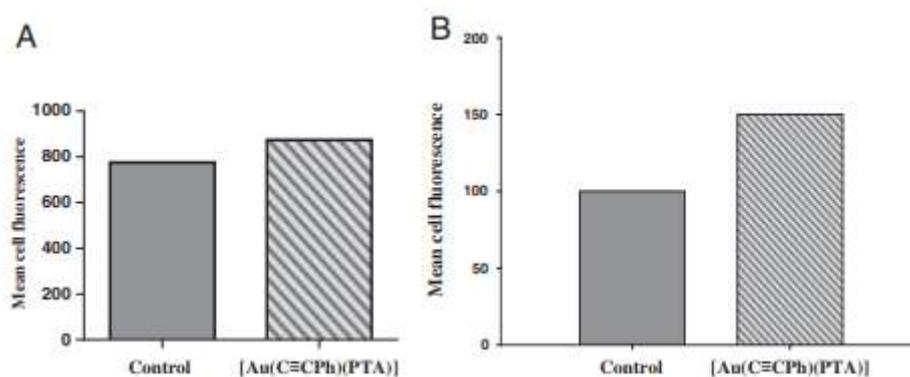
El citocromo c, cuya relevancia para la apoptosis intrínseca ya ha sido mencionada<sup>56,64</sup>, se encuentra normalmente en el espacio intermembrana mitocondrial. El modelo de apoptosis intrínseca más aceptado sostiene que la despolarización de la mitocondria era un paso previo y necesario para la liberación de esta proteína al citoplasma (ver apartado 1.2; Figura 7). De acuerdo con este modelo, el descenso en el  $\Delta\psi$  va acompañado por una serie de cambios morfológicos en el orgánulo, siendo uno de ellos una condensación de la matriz mitocondrial que podría favorecer la salida del citocromo c<sup>75</sup>. No obstante, algunos autores han aportado evidencias de que la liberación de esta proteína puede ocurrir antes de que se pueda detectar la pérdida del  $\Delta\psi$ , e incluso existen evidencias de que pueda salir al citoplasma en ausencia de cambios en el  $\Delta\psi$ <sup>76</sup>. Aunque el orden de los eventos según los cuales se produce la apoptosis intrínseca sea objeto de debate, parece claro que su salida de la mitocondria al citoplasma es un paso necesario en la mayoría de los casos, ya que tanto la vía intrínseca

como la extrínseca tienen como consecuencia su liberación. La Figura 35B refleja la cantidad de citocromo c presente en la mitocondria; al inducir el tratamiento con el complejo **1a** y observarse una reducción en la cantidad de citocromo c mitocondrial, obtenemos un nuevo dato que refuerza la hipótesis de que este derivado metálico causa apoptosis mitocondrial. En concreto, y a falta de más datos que confirmen o desmientan esta idea, parece que el tipo de apoptosis intrínseca causada por **1a** depende tanto de la condensación de la matriz mitocondrial como de la salida del citocromo c del espacio intermembrana.



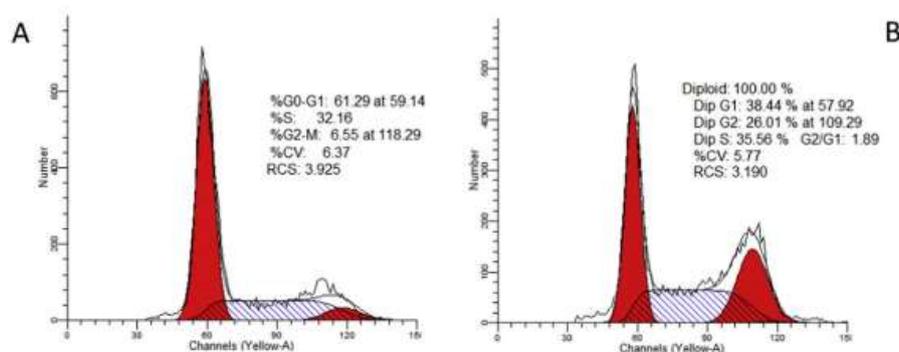
**Figura 35.** Estudio del efecto de 24h de incubación con **1a** ( $IC_{50}$ ) sobre parámetros relacionados con la apoptosis intrínseca. Todos los resultados se expresan como media de fluorescencia. A) Análisis de la cantidad de células cuyo potencial de membrana mitocondrial ha disminuido. B) Medida del contenido mitocondrial de citocromo c.

Finalmente, se analizaron los niveles de activación de las caspasas 9 y 3. Se escogió a la caspasa 9 debido a su papel como activadora a su vez de las caspasas ejecutoras en la vía intrínseca (ver apartado 1.2; Figura 7), mientras que la caspasa 3 fue escogida como modelo de caspasa ejecutora. Se encontró un aumento en los niveles de activación de ambas (Figura 36), si bien el aumento en la activación de la caspasa 3 resultó ser mayor que el de la caspasa 9 (1,5 frente a 1,16 respectivamente). Estos resultados podrían sugerir que existe algún mecanismo adicional por el cual se activa la caspasa 3 en respuesta al tratamiento con **1a**. Si bien este hecho no era conocido en el momento de la realización y posterior publicación del presente trabajo, Hwang *et al.*<sup>77</sup> detectaron un aumento no solo en la activación de la caspasa 9 sino también de la 8 en respuesta al tratamiento con auranofin. No se han encontrado evidencias de que otros autores hayan replicado estos resultados posteriormente con auranofin u otros complejos de oro(I), pero nuestros resultados parecen ir en esta dirección. Es este un campo de estudio nuevo e interesante que podría implicar que los derivados de oro(I) tienen dianas terapéuticas hasta ahora desconocidas y que volverá a ser abordado en apartados posteriores de la presente memoria.



**Figura 36.** Medida de la activación de caspasas en respuesta a 24h de tratamiento con **1a** ( $IC_{50}$ ). Todos los resultados se expresan como media de fluorescencia. A) Análisis de la activación de la caspasa 9. B) Determinación de la activación de la caspasa 3.

Según lo desarrollado en el apartado 1.2, existe una fuerte relación entre la muerte por apoptosis y el avance en el ciclo celular, por lo que se planteó como interesante realizar el estudio de este parámetro. Al incubar el cultivo con **1a** durante 24h se indujo un aumento del número de células en la fase  $G_2/M$  con respecto al control negativo (Figura 37). En el apartado 1.2, se ha mencionado que un cese del ciclo celular en esta fase podría estar relacionado con un mecanismo de acción que causase serios daños en el ADN<sup>78</sup>. A pesar de que, en general, los derivados de oro(I) sienten una menor afinidad por esta macromolécula que su predecesor, el cisplatino, a raíz de estos resultados consideramos necesario analizar la capacidad de **1a** de interactuar directamente con el ADN y causarle daño como parte de su efecto citotóxico.

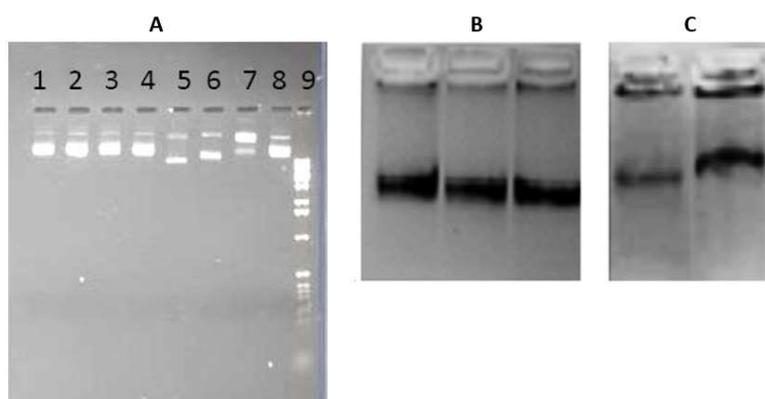


**Figura 37.** Análisis del número de células (indicado en porcentajes) en cada fase del ciclo celular tras 24h de incubación con A) DMSO (control negativo;  $2 \mu M$ ) o B) **1a** ( $IC_{50}$ ).

El estudio de esta posible interacción de **1a** con el ADN se abordó mediante dos ensayos distintos. En primer lugar, se analizó la migración del plásmido pIRES2-EGFP en presencia de cantidades crecientes del derivado de oro(I), utilizándose cisplatino como control positivo. Mientras que el complejo de platino sí afectó a la movilidad del plásmido en el gel de agarosa, ninguna de las concentraciones de **1a** evaluadas causaron este efecto (Figura 38A). No obstante, este resultado preliminar solamente indica que el complejo carece de afinidad por el ADN, pero no necesariamente implica que en el

interior celular no vaya a ser capaz de inducir daños en el material genético de forma indirecta, como se ha observado por ejemplo que ocurre por exposición a nanopartículas de cobalto-cromio<sup>79,80</sup>. Por ello, se extrajo el ADN de células que habían sido incubadas durante 24h con el complejo y se comparó con el de un control negativo (células incubadas con una cantidad equivalente de DMSO). Aunque no se obtuvieron diferencias significativas en cuanto a la movilidad (Figura 38B), lo que sugería que, efectivamente, el complejo no interaccionaba directamente con el ADN, resultó sorprendente la ausencia del patrón en escalera característico de la apoptosis, anteriormente mencionado como uno de los marcadores típicos de esta clase de muerte celular<sup>58</sup>.

Teniendo en cuenta que hasta el momento se habían encontrado varios marcadores apoptóticos (Figuras 33, 34, 35 y 36), este resultado resultaba llamativo. Se repitió la extracción de ADN, aunque en lugar de **1a** en esta ocasión se incubó a las células Caco-2 con dos conocidos inductores de apoptosis, la estaurosporina<sup>81</sup> y el butirato<sup>82</sup>. De nuevo, se obtuvo una única banda en lugar del patrón en escalera esperable (Figura 38C). Por lo tanto, los datos recopilados hasta el momento sugieren que la apoptosis podría tener lugar en ausencia de este marcador.



**Figura 38.** Análisis de la capacidad de interacción de **1a** con el ADN. A) Interacción entre el plásmido pIRES2-EGFP (carril 1) con **1a** en una proporción 1:2 (carril 2), 1:1 (carril 3) o 1:0,5 (carril 4), así como con el cisplatino como control positivo (proporción 1:2 carril 5, 1:1 carril 6, 1:0,5 carril 7 y 1:0,25 carril 8). Marcador de peso molecular en el carril 9. B) ADN extraído de células Caco-2 tras 24h de exposición a DMSO (control negativo, 2  $\mu$ M; carril 1) o **1a** en una cantidad equivalente a su IC<sub>50</sub> (carriles 2 y 3). C) ADN extraído de células Caco-2 tras 24h de exposición a los controles positivos estaurosporina (1  $\mu$ M, 1h; carril 1) y butirato (20 mM, 16h; carril 2).

Aunque tradicionalmente se ha considerado al patrón en escalera como uno de los marcadores más fiables de la apoptosis, existen evidencias que muestran que los cambios morfológicos que se utilizan para detectar la apoptosis (encogimiento celular y formación de cuerpos apoptóticos<sup>57,58</sup>) son un paso previo a la fragmentación del ADN. Además, existen algunas moléculas, como por ejemplo compuestos de cinc, que son capaces de inducir apoptosis pero también de inhibir a las endonucleasas que llevan a

cabo la fragmentación del ADN, por lo que en algunas situaciones es posible obtener todos los marcadores típicos de apoptosis salvo el patrón en escalera<sup>83</sup>. En nuestro caso particular, la inhibición de las endonucleasas por parte de **1a** es poco probable, dado que los controles positivos mostraron exactamente el mismo efecto. Estos datos podrían apuntar a una característica propia de la línea celular, ya que otros autores tampoco han encontrado el patrón en escalera al incubar células Caco-2 con compuestos citotóxicos, aunque sí se observaron marcadores morfológicos de apoptosis<sup>84</sup>. De cualquier manera, los datos obtenidos hasta el momento permiten descartar la posibilidad de que **1a** interaccionase con el ADN como parte de su mecanismo de acción, lo que podría implicar que su uso clínico fuese más seguro que el del cisplatino. Al no compartir mecanismo de acción, resulta además plausible suponer que este derivado de oro(I) no presentase resistencias cruzadas con el fármaco de platino, lo que explicaría los resultados previamente obtenidos por otros miembros del grupo de investigación sobre el efecto antiproliferativo de este complejo en la línea de cáncer de ovario A2780/R<sup>28</sup>. Por lo tanto, [Au(C≡CPh)(PTA)] (**1a**) podría ser de gran interés en tumores resistentes tanto al cisplatino como a sus análogos, lo que incluiría al oxaliplatino; esto podría ser especialmente relevante para el tratamiento de tumores colorrectales resistentes a los cócteles de fármacos que incluyen oxaliplatino.

Tras concluir que **1a** era capaz de inducir la muerte de las células por apoptosis, existiendo además numerosas evidencias a favor de que activase la vía intrínseca, y haber descartado la interacción con el ADN como principal mecanismo de acción, se planteó a la tiorredoxina reductasa (TrxR) como diana molecular más probable, dada la afinidad natural del oro por su residuo de selenocisteína<sup>85,86</sup>. El abordaje de la posible interacción entre **1a** y la TrxR siguió un planteamiento similar al del ensayo anterior. En primer lugar, se realizó una determinación de la actividad enzimática fuera del medio extracelular, incubando una enzima recombinante con dos concentraciones del complejo (su IC<sub>50</sub> y el doble del mismo). Con esta aproximación se pretendía analizar una posible inhibición de tipo directo, es decir, mediada por una interacción complejo metálico-enzima. De acuerdo con los resultados obtenidos (Tabla 8), es posible afirmar que **1a**, en efecto, puede inhibir la actividad de la tiorredoxina reductasa de forma directa, siendo este efecto dependiente de la concentración del mismo. A continuación, se validaron estos resultados en el medio intracelular. Para ello, se incubaron células Caco-2 durante 24h con el complejo y se midió la actividad reductasa del lisado celular. De nuevo, se observó una reducción en la actividad enzimática de la TrxR, lo que concuerda con los datos obtenidos previamente y valida la hipótesis de que **1a** podría ejercer su efecto antitumoral mediante el bloqueo de la actividad de la tiorredoxina reductasa, al menos en parte (Tabla 8). Finalmente, se decidió determinar si el complejo metálico era capaz de inhibir selectivamente a la TrxR o si bien podría bloquear a otras enzimas redox. Se escogió a la glutatión reductasa (GR) como modelo de enzima redox no selenoproteína, partiendo de la base de que un derivado de oro(I) debería sentir una menor afinidad por ella que por la TrxR dada la ausencia del residuo selenocisteína<sup>36,87</sup>.

Efectivamente, los resultados mostrados en la Tabla 8 revelan que la incubación con **1a** no solo no reduce la actividad de la GR, sino que incluso la aumenta ligeramente, aunque de forma no significativa. Este aumento puede ser consecuencia del antes mencionado papel del sistema glutatión-glutarredoxina como “custodio” de la actividad de la tiorredoxina ante una disfunción de la TrxR (ver apartado 1.5, pág. 64; Figura 20).

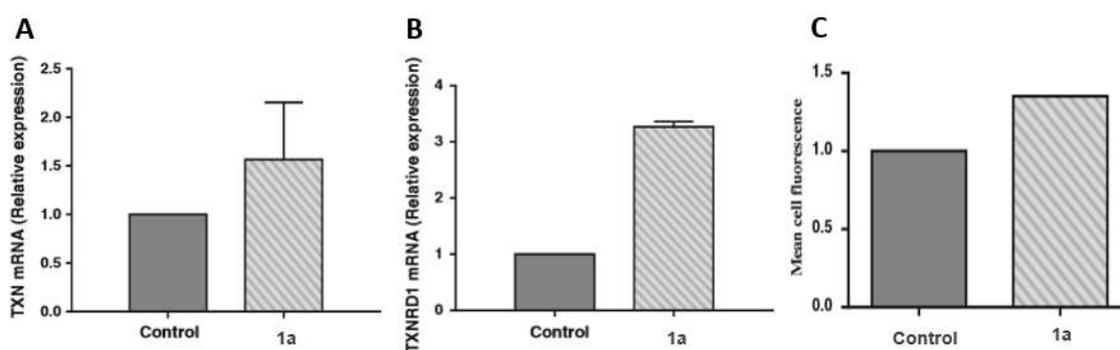
**Tabla 8.** Medida de actividades de enzimas redox como potenciales dianas terapéuticas **1a**. Se incluyen resultados obtenidos con enzimas recombinantes y procedentes de lisados celulares (células Caco-2 tras 24h de incubación con el complejo). \* $p < 0,05$  vs control negativo. \*\* $p < 0,005$  vs control negativo.

Concentración <b>1a</b> ( $\mu\text{M}$ )	Enzima	Actividad enzimática ( $\mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ )	% actividad enzimática
<b>0 (control negativo)</b>	TrxR (recombinante)	0,30 $\pm$ 0,03	100
<b>2,65</b>	TrxR (recombinante)	0,22 $\pm$ 0,03*	72,63
<b>5,30</b>	TrxR (recombinante)	0,19 $\pm$ 0,02**	64,86
<b>0 (control negativo)</b>	TrxR (cél. Caco-2)	0,15 $\pm$ 0,03	100
<b>2,65</b>	TrxR (cél. Caco-2)	0,13 $\pm$ 0,01*	85,84
<b>0 (control negativo)</b>	GR (cél. Caco-2)	1,55 $\pm$ 0,33	100
<b>2,65</b>	GR (cél. Caco-2)	1,75 $\pm$ 0,53	112,67

Si bien se ha comprobado que **1a** es capaz de realizar un bloqueo directo de la actividad de la TrxR, con los datos obtenidos hasta el momento no se puede descartar que también lleve a cabo una inhibición indirecta de la enzima, esto es, una reducción de su nivel de expresión. Chen *et al.* observaron que el tratamiento con auranofin podía disminuir los niveles de expresión de la isoforma mitocondrial de la tiorredoxina reductasa<sup>88</sup>, de modo que inspirados por sus resultados se decidió analizar los niveles de expresión de la tiorredoxina y la TrxR de células Caco-2 tras 24h de exposición al complejo metálico. Las Figuras 39A y 39B muestran que la expresión de ambos genes *TXN* y *TXNRD1* se incrementaba en respuesta al tratamiento. Estos resultados permitieron descartar que **1a** llevase a cabo una inhibición indirecta de cualquiera de las dos enzimas, puesto que ocurría justo lo opuesto.

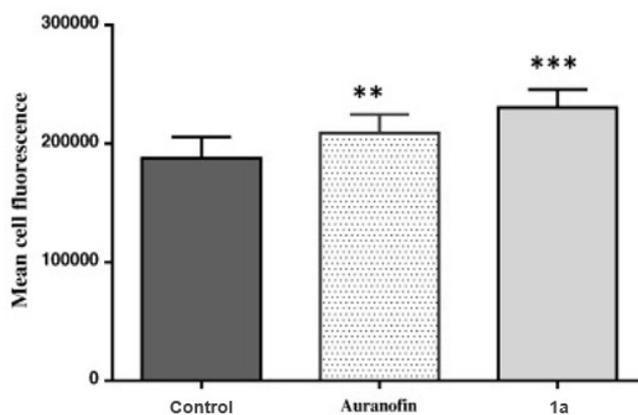
Tras obtenerse estos datos, se determinó la cantidad de la enzima TrxR presente en el interior celular mediante citometría de flujo, observándose un incremento efectivo en respuesta a la sobreexpresión del gen (Figura 39C). Este aumento de la expresión génica, que se traduce a su vez en una mayor cantidad de proteína, podría ser la respuesta de la célula al bloqueo farmacológico de la TrxR, un pre-mecanismo de

resistencia a la terapia. No obstante, de acuerdo con los datos obtenidos, esta estrategia no consigue evitar la muerte celular. Sin embargo, la capacidad de la célula de sobreexpresar tanto la TrxR como la tiorredoxina, así como el hecho de que se incremente la actividad de la GR (Tabla 8), debe ser tenido en consideración, ya que una terapia prolongada podría dar lugar a una resistencia efectiva a través de la combinación de estos tres elementos. Futuros experimentos en modelos animales deberán tener en cuenta estos datos para tratar de hacer más efectiva la terapia usando los complejos de oro junto a bloqueantes del sistema glutatión-glutarredoxina para quizá aumentar las posibilidades de éxito del tratamiento, ya que, según se desarrollará más adelante, la inhibición concomitante de TrxR y GR implica una mayor probabilidad de éxito terapéutico<sup>89</sup>.



**Figura 39.** Efecto de 24h de tratamiento con **1a** ( $IC_{50}$ ) sobre la expresión génica de células Caco-2. A) Determinación del nivel de expresión del gen *TXN*. B) Determinación del nivel de expresión del gen *TXNRD1*. C) Medida de la cantidad de proteína TrxR en el interior celular.

Dado el papel clave de la TrxR en el mantenimiento de la homeostasis redox, al inhibir su actividad mediante la incubación con **1a** era esperable un incremento en los niveles de especies reactivas de oxígeno. De acuerdo con investigaciones previas respecto al mecanismo de acción del auranofin, la ruptura del equilibrio redox estaría directamente relacionada con la capacidad del compuesto de inducir la muerte de la célula tumoral<sup>15,90-92</sup>. Por lo tanto, se midieron los niveles de ROS en células Caco-2 tras 1h de exposición a **1a** y a auranofin como control positivo. Se observó un aumento significativo ( $p < 0,001$ ) con respecto al control negativo (Figura 40), lo que permitió concluir que, efectivamente, el bloqueo de la TrxR se tradujo en una ruptura del equilibrio redox que podría ser una de las causas de la inducción de apoptosis.

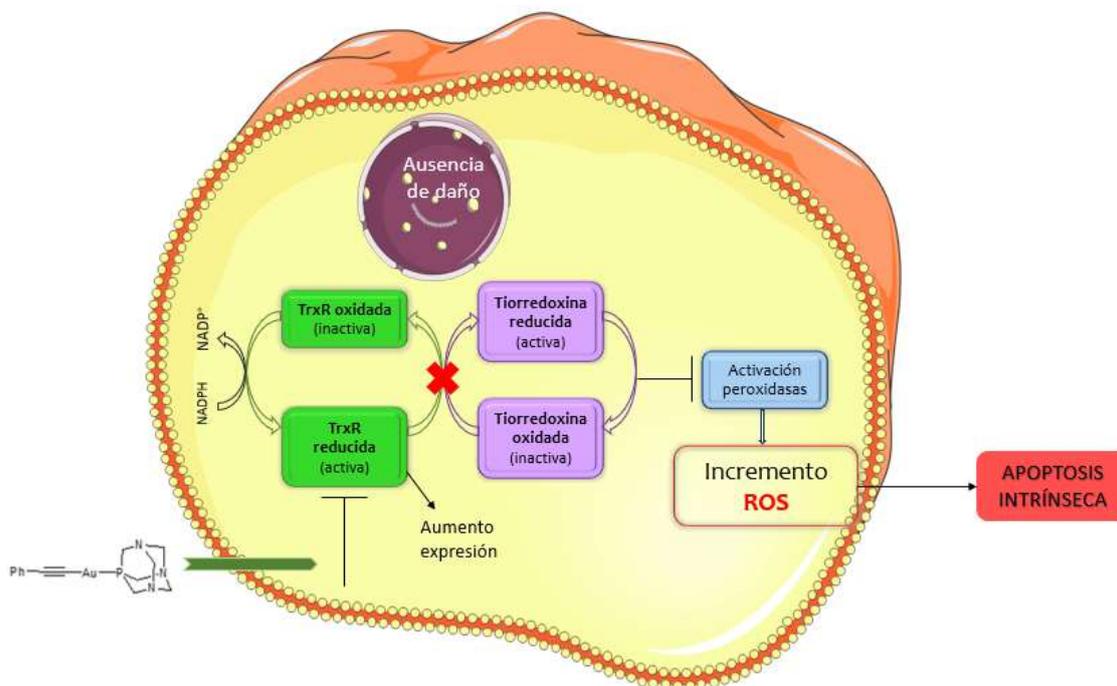


**Figura 40.** Medida de los niveles de ROS en células Caco-2 tras 1h de exposición a **1a** ( $IC_{50}$ ) o a un control positivo (auranofin,  $1,80 \mu M$ ). Los resultados se expresan como valores promedio de unidades arbitrarias de fluorescencia. \*\* $p < 0,005$  vs control negativo. \*\*\* $p < 0,001$  vs control negativo.

Este incremento en los niveles de ROS también podría ser la razón por la que se observa un arresto en la fase  $G_2/M$  del ciclo celular (Figura 37). Wang *et al.* observaron que una alta producción de ROS tenía como consecuencia la activación de Chk1/2, una proteína que bloquea la acción de Cdc25C, la cual a su vez promueve el paso de la fase  $G_2$  a la mitosis<sup>93</sup>. Por otra parte, de acuerdo con los resultados obtenidos por Kang *et al.*, la activación de la proteína p38 en respuesta a un incremento en los niveles de ROS está a su vez relacionada con un cese del ciclo en la fase  $G_2/M$ <sup>94</sup>. En este sentido, nuestros resultados podrían sugerir que los elevados niveles de ROS causados a consecuencia del tratamiento con el complejo metálico causan graves daños en el ADN durante la fase  $G_2$  del ciclo, lo que provocaría que el punto de control que determina la entrada en la mitosis iniciase la apoptosis para mantener la integridad del genoma. Así mismo, esta producción aberrante de ROS también podría estar relacionada con la inducción de apoptosis a través de una segunda vía, dado que la activación de la proteína p38 también está relacionada con un incremento en la tasa de activación de la caspasa <sup>93,94</sup>. No obstante, en nuestro caso concreto esto es poco probable, dada la escasa activación de esta caspasa según se puede apreciar en la Figura 36A.

Por último, el exceso de ROS podría ser también responsable del efecto observado sobre la expresión génica de los miembros del sistema tiorredoxina (Figura 39). En presencia de altas cantidades de ROS, se produce una estabilización del mRNA que codifica a la TrxR para así contribuir a una mayor producción de esta enzima y poder evitar la muerte desencadenada por una cantidad aberrante de ROS<sup>95</sup>. Esto podría explicar por qué el aumento de expresión del gen *TXNRD1* (Figura 39B) se traduce en un incremento efectivo de la cantidad de TrxR en el medio intracelular (Figura 39C). Esta explicación también es aplicable al aumento de expresión del gen *TXN*<sup>96</sup>.

Así, se da por concluido el estudio preliminar acerca del uso potencial del complejo **1a** con fines quimioterapéuticos frente al CRC. Su mecanismo de acción se esquematiza en la Figura 41.



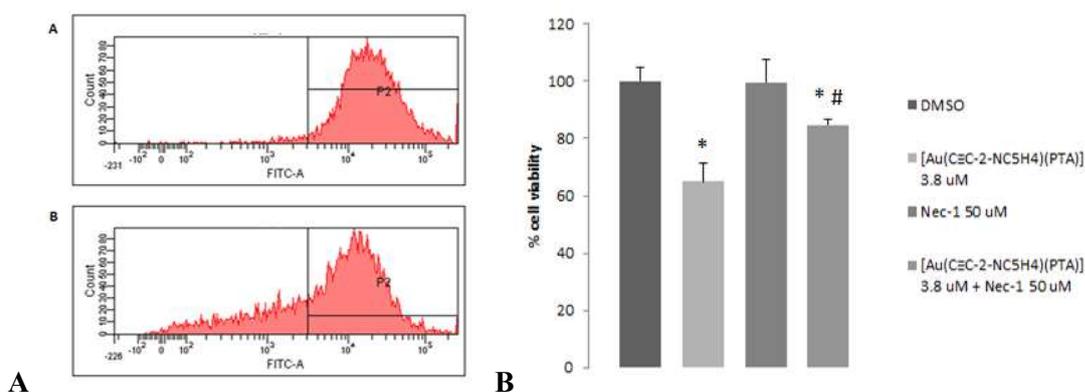
**Figura 41.** Representación esquemática del mecanismo de acción del complejo **1a** sobre células Caco-2.

Se retomó entonces el análisis de las propiedades antiproliferativas del complejo [Au(C≡C-2-NC<sub>5</sub>H<sub>4</sub>)(PTA)] (**2a**). El escaso aumento en los niveles de apoptosis y necrosis de acuerdo con los datos de citometría de flujo (Figura 32), unido a la ausencia de activación de caspasas y el fenotipo necrótico (Figura 33) nos indujeron a sospechar que este derivado podría inducir necroptosis en lugar de apoptosis.

Además de las ya citadas evidencias, es pertinente mencionar una más. A la hora de detectar células necroptóticas mediante citometría de flujo, la doble tinción con anexina V-FITC y yoduro de propidio posee una importante limitación. Ya que durante la necroptosis no se produce la traslocación de la fosfatidil serina a la cara externa de la membrana plasmática, podría caerse en el error de suponer que las células necroptóticas darían un marcaje negativo para anexina V-FITC. No obstante, en la práctica las células en apoptosis tardía y las necroptóticas pueden confundirse. Debe tenerse en cuenta que uno de los primeros eventos de la necroptosis es la ruptura de la membrana plasmática debido a la excesiva hinchazón celular, lo que va a permitir la entrada en la célula de ambas sondas, de forma similar a lo que les ocurre a las células en apoptosis tardía<sup>97</sup>. De ahí que sea necesario medir otros parámetros, como el tamaño de las células, o incluir marcadores específicos de necroptosis en la mezcla de sondas para poder diferenciar ambas poblaciones. En nuestro caso concreto, el aumento de la

población celular en apoptosis tardía respecto al control negativo (Figura 32C) podría tratarse, en realidad, de células necroptóticas mal clasificadas.

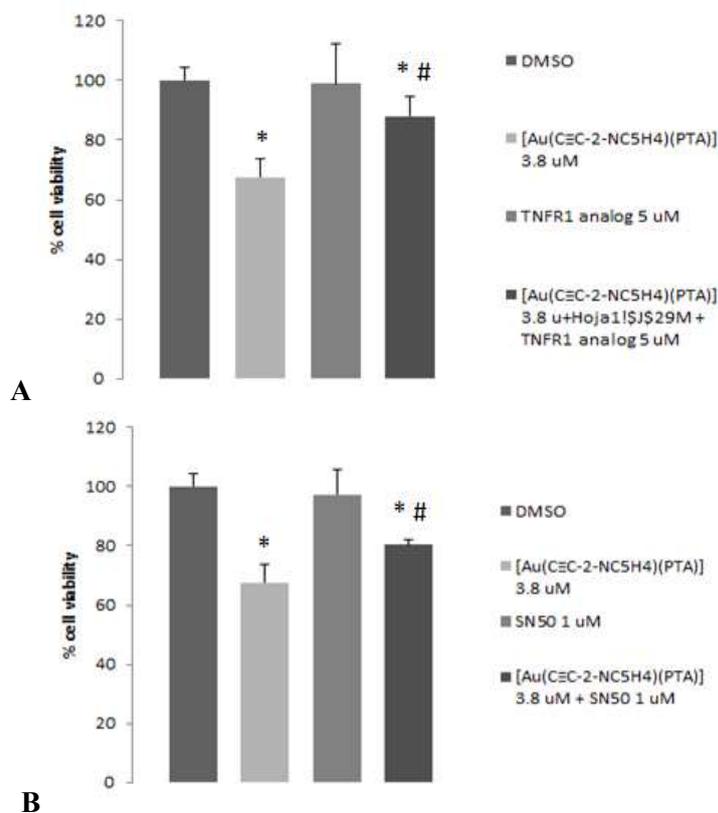
Se comenzó el estudio de marcadores necroptóticos mediante el análisis de la tasa de activación de la proteína RIP-1, que en el apartado 1.2 se mencionaba como una de las principales responsables de este tipo de muerte (ver Figura 9; pág. 41) tras incubación un cultivo de células Caco-2 con **2a** durante 24h. Se observó un aumento de 8,5 veces en su nivel de expresión (Figura 42A), lo cual parecía confirmar su implicación en el tipo de muerte inducida por el complejo metálico. Para confirmarlo, se pre-incubó el cultivo con el inhibidor específico de RIP-1 necrostatina-1 (Nec-1). De acuerdo con la Figura 42B, el pre-tratamiento con Nec-1 aumentó significativamente la viabilidad celular en comparación con aquellas que solamente fueron incubadas con el complejo **2a** ( $p < 0,05$ ), si bien no se consiguió reducir por completo el efecto antiproliferativo del complejo de oro.



**Figura 42.** Análisis de la implicación de RIP-1 en la muerte celular inducida tras 24h de incubación con **2a** (IC<sub>50</sub>). A) Niveles de expresión de la proteína RIP-1 tras 24h de incubación con DMSO (panel superior; control negativo, 2 μM) o **2a** (panel inferior). B) Estudio del efecto del inhibidor de RIP-1 necrostatina-1 (50 μM, 1h) sobre la capacidad antiproliferativa de **2a**. \* $p < 0,05$  respecto al control negativo. # $p < 0,05$  respecto a células tratadas con **2a**.

Una vez demostrada la implicación de RIP-1 en la muerte celular inducida por **2a**, se amplió el estudio utilizando dos inhibidores de puntos clave de la ruta necroptótica mejor caracterizada: aquella que depende de la unión entre TNF- $\alpha$  y su receptor TNFR1 (ver apartado 1.2, pág. 41; Figura 9). En primer lugar, se recurrió a un análogo del TNFR1 que impide su unión con TNF- $\alpha$ , observándose que el pre-tratamiento con este compuesto tenía un efecto similar al previamente encontrado con Nec-1 (Figura 43A). A continuación, se utilizó el compuesto SN50, capaz de bloquear la traslocación al núcleo de NF- $\kappa$ B y, por consiguiente, su efecto sobre la expresión de diversos genes relacionados con la expresión de citoquinas pro-inflamatorias entre las que se incluye el propio TNF- $\alpha$ , y se encontró de nuevo que remitía el efecto antiproliferativo de **2a**

(Figura 43B). Por lo tanto, los resultados mostrados en las Figuras 42 y 43, sugieren que **2a** induce la ruta necroptótica dependiente de TNF- $\alpha$ .



**Figura 43.** Efecto de inhibidores de puntos clave de la necroptosis dependiente de TNF- $\alpha$  sobre la capacidad antiproliferativa de **2a** ( $IC_{50}$ ) tras 24h de incubación. A) Pre-incubación con un análogo de TNFR1 (5  $\mu$ M, 1 h). \* $p < 0,05$  respecto al control negativo. # $p < 0,05$  respecto a células tratadas con **2a**. B) Pre-incubación con SN50 (1  $\mu$ M, 1 h). \* $p < 0,05$  respecto al control negativo. # $p < 0,05$  respecto a células tratadas con **2a**.

No obstante, según puede observarse en las Figuras 42B y 43 ninguno de los tres inhibidores utilizados dio lugar a una recuperación de la viabilidad celular comparable a la del control negativo, es decir, no se produjo en ningún caso una anulación del efecto antiproliferativo de **2a**. Kim *et al.*<sup>98</sup> observaron que el pre-tratamiento con Nec-1 tampoco pudo bloquear por completo la necroptosis causada por un compuesto natural sobre células NSCLC, un modelo de cáncer de pulmón de células no pequeñas. Cui *et al.*<sup>99</sup> obtuvieron resultados similares al inducir necroptosis sobre células de cáncer de próstata (línea PC-3) con selenito. En este caso particular, sí lograron una protección completa al recurrir a un inhibidor selectivo de la RIP-3. Tomando estos dos trabajos en consideración, es posible deducir que RIP-3 puede tener un papel mucho más relevante que RIP-1 en cuanto al control del proceso necroptótico, a pesar de que forzosamente deba ser activada por RIP-1, lo que se ve apoyado por los resultados obtenidos por otros investigadores acerca de su implicación crucial en la necroptosis mediada por TNF- $\alpha$ <sup>100</sup>. En este sentido, se podría quizá establecer una comparación

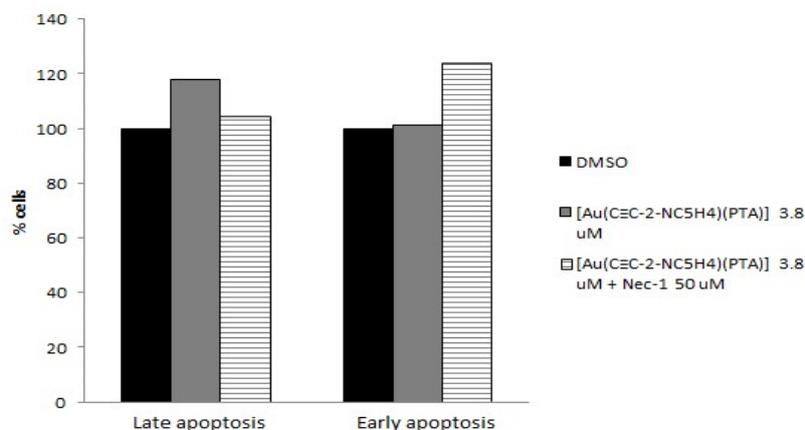
entre RIP-3 y las caspasas ejecutoras en cuanto a su papel determinante para el proceso de muerte celular.

Dado que en el estudio del efecto de **2a** nos hemos limitado a analizar el efecto de RIP-1 utilizando al inhibidor selectivo Nec-1, la hipótesis acerca del mayor peso de RIP-3 en este proceso no puede ser confirmada ni descartada por el momento. Debe tenerse en cuenta, además, que no existen datos hasta el momento acerca del papel de RIP-3 en la inducción de necroptosis sobre la línea Caco-2, de modo que son necesarios más datos relativos a este modelo tumoral para esclarecer el porqué de los datos obtenidos hasta el momento.

Al margen de esta posible relevancia de RIP-3, existe una segunda hipótesis que podría explicar los resultados mostrados en las Figuras 42B y 43, fundamentada en la estrecha relación entre los diferentes tipos de muerte celular. Anteriormente, se ha discutido acerca del papel de la necroptosis como mecanismo de emergencia en caso de que la apoptosis se encuentre bloqueada<sup>101</sup>. Se han encontrado también evidencias de que puede suceder a la inversa, es decir, que el bloqueo de la necroptosis tenga como consecuencia un aumento de la apoptosis. Han *et al.*<sup>102</sup> observaron que el uso de Nec-1 podía causar un aumento de la apoptosis en dos modelos de leucemia (líneas K562 y HL60) tratadas con el compuesto natural shikonina. También se han dado casos en los que un único compuesto puede inducir al mismo tiempo apoptosis y necroptosis, de acuerdo con la investigación realizada por Khorsandi *et al.*<sup>103</sup> acerca del efecto antitumoral de la quercetina sobre células MCF-7 (carcinoma de mama). Los autores demostraron que, tanto la inhibición de las caspasas mediada por zVAD (un conocido inhibidor de la apoptosis) como el bloqueo de la necroptosis causado por Nec-1 promovían una recuperación parcial de la viabilidad celular tras el tratamiento con quercetina. Observaron, además, que el uso de Nec-1 tenía como consecuencia inesperada un descenso en los niveles de expresión de BAX junto con un aumento en los de Bcl-2 en comparación con células tratadas únicamente con quercetina. Es decir, el bloqueo de la necroptosis podía tener un efecto anti-apoptótico como consecuencia, observándose que el uso de Nec-1 tenía un mayor efecto protector que el de z-VAD para la viabilidad del cultivo tratado con quercetina.

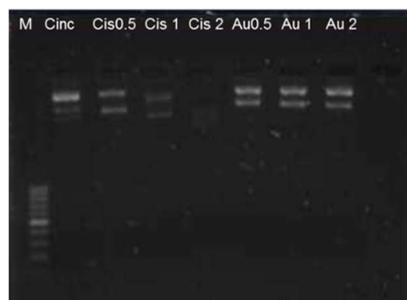
En vista de esta curiosa relación entre ambos tipos de muerte celular, consideramos interesante volver a analizar con la doble tinción anexina V-FITC y yoduro de propidio al cultivo de Caco-2 tras 24h de incubación con **2a**, aunque en esta ocasión tras una pre-incubación con Nec-1. Se obtuvo un incremento en el número de células en apoptosis temprana, concomitante con un descenso en la población en apoptosis tardía (Figura 44). De acuerdo con la suposición inicial de que las células en apoptosis tardía podrían ser células necroptóticas<sup>97</sup>, los resultados obtenidos sugieren que, al bloquear la necroptosis con Nec-1, los daños inducidos por **2a** son todavía incompatibles con la vida,

por lo que la muerte de la célula es inevitable y se induce apoptosis de manera alternativa.



**Figura 44.** Estudio de las poblaciones apoptóticas de un cultivo de células Caco-2 incubadas durante 24h con **2a** ( $IC_{50}$ ) en presencia o ausencia de un pre-tratamiento con Nec-1 (50  $\mu$ M, 1h).

Si bien las pruebas obtenidas hasta el momento parecen indicar que **2a** efectivamente induce la muerte por necroptosis como primera alternativa, todavía quedaba pendiente determinar el mecanismo molecular que desencadenaba esta respuesta. Además, dado el diferente comportamiento mostrado respecto a **1a**, no podía descartarse que todos los procesos descritos hasta el momento fuesen consecuencia de una interacción directa con el ADN. Esta hipótesis se sustentaba sobre el hecho de que, recientemente, se ha descubierto la capacidad del cisplatino para inducir necroptosis sobre algunas líneas celulares<sup>104</sup>. Además, otros autores han relacionado la inducción de daños sobre el ADN con la muerte por necroptosis<sup>105</sup>. Por tanto, se evaluó la capacidad de **2a** de interaccionar con el plásmido pIRES2-EGFP. Se utilizaron dos concentraciones distintas del complejo y al cisplatino como control positivo. La Figura 45 permite descartar la interacción directa entre el ADN y **2a**, lo que, además de sugerir que el derivado de oro podría ser menos tóxico que el cisplatino, algo que ya se había sospechado al calcular sus respectivos índices de selectividad (Tabla 5), da pie a continuar la búsqueda de su mecanismo de acción, presumiblemente más selectivo.

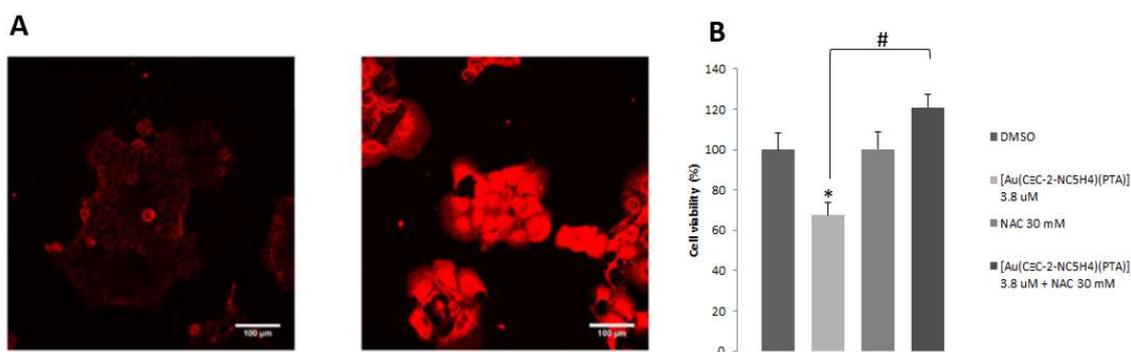


**Figura 45.** Interacción entre el plásmido pIRES2-EGFP (carril 2) con **2a** en una proporción complejo:plásmido de 0,5 (carril 6), 1 (carril 7) o 2 (carril 8), así como con cisplatino como control positivo (ratio 0,5 carril 3; ratio 1 carril 4; ratio 2 carril 5). Marcador de peso molecular en el carril 1.

Tras haber descartado una interacción directa con el ADN como responsable de la inducción de la necroptosis, pasamos a considerar una hipotética ruptura del equilibrio redox como causa de la misma. Existen numerosas referencias acerca del papel clave de las especies reactivas de oxígeno en esta clase de muerte celular. Se ha observado que la propia proteína RIP-1, una vez activada, podría inducir la producción de ROS al causar un descenso en los niveles de expresión de la enzima mitocondrial responsable de la conversión de ADP en ATP. Este aumento de ROS genera, a su vez, un bucle de retroalimentación que conduce a un mayor aumento de la actividad de la RIP-1<sup>106,107</sup>. También la activación de la RIP-3 puede intervenir en la ruptura de la homeostasis redox, ya que en su caso es capaz de activar a enzimas relacionadas con la glicólisis y la respiración aerobia. Al aumentar ambos procesos, se produce como consecuencia un exceso de ROS<sup>106,108</sup>, que presumiblemente contribuiría a mantener a la RIP-1 activada y funcional según lo descrito anteriormente, contribuyendo asimismo a la activación de la propia RIP-3. Si bien es cierto que estos datos no apuntan a la generación de ROS como principales responsables de la necroptosis, sí dejan patente su relevancia para que el proceso continúe. Una prueba más contundente acerca del papel de las ROS como inductores de este tipo de muerte la presentaron Yu *et al.*<sup>109</sup>, al detallar la acción antitumoral de la citronela sobre un modelo de cáncer de pulmón humano (células NC1-H1299). En el citado trabajo, los autores observaron dos picos en la producción de ROS: el primero de ellos se daba antes de finalizar las 6h de incubación, por lo que lo atribuyeron al efecto directo de la citronela, mientras que el segundo pico se daba pasadas 12h de tratamiento y lo atribuyeron al bucle de retroalimentación, es decir, al proceso necroptótico en sí.

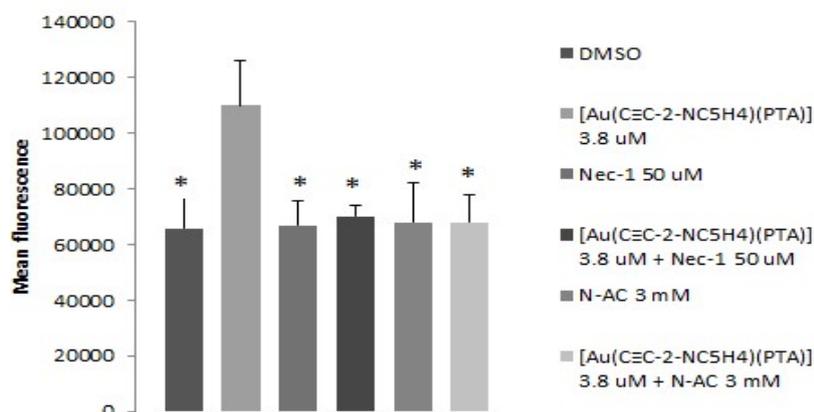
Por todo ello, se analizaron los niveles de ROS en células Caco-2 tras 1h de incubación con **2a**. Se utilizó la sonda fluorescente *CellROX® Deep Red Reagent* y microscopía de fluorescencia. La Figura 46A muestra un notable aumento de la fluorescencia, que se corresponde con un incremento del nivel intracelular de ROS en respuesta al tratamiento con el derivado metálico. Para confirmar que este hecho guardaba relación con la muerte celular, se analizó la viabilidad del cultivo tras un pre-tratamiento con el

antioxidante N-acetil-cisteína (NAC). El uso de este compuesto sí revirtió por completo el efecto del complejo metálico sobre la muerte del cultivo (Figura 46B), lo que no se había conseguido con ninguno de los inhibidores específicos de la necroptosis utilizados previamente (Figuras 42B y 43). Esto demuestra el papel central de la producción de ROS en la muerte celular inducida por **2a**.



**Figura 46.** Influencia de **2a** sobre la producción de ROS. A) Análisis de la cantidad total de ROS en el interior celular tras 1h de incubación con DMSO (panel izquierdo; control negativo, 2 μM) o **2a** (IC<sub>50</sub>) (panel derecho) utilizando la sonda fluorescente *CellROX® Deep Red Reagent*. B) Influencia de la pre-incubación con NAC (30 mM, 1h) sobre la viabilidad celular tras 24h de incubación con **2a** (IC<sub>50</sub>). \*p<0,05 vs control negativo. #p<0,05 vs **2a**.

Una vez demostrado el papel esencial de la inducción de estrés oxidativo para el efecto antiproliferativo de [Au(C≡C-2-NC<sub>5</sub>H<sub>4</sub>)](PTA) (**2a**), se decidió estudiar el potencial de RIP-1 en esta producción de ROS, ya que de acuerdo con los trabajos anteriormente mencionados la activación de esta proteína puede tener como consecuencia un aumento en los niveles de especies reactivas de oxígeno<sup>106–108</sup>. Se determinaron los niveles de ROS tras una pre-incubación con Nec-1 y se encontró que, efectivamente, la inhibición de RIP-1 promovía un descenso en los niveles de ROS, comparable tanto al del control negativo como al utilizar NAC (Figura 47). Estos resultados son similares a los obtenidos por Yu *et al.*<sup>109</sup> en relación al pico de ROS obtenido una vez se activaba la maquinaria necroptótica, y dejan constancia una vez más del papel de RIP-1 en la generación de ROS, necesaria a su vez para el bucle de retroalimentación ROS-RIP-1 que induce la formación del necrosoma y la consiguiente muerte celular vía necroptosis.



**Figura 47.** Efecto de la pre-incubación con Nec-1 sobre la producción de ROS inducida por 24h de tratamiento con **2a** (IC<sub>50</sub>) sobre células Caco-2. \*p<0,05 vs control negativo.

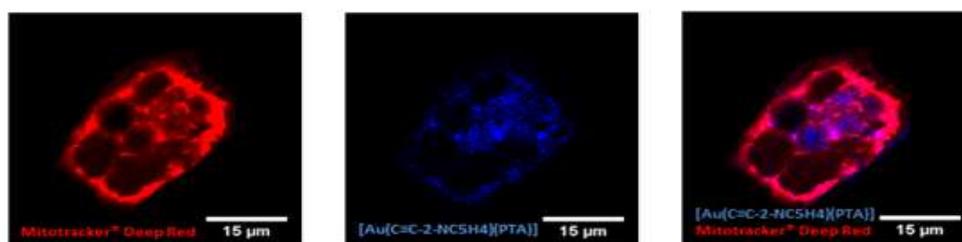
Puesto que el incremento en los niveles de ROS es el primer punto en común entre los complejos **1a** y **2a**, nos planteamos como hipótesis que **2a** fuese igualmente capaz de bloquear a la tiorredoxina reductasa y causar así la ruptura del equilibrio redox, tal como se había descrito previamente para su análogo (Tabla 8, Figura 39). Esta hipótesis podría verse reforzada por los descubrimientos de Tsuchiya *et al.*<sup>101</sup> y Li *et al.*<sup>111</sup> acerca de otros agentes quimioterapéuticos capaces de inhibir a la TrxR e inducir necroptosis como consecuencia; resulta especialmente relevante el último artículo mencionado, puesto que es el único, al margen de nuestro presente trabajo<sup>112</sup>, que ha descrito la capacidad de un complejo de oro(I), en concreto el auranofin, de inducir necroptosis sobre un modelo tumoral<sup>111</sup>.

Para estudiar la posible interacción **2a**-tiorredoxina reductasa, se incubó durante 24h un cultivo de células Caco-2 con el derivado y se midió la actividad TrxR del lisado celular. En este caso, no obstante, los resultados encontrados no guardaban ninguna relación con los previamente obtenidos tras el tratamiento con **1a** (Tabla 8), puesto que no se obtuvieron cambios significativos respecto al control negativo. De igual manera, se analizó la actividad de la proteína redox glutatión reductasa tras la incubación con **2a**, enzima cuya actividad tampoco se vio modificada en respuesta al tratamiento. Estos resultados se recogen en la Tabla 9. Por lo tanto, todos los datos obtenidos hasta el momento sugieren que el incremento de ROS mostrado en la Figura 46A, del que depende el efecto antiproliferativo de **2a** (Figura 46B), no parece estar causado por la inhibición de las enzimas redox tiorredoxina reductasa o glutatión reductasa.

**Tabla 9.** Medida de actividades de enzimas redox en lisados celulares como potenciales dianas terapéuticas de **2a** (24h de incubación con su IC<sub>50</sub>).

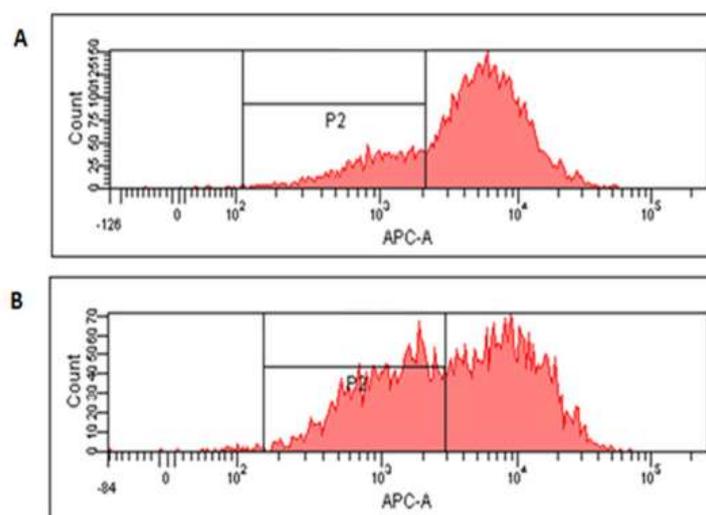
Concentración <b>2a</b> ( $\mu\text{M}$ )	Enzima	% actividad enzimática
<b>0 (control negativo)</b>	TrxR	100
<b>3,80</b>	TrxR	88,99 $\pm$ 6,77
<b>0 (control negativo)</b>	GR	100
<b>3,80</b>	GR	147,01 $\pm$ 43,13

Quedaba pendiente, sin embargo, una última cuestión, la de mayor relevancia: ¿por qué el tratamiento con **2a** promovía la inducción de necroptosis en lugar de apoptosis? Al principio del presente capítulo, se ha mencionado la existencia de interacciones aurofílicas que se tienden a establecer entre los centros metálicos de complejos de oro(I) diferentes. Esto hace que los alquinil derivados de oro(I) posean una cierta tendencia a formar estructuras supramoleculares, propiedad que se relaciona, además, con la capacidad luminiscente de esta clase de compuestos<sup>18</sup>. Tanto el complejo **1a** como el **2a** poseen propiedades luminiscentes<sup>28</sup>, lo que permitió estudiar la distribución de **2a** en el interior celular mediante microscopía de fluorescencia. La Figura 48 muestra que el compuesto se acumula preferentemente en la mitocondria. La entrada en este orgánulo sería posible debido al equilibrio entre lipofilidad e hidrofobicidad que posee este compuesto, según se ha comentado previamente (Tabla 4). Si bien es cierto que aquellos compuestos con un carácter más lipófilo y catiónico tienen la entrada más favorecida en la mitocondria<sup>113</sup>, también se ha mencionado que estos fármacos podrían resultar más tóxicos por no discriminar entre células tumorales y no tumorales. Pero dado que las células tumorales poseen una mayor cantidad de mitocondrias para responder a sus necesidades metabólicas, esto podría ser la razón de la selectividad de **2a**. Es decir, podría establecerse un paralelismo entre ambos complejos en cuanto a su posible selectividad: mientras que el primero actúa frente a una enzima sobreexpresada, el segundo afectaría a un orgánulo cuya proporción es mayor que en una célula normal.



**Figura 48.** Efecto de **2a** sobre la mitocondria de células Caco-2. Co-localización del complejo y la mitocondria realizada con el test de co-localización Van Steensel tras 3h de incubación. Panel izquierdo: mitocondrias teñidas con *Mitotracker*<sup>®</sup>*Deep Red*. Panel central: **2a** (10  $\mu\text{M}$ ). Panel derecho: co-localización.

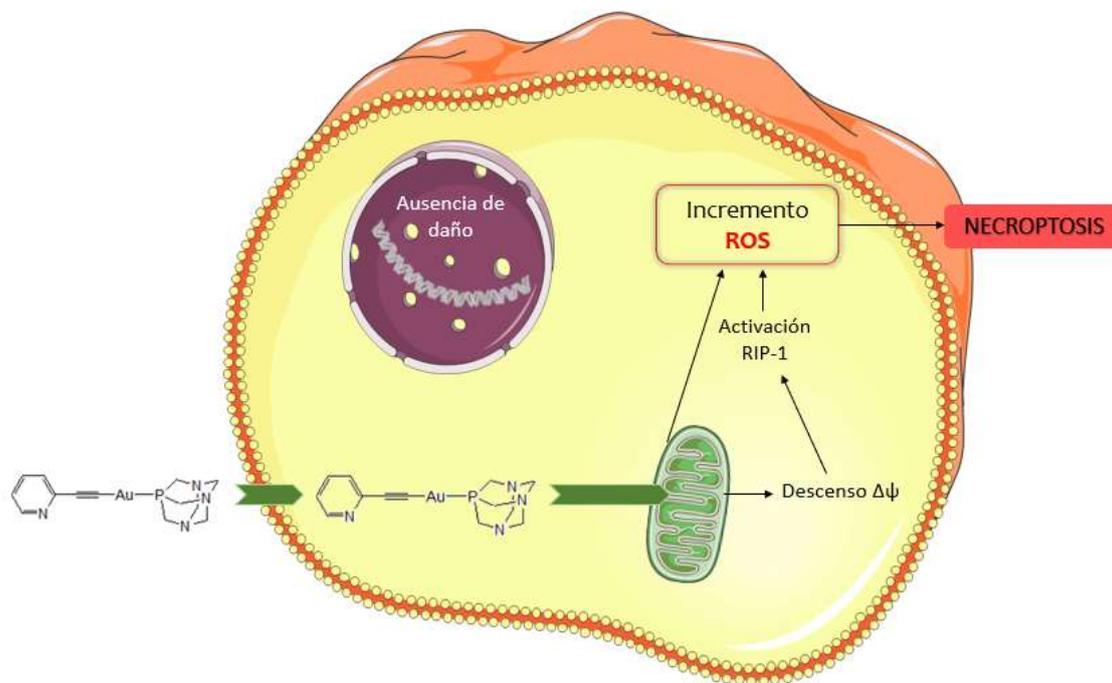
En cuanto al efecto de la entrada de **2a** en la mitocondria, se observó que, tras 24h de incubación, se producía un descenso en el potencial de membrana mitocondrial, lo que sugiere un fallo en el funcionamiento normal del orgánulo (Figura 49). De acuerdo con todos los datos obtenidos, la disfunción mitocondrial podría ser la causa por la que se induce necroptosis en lugar de apoptosis en respuesta al tratamiento con **2a**. La inducción de un descenso en el valor del  $\Delta\psi$  de las células Caco-2 tras 24h de tratamiento es otro punto en común que tienen **1a** y **2a**, aunque debe tenerse muy en cuenta que las causas que lo motivan son muy distintas en cada caso. Mientras que el tratamiento con **1a** inducía un desequilibrio de proteínas pro y anti-apoptóticas (Figura 34), lo que da lugar a la formación de poros en la membrana mitocondrial<sup>56</sup> (ver apartado 1.2), **2a** parece inducir una disfunción mitocondrial sin implicación de las proteínas pro-apoptóticas.



**Figura 49.** Análisis de la población celular con un  $\Delta\psi$  alterado (cuadrante P2) tras la 24h de incubación con DMSO (panel superior; control negativo, 2  $\mu$ M) o **2a** (IC<sub>50</sub>) (panel inferior).

Además de las interacciones aurofílicas, la presencia del nitrógeno adicional en el esqueleto alquino del complejo **2a** podría determinar la formación de interacciones adicionales entre compuestos vecinos que no se darían en el caso del complejo **1a**. A modo de ejemplo, ensayos realizados con un complejo análogo con el alquino 4-piridiletinil y con PTA altamente soluble en agua, revelaron que la formación de interacciones  $\pi$ - $\pi$  entre las unidades piridina daba lugar a la formación de largas fibras de gel en presencia de agua<sup>114</sup>. Si bien la formación de esta clase de interacciones  $\pi$ - $\pi$  entre la PTA y la unidad piridina de **2a** es menos probable que en el caso descrito, la posición del átomo de nitrógeno sí podría dar lugar a interacciones N-metal entre dos moléculas adyacentes, además de a contactos de enlace triple metal, tal como observaron Blanco *et al.*<sup>115</sup> De ser cierto, esto podría explicar la pérdida de afinidad con la TrxR al añadir un nitrógeno al fenilo del alquino en el complejo **1a** para dar lugar al análogo **2a**: existiría una mayor afinidad entre las moléculas del propio compuesto que

hacia la proteína. Esto permite suponer que, una vez en el interior mitocondrial, la formación de agregados de **2a** podría ser la responsable de la disfunción del orgánulo, causando la activación de la RIP-1 y el resto de efectos observados. El supuesto mecanismo de acción de este derivado se muestra a modo de resumen en la Figura 50.



**Figura 50.** Mecanismo de acción del complejo **2a** sobre células Caco-2.

Anteriormente, se ha mencionado que la inducción de necroptosis es una posible estrategia para inducir la destrucción de células tumorales resistentes a la apoptosis<sup>101</sup>. Esto dota al complejo  $[\text{Au}(\text{C}\equiv\text{C}-2\text{-NC}_5\text{H}_4)(\text{PTA})]$  (**2a**) de un interés del que carece el análogo  $[\text{Au}(\text{C}\equiv\text{CPh})(\text{PTA})]$  (**1a**), puesto que podría ser utilizado frente a tumores en estadios más avanzados o como agente quimioterapéutico de segunda elección frente a casos de recurrencia. Debido a este prometedor futuro, decidimos desarrollar un modelo tridimensional de cáncer de colon sobre el que evaluar el efecto del complejo **2a**.

El cultivo celular tradicional o en dos dimensiones, resulta de utilidad a la hora de determinar el posible mecanismo de acción de un futuro fármaco, y es el paso previo a los estudios en modelos animales porque, además, da una idea preliminar acerca de su posible toxicidad sobre los tejidos sanos como ya hemos comentado. No obstante, el cultivo en monocapa presenta serias limitaciones respecto a un tumor real, lo que implica que la gran mayoría de compuestos que son muy prometedores en este estadio carecen de efecto cuando son probados en modelos animales. Quizá la más relevante de estas limitaciones sea que no se reproducen con exactitud las interacciones célula-célula ni célula-matriz extracelular que se dan en el microambiente tumoral. En el caso de las células adherentes, este hecho es debido a que las células establecen interacciones principalmente con la superficie en la que crecen, y de manera secundaria,

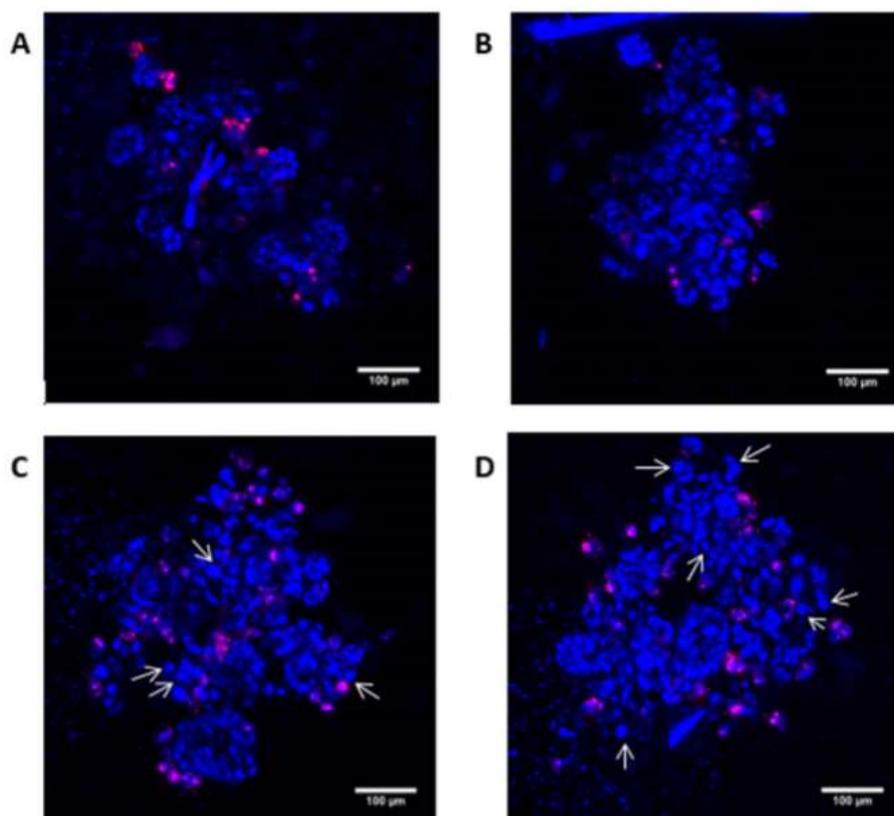
unas con otras. Existen métodos que evitan la agregación de las células sobre la superficie, forzando la interacción entre sí para dar lugar a estructuras en tres dimensiones que guardan mayor similitud con un tumor real que el cultivo en monocapa. Al establecerse las uniones célula-célula adecuadas, las células adquieren un patrón morfológico y funcional más próximo al que poseen en el tejido canceroso, lo que resulta de interés a la hora de evaluar el potencial terapéutico de un compuesto, incluso a nivel farmacodinámico<sup>116,117</sup>.

Uno de los modelos 3D mejor caracterizados por su utilidad en el diseño de fármacos antitumorales es el esferoide. En los esferoides, las células tumorales se organizan en capas diferentes para imitar su disposición en un tumor real. Esto hace que exista un gradiente de oxígeno, metabolitos, etc., que resulta de interés para analizar las propiedades farmacodinámicas del compuesto de estudio, ya que puede que tenga dificultades para alcanzar la zona central del esferoide. Por ello, es frecuente que las células de las capas externas reciban el daño, pero las internas queden protegidas. Un fármaco será más efectivo en cuanto a su capacidad de reducir el tamaño del esferoide al completo. Otra característica de interés de los esferoides es el distinto patrón de expresión génica que muestran las células respecto a cuando son cultivadas en monocapa. Se ha observado que se promueve la expresión de genes relacionados con la resistencia a la muerte celular o la pérdida de adherencia, ambos marcadores de la agresividad de un tumor. En resumidas cuentas, un esferoide resulta un modelo de gran interés para predecir el efecto de un posible fármaco antes de pasar a probarlo en un modelo animal. Como ventaja añadida, permitiría reducir la cantidad de animales de experimentación, ya que los fármacos que no resultasen prometedores en estos estudios serían descartados<sup>117,118</sup>.

Los modelos 3D presentan una última ventaja, y es que pueden incluir varios tipos de células, no solamente las tumorales sino también células epiteliales o incluso del sistema inmune, para así imitar la complejidad observada en un tumor real. En el caso concreto del cáncer colorrectal, esta clase de esferoides se han utilizado para evaluar la respuesta a distintos fármacos. Se ha observado, por ejemplo, que los esferoides resultantes del co-cultivo de células Caco-2 y fibroblastos asociados a tumor tiene como consecuencia un descenso de la efectividad del cóctel farmacológico compuesto por 5-fluorouracilo y oxaliplatino<sup>119</sup>. Por consiguiente, estos ensayos podrían ayudar a determinar las bases de la resistencia a la quimioterapia, así como a predecir la respuesta del microambiente tumoral a una nueva terapia.

Para realizar un estudio preliminar acerca del comportamiento del complejo **2a** frente a un modelo 3D, se diseñó un esferoide de células Caco-2 mezclando las células con una solución de metilcelulosa de alta viscosidad, de acuerdo con el modelo previamente descrito por Ayuso *et al.*<sup>120</sup>. Tras la formación del esferoide, fue incubado con concentraciones crecientes (3, 4 y 5  $\mu\text{M}$ ) de **2a** durante 24h y se realizó una doble

tinción con Hoechst 33342, para visualizar los núcleos, y yoduro de propidio, para poder observar aquellas células cuya membrana estuviese dañada, y que se consideran, por lo tanto, células que han sufrido necroptosis. Mediante microscopía de fluorescencia, se tomaron cuatro imágenes diferentes: esferoide sin tratar (Figura 51A), esferoide tratado con 3  $\mu\text{M}$  (Figura 51B), tratado con 4  $\mu\text{M}$  (Figura 51C) y tratado con 5  $\mu\text{M}$  de **2a** (Figura 51D). Comparando las cuatro imágenes, puede observarse un aumento de la tinción roja, correspondiente al yoduro de propidio, en respuesta al aumento de la concentración del complejo. De igual manera, al aumentar la concentración se incrementa también la proporción de células hinchadas. Esto sugiere que se podría estar iniciando la necroptosis, y que, debido a las características del cultivo 3D, el complejo metálico pueda tardar más tiempo en actuar, aunque presumiblemente el efecto final sería el mismo que el ya descrito al aumentar el tiempo de incubación. Por consiguiente, estos estudios preliminares sugieren que **2a** podría ser un interesante candidato a considerar para futuros ensayos en modelos animales.



**Figura 51.** Análisis del efecto de 24h de incubación con **2a** sobre un modelo 3D de cáncer de colon (esferoide de células Caco-2). A) Control negativo (esferoide sin tratar). B) 3  $\mu\text{M}$  **2a**. C) 4  $\mu\text{M}$  **2a**. D) 5  $\mu\text{M}$  **2a**. Azul: Hoechst 33342 (núcleos sanos). Rojo: yoduro de propidio (células dañadas). La hinchazón celular se indica con flechas blancas.

Los dos casos aquí desarrollados son un ejemplo perfecto acerca de la complejidad del diseño racional de fármacos. Conforme se han ido describiendo las particularidades de cada tipo tumoral, en cuanto a su perfil de expresión génica, marcadores moleculares

y demás, se ha incrementado el diseño de terapias dirigidas para tratar de aumentar la eficacia y selectividad de los nuevos fármacos. Esta estrategia se basa, por lo tanto, en un conocimiento profundo de las bases moleculares de cada tipo tumoral y busca el bloqueo de una diana en concreto. El mejor exponente de esta aproximación es el empleo de anticuerpos monoclonales. En el caso del cáncer colorrectal, destaca el uso del bevacizumab, que actúa como antagonista del factor de crecimiento del endotelio vascular (*Vascular Endothelial Growth Factor*; VEGF) y causa un bloqueo de la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir del tumor, así como una regresión de los ya existentes<sup>121</sup>. Este ejemplo muestra que, conociendo las características de un tumor, es posible dar con la terapia que resulte más efectiva. En este sentido, se están desarrollando nuevas terapias selectivas frente a CRC basándose en otras moléculas que, como ocurre en el caso del VEGF, resultan esenciales para el desarrollo del tumor. Puesto que la TrxR tiene un papel central en la prognosis de esta clase de cáncer, y siendo bien conocida la afinidad de los complejos de oro(I) por esta enzima, se diseñaron tres nuevos alquinil derivados de oro(I) para bloquear específicamente esta enzima y aumentar así la selectividad de la terapia frente a las células tumorales. Tras una evaluación inicial, se descartó el complejo  $[\text{Au}(\text{C}\equiv\text{CPh})(\text{DAPTA})]$  (**1b**) coordinado con la fosfina DAPTA por su menor efecto antiproliferativo, llegándose así a la conclusión de que el uso de la fosfina PTA podría resultar de mayor interés a la hora de diseñar nuevos complejos de oro(I) con fines antitumorales.

El complejo  $[\text{Au}(\text{C}\equiv\text{CPh})(\text{PTA})]$  (**1a**), por su parte, mostró gran afinidad por la TrxR y causó, en consecuencia, una ruptura del equilibrio redox que culminó con la muerte de la célula por apoptosis intrínseca. Es decir, se cumplió el objetivo inicial de diseñar un nuevo derivado de oro(I) que bloquease específicamente a esta enzima redox. Además, no se produjeron daños significativos sobre células diferenciadas, lo que sugería que podría actuar selectivamente frente a las células tumorales, el segundo e igualmente importante objetivo a batir. No obstante, al sustituir el grupo fenilo del esqueleto alquino por una molécula de piridina, la afinidad por la TrxR se perdió. En su lugar, el complejo  $[\text{Au}(\text{C}\equiv\text{C}-2\text{-NC}_5\text{H}_4)(\text{PTA})]$  (**2a**) causó la muerte por necroptosis, presumiblemente al formar agregados moleculares en el interior de la mitocondria que causen su destrucción, activando en consecuencia a la RIP-1.

Descubrir que un compuesto posee unas propiedades farmacológicas que inicialmente no se corresponden con las esperadas no es tan sorprendente como pueda parecer en un principio. Aparece así el concepto de *drug repurposing*, según el cual un fármaco que se utilizaba tradicionalmente frente a una enfermedad concreta resultó ser de utilidad frente a otra completamente distinta. El auranofin es un buen exponente acerca de la importancia del *drug repurposing*, puesto que sus propiedades antitumorales fueron descubiertas años después de que se aprobase su uso como fármaco contra la artritis reumatoide<sup>122</sup>. Esta lección nos enseña que, aunque un compuesto no muestre el efecto esperado, no debe descartarse a la ligera, ya que su

potencial terapéutico podría estar todavía por descubrir. En este sentido, se podría haber caído en el error de descartar al complejo **2a** al no obtenerse evidencias de inducción de apoptosis y ser su IC<sub>50</sub> ligeramente superior al de su análogo **1a**. No obstante, al haber continuado estudiando el efecto del complejo **2a** se ha descrito el primer caso de un derivado de oro(I) capaz de inducir necroptosis sobre un modelo de cáncer colorrectal. Las implicaciones de este descubrimiento podrían estar relacionadas con un futuro uso de este complejo o algún derivado suyo sobre modelos tumorales resistentes a apoptosis, cánceres agresivos y con mal pronóstico. Por consiguiente, en el apartado actual se ha hecho referencia a la importancia tanto del diseño racional como de la serendipia a la hora de desarrollar nuevos fármacos, lo que implica estar abiertos a la posibilidad de que los objetivos iniciales no se cumplan, pero se encuentren resultados de gran interés igualmente. En definitiva, se ha mostrado el potencial de los alquinil derivados de oro(I) en el tratamiento de los tumores colorrectales desde un punto de vista que se desconocía por el momento, poniendo el foco sobre su uso potencial en aquellos tumores que peor respondan a la terapia tradicional.

## REFERENCIAS

---

- (1) Atrián-Blasco, E.; Gascón, S.; Rodríguez-Yoldi, M. J.; Laguna, M.; Cerrada, E. Novel Gold(I) Thiolate Derivatives Synergistic with 5-Fluorouracil as Potential Selective Anticancer Agents in Colon Cancer. *Inorg. Chem.* **2017**, *56* (14), 8562–8579. <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.7b01370>.
- (2) Gutiérrez, A.; Gracia-Fleta, L.; Marzo, I.; Cativiela, C.; Laguna, A.; Gimeno, M. C. Gold(i) Thiolates Containing Amino Acid Moieties. Cytotoxicity and Structure-Activity Relationship Studies. *Dalt. Trans.* **2014**, *43* (45), 17054–17066. <https://doi.org/10.1039/c4dt02299h>.
- (3) Quero, J.; Cabello, S.; Fuertes, T.; Mármol, I.; Laplaza, R.; Polo, V.; Gimeno, M. C.; Rodríguez-Yoldi, M. J.; Cerrada, E. Proteasome versus Thioredoxin Reductase Competition as Possible Biological Targets in Antitumor Mixed Thiolate-Dithiocarbamate Gold(III) Complexes. *Inorg. Chem.* **2018**, *57* (17), 10832–10845. <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.8b01464>.
- (4) Tomasello, M. F.; Nardon, C.; Lanza, V.; Di Natale, G.; Pettenuzzo, N.; Salmaso, S.; Milardi, D.; Caliceti, P.; Pappalardo, G.; Fregona, D. New Comprehensive Studies of a Gold(III) Dithiocarbamate Complex with Proven Anticancer Properties: Aqueous Dissolution with Cyclodextrins, Pharmacokinetics and Upstream Inhibition of the Ubiquitin-Proteasome Pathway. *Eur. J. Med. Chem.* **2017**, *138*, 115–127. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.06.013>.
- (5) Yan, K.; Lok, C. N.; Bierla, K.; Che, C. M. Gold(i) Complex of N,N'-Disubstituted Cyclic Thiourea with in Vitro and in Vivo Anticancer Properties-Potent Tight-Binding Inhibition of Thioredoxin Reductase. *Chem. Commun.* **2010**, *46* (41), 7691–7693. <https://doi.org/10.1039/c0cc01058h>.
- (6) Lima, J. C.; Rodríguez, L. Phosphine-Gold(I) Compounds as Anticancer Agents: General Description and Mechanisms of Action. *Anticancer. Agents Med. Chem.* **2011**, *11*, 921–928.
- (7) Jortzik, E.; Farhadi, M.; Ahmadi, R.; Tóth, K.; Lohr, J.; Helmke, B. M.; Kehr, S.; Unterberg, A.; Ott, I.; Gust, R.; Deborde, V.; Davioud-Charvet, E.; Réau, R.; Becker, K.; Herold-Mende, C. Antiglioma Activity of GoPI-Sugar, a Novel Gold(I)–Phosphole Inhibitor: Chemical Synthesis, Mechanistic Studies, and Effectiveness in Vivo. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* **2014**, *1844* (8), 1415–1426. <https://doi.org/10.1016/J.BBAPAP.2014.01.006>.
- (8) Visbal, R.; Fernández-Moreira, V.; Marzo, I.; Laguna, A.; Gimeno, M. C. Cytotoxicity and Biodistribution Studies of Luminescent Au(i) and Ag(i) N-Heterocyclic Carbenes. Searching for New Biological Targets. *Dalt. Trans.* **2016**, *45* (38), 15026–15033. <https://doi.org/10.1039/c6dt02878k>.
- (9) 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*, 709–746. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.01.065>.
- (10) Johnson, A.; Marzo, I.; Gimeno, M. C. Ylide Ligands as Building Blocks for Bioactive Group 11 Metal Complexes. *Chem. - A Eur. J.* **2018**, *24* (45), 11693–11702. <https://doi.org/10.1002/chem.201801600>.

- (11) Luo, H.; Cao, B.; Chan, A. S. C.; Sun, R. W. Y.; Zou, T. Cyclometalated Gold(III)-Hydride Complexes Exhibit Visible Light-Induced Thiol Reactivity and Act as Potent Photo-Activated Anti-Cancer Agents. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2020**. <https://doi.org/10.1002/anie.202000528>.
- (12) Long, N. J.; Williams, C. K. Metal Alkynyl  $\sigma$  Complexes: Synthesis and Materials. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2003**, *42* (23), 2586–2617. <https://doi.org/10.1002/anie.200200537>.
- (13) Cerrada, E.; Fernández-Moreira, V.; Gimeno, M. C. Gold and Platinum Alkynyl Complexes for Biomedical Applications. In *Advances in Organometallic Chemistry*; Perez, P., Ed.; Elsevier Academic Press, 2019; pp 227–258.
- (14) Liu, H. T.; Xiong, X. G.; Diem Dau, P.; Wang, Y. L.; Huang, D. L.; Li, J.; Wang, L. S. Probing the Nature of Gold-Carbon Bonding in Gold-Alkynyl Complexes. *Nat. Commun.* **2013**, *4*, 2223. <https://doi.org/10.1038/ncomms3223>.
- (15) Mármol, I.; Quero, J.; Rodríguez-Yoldi, M. J.; Cerrada, E. Gold as a Possible Alternative to Platinum-Based Chemotherapy for Colon Cancer Treatment. *Cancers (Basel)*. **2019**, *11* (6), 780. <https://doi.org/10.3390/cancers11060780>.
- (16) Fricker, S. P. Medical Uses of Gold Compounds: Past, Present and Future. *Gold Bull.* **1996**, *29* (2), 53–60.
- (17) Alessio, E. Gold-Based Therapeutic Agents A New Perspective. In *Bioinorganic Medicinal Chemistry*; John Wiley & Sons, Ed.; 2011; pp 118–136.
- (18) Carlos Lima, J.; Rodríguez, L. Applications of Gold(i) Alkynyl Systems: A Growing Field to Explore. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40* (11), 5442–5456. <https://doi.org/10.1039/c1cs15123a>.
- (19) Phillips, A. D.; Gonsalvi, L.; Romerosa, A.; Vizza, F.; Peruzzini, M. Coordination Chemistry of 1,3,5-Triaza-7-Phosphaadamantane (PTA): Transition Metal Complexes and Related Catalytic, Medicinal and Photoluminescent Applications. *Coord. Chem. Rev.* **2004**, *248* (11–12), 955–993. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2004.03.010>.
- (20) Bravo, J.; Bolaño, S.; Gonsalvi, L.; Peruzzini, M. Coordination Chemistry of 1,3,5-Triaza-7-Phosphaadamantane (PTA) and Derivatives. Part II. The Quest for Tailored Ligands, Complexes and Related Applications. *Coord. Chem. Rev.* **2010**, *254* (5), 555–607. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ccr.2009.08.006>.
- (21) Guerriero, A.; Peruzzini, M.; Gonsalvi, L. Coordination Chemistry of 1,3,5-Triaza-7-Phosphatricyclo[3.3.1.1]Decane (PTA) and Derivatives. Part III. Variations on a Theme: Novel Architectures, Materials and Applications. *Coord. Chem. Rev.* **2018**, *355*, 328–361. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ccr.2017.09.024>.
- (22) Allardyce, C. S.; Dyson, P. J.; Ellis, D. J.; Heath, S. L. [Ru(H6-p-Cymene)Cl<sub>2</sub>(Pta)] (Pta = 1,3,5-Triaza-7-Phosphatricyclo-[3.3.1.1]Decane): A Water Soluble Compound That Exhibits PH Dependent DNA Binding Providing Selectivity for Diseased Cells. *Chem. Commun.* **2001**, *15*, 1396–1397. <https://doi.org/10.1039/b104021a>.
- (23) White, K. A.; Grillo-Hill, B. K.; Barber, D. L. Cancer Cell Behaviors Mediated by Dysregulated PH Dynamics at a Glance. *J. Cell Sci.* **2017**, *130* (4), 663–669. <https://doi.org/10.1242/jcs.195297>.
- (24) Pujadas, M.; Rodríguez, L. Luminescent Phosphine Gold(I) Alkynyl Complexes. Highlights from 2010 to 2018. *Coord. Chem. Rev.* **2020**, *408*, 213179. <https://doi.org/10.1016/J.CCR.2020.213179>.

- (25) Arcau, J.; Andermark, V.; Aguiló, E.; Gandioso, A.; Moro, A.; Cetina, M.; Lima, J. C.; Rissanen, K.; Ott, I.; Rodríguez, L. Luminescent Alkynyl-Gold(I) Coumarin Derivatives and Their Biological Activity. *Dalt. Trans.* **2014**, *43* (11), 4426–4436. <https://doi.org/10.1039/c3dt52594e>.
- (26) Svahn, N.; Moro, A. J.; Roma-Rodrigues, C.; Puttreddy, R.; Rissanen, K.; Baptista, P. V.; Fernandes, A. R.; Ima, J.; Rodríguez, L. The Important Role of the Nuclearity, Rigidity, and Solubility of Phosphane Ligands in the Biological Activity of Gold(I) Complexes. *Chem Eur J* **2018**, *24*, 14654–14667. <https://doi.org/10.1002/chem.201802547>.
- (27) Andermark, V.; Göke, K.; Kokoschka, M.; Abu el Maaty, M. A.; Lum, C. T.; Zou, T.; Sun, R. W.-Y.; Aguiló, E.; Oehninger, L.; Rodríguez, L.; Bunjes, H.; Wölfl, S.; Che, C.-M.; Ott, I. Alkynyl Gold(I) Phosphane Complexes: Evaluation of Structure–Activity–Relationships for the Phosphane Ligands, Effects on Key Signaling Proteins and Preliminary in-Vivo Studies with a Nanoformulated Complex. *J. Inorg. Biochem.* **2016**, *160*, 140–148. <https://doi.org/10.1016/J.JINORGBIO.2015.12.020>.
- (28) Vergara, E.; Cerrada, E.; Casini, A.; Zava, O.; Laguna, M.; Dyson, P. J. Antiproliferative Activity of Gold(I) Alkyne Complexes Containing Water-Soluble Phosphane Ligands. *Organometallics* **2010**, *29* (11), 2596–2603. <https://doi.org/10.1021/om100300a>.
- (29) Trainer, D. L.; McCabe, F. L.; Faucette, L. F.; Feild, J.; Chaikin, M.; Anzano, M.; Hoffstein, S.; I, D.-J. L.; Gennar, D.; Buscarino, C.; Lynch, M.; O S T E, G. P.; Greigl, R. Biological Characterization and Oncogene Expression in Human Colorectal Carcinoma Cell Lines. *Int. J. Cancer* **1988**, *41* (2), 287–296.
- (30) Adell, R.; Marcote, E.; Segarra, M. A.; Pellicer, V.; Gamón, R.; Bayón, A. M.; Canales, M.; Torner, A. ¿es El Adenocarcinoma Colorrectal Mucinoso Una Entidad Diferente? *Gastroenterol. Hepatol.* **2002**, *25* (9), 534–540. [https://doi.org/10.1016/s0210-5705\(02\)70308-7](https://doi.org/10.1016/s0210-5705(02)70308-7).
- (31) Luo, C.; Cen, S.; Ding, G.; Wu, W. Mucinous Colorectal Adenocarcinoma: Clinical Pathology and Treatment Options. *Cancer Commun.* **2019**, *39* (1), 13. <https://doi.org/10.1186/s40880-019-0361-0>.
- (32) Sigurdsson, H. H.; Kirch, J.; Lehr, C.-M. Mucus as a Barrier to Lipophilic Drugs. *Int. J. Pharm.* **2013**, *453* (1), 56–64. <https://doi.org/10.1016/J.IJPHARM.2013.05.040>.
- (33) Kaladhar, D. S. V. G. K.; Satyanarayana, K. V. V.; Krishna Chaitanya, A.; Hussain, S. Clinical Analysis, Drug Designing And QSAR Studies On Rheumatoid Arthritis. *Int. J. Pharma Bio Sci.* **2010**, *1*, 132–138.
- (34) Screnci, D.; McKeage, M. J.; Galettis, P.; Hambley, T. W.; Palmer, B. D.; Baguley, B. C. Relationships between Hydrophobicity, Reactivity, Accumulation and Peripheral Nerve Toxicity of a Series of Platinum Drugs. *Br. J. Cancer* **2000**, *82* (4), 966–972. <https://doi.org/10.1054/bjoc.1999.1026>.
- (35) Rush, G. F.; Alberts, D. W.; Meunier, P.; Leffler, K.; Smith, P. F. In Vivo and in Vitro Hepatotoxicity of a Novel Antineoplastic Agent, SK'&F 101772, in Male Beagle Dogs. *Toxicologist* **1987**, *7* (59), 106.
- (36) Vergara, E.; Casini, A.; Sorrentino, F.; Zava, O.; Cerrada, E.; Rigobello, M. P.; Bindoli, A.; Laguna, M.; Dyson, P. J. Anticancer Therapeutics That Target Selenoenzymes: Synthesis, Characterization, in Vitro Cytotoxicity, and Thioredoxin Reductase Inhibition of a Series of Gold(I) Complexes Containing Hydrophilic Phosphine Ligands. *ChemMedChem* **2010**, *5* (1), 96–102. <https://doi.org/10.1002/cmdc.200900370>.

- (37) Rousset, M. The Human Colon Carcinoma Cell Lines HT-29 and Caco-2: Two in Vitro Models for the Study of Intestinal Differentiation. *Biochimie* **1986**, *68* (9), 1035–1040. [https://doi.org/doi: 10.1016/s0300-9084\(86\)80177-8](https://doi.org/doi: 10.1016/s0300-9084(86)80177-8).
- (38) 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), 187–194. <https://doi.org/doi: 10.1007/bf00756522>.
- (39) Song, Z. M.; Chen, N.; Liu, J. H.; Tang, H.; Deng, X.; Xi, W. S.; Han, K.; Cao, A.; Liu, Y.; Wang, H. Biological Effect of Food Additive Titanium Dioxide Nanoparticles on Intestine: An in Vitro Study. *J. Appl. Toxicol.* **2015**, *35* (10), 1169–1178. <https://doi.org/10.1002/jat.3171>.
- (40) Chiocchetti, G. M.; Vélez, D.; Devesa, V. Effect of Subchronic Exposure to Inorganic Arsenic on the Structure and Function of the Intestinal Epithelium. *Toxicol. Lett.* **2018**, *286*, 80–88. <https://doi.org/10.1016/J.TOXLET.2018.01.011>.
- (41) Jiménez-Moreno; Cimminelli; Volpe; Ansó; Esparza; Mármol; Rodríguez-Yoldi; Ancín-Azpilicueta. Phenolic Composition of Artichoke Waste and Its Antioxidant Capacity on Differentiated Caco-2 Cells. *Nutrients* **2019**, *11* (8), 1723. <https://doi.org/10.3390/nu11081723>.
- (42) Niv, Y. MUC1 and Colorectal Cancer Pathophysiology Considerations. *World J. Gastroenterol.* **2008**, *14* (14), 2139–2141. <https://doi.org/10.3748/wjg.14.2139>.
- (43) Majorek, K. A.; Porebski, P. J.; Dayal, A.; Zimmerman, M. D.; Jablonska, K.; Stewart, A. J.; Chruszcz, M.; Minor, W. Structural and Immunologic Characterization of Bovine, Horse, and Rabbit Serum Albumins. *Mol. Immunol.* **2012**, *52* (3–4), 174–182. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2012.05.011>.
- (44) Tan, L.; Liu, L.; Xie, Q.; Zhang, Y.; Yao, S. Introduction Fluorescence Quenching of Bovine Serum Albumin in Reversed Micelles by CdS Nanoparticles. *Anal. Sci.* **2004**, *20*, 441–444.
- (45) Tan, M.; Liang, W.; Luo, X.; Gu, Y. Fluorescence Spectroscopy Study on the Interaction between Evodiamine and Bovine Serum Albumin. *J. Chem.* **2013**, *2013*, 1–6. <https://doi.org/10.1155/2013/308054>.
- (46) Hao, C.; Xu, G.; Feng, Y.; Lu, L.; Sun, W.; Sun, R. Fluorescence Quenching Study on the Interaction of Ferroferric Oxide Nanoparticles with Bovine Serum Albumin. *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2017**, *184*, 191–197. <https://doi.org/10.1016/J.SAA.2017.05.004>.
- (47) Neault, J. .; Tajmir-Riahi, H. . Interaction of Cisplatin with Human Serum Albumin. Drug Binding Mode and Protein Secondary Structure. *Biochim. Biophys. Acta - Protein Struct. Mol. Enzymol.* **1998**, *1384* (1), 153–159. [https://doi.org/10.1016/S0167-4838\(98\)00011-9](https://doi.org/10.1016/S0167-4838(98)00011-9).
- (48) Roberts, J. R.; Xiao, J.; Schliesman, B.; Parsons, D. J.; Shaw, C. F. Kinetics and Mechanism of the Reaction between Serum Albumin and Auranofin (and Its Isopropyl Analogue) in Vitro. *Inorg Chem* **1996**, *35* (2), 424–433. <https://doi.org/doi: 10.1021/ic9414280>.
- (49) Sanghvi, C. D.; Olsen, P. M.; Elix, C.; Peng, S. (Bruce); Wang, D.; Chen, Z. (Georgia); Shin, D. M.; Hardcastle, K. I.; MacBeth, C. E.; Eichler, J. F. Antitumor Properties of Five-Coordinate Gold(III) Complexes Bearing Substituted Polypyridyl Ligands. *J. Inorg. Biochem.* **2013**, *128*, 68–76. <https://doi.org/10.1016/J.JINORGBIO.2013.07.014>.
- (50) Lakowicz, J. R. Plasmonics in Biology and Plasmon-Controlled Fluorescence. *Plasmonics* **2006**, *1* (1), 5–33. <https://doi.org/10.1007/s11468-005-9002-3>.

- (51) Hu, Y.-J.; Liu, Y.; Pi, Z.-B.; Qu, S.-S. Interaction of Cromolyn Sodium with Human Serum Albumin: A Fluorescence Quenching Study. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13* (24), 6609–6614. <https://doi.org/10.1016/J.BMC.2005.07.039>.
- (52) Ross, A. Organizational Linkages: Management Issues and Implications. *Hosp Heal. Serv Adm.* **1981**, *26* (2), 37–49.
- (53) Ji, N.; Qiu, C.; Li, X.; Xiong, L.; Sun, Q. Study on the Interaction between Bovine Serum Albumin and Starch Nanoparticles Prepared by Isoamylolysis and Recrystallization. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2015**, *128*, 594–599. <https://doi.org/10.1016/J.COLSURFB.2015.03.016>.
- (54) Li, X. L.; Hu, Y. J.; Wang, H.; Yu, B. Q.; Yue, H. L. Molecular Spectroscopy Evidence of Berberine Binding to DNA: Comparative Binding and Thermodynamic Profile of Intercalation. *Biomacromolecules* **2012**, *13* (3), 873–880. <https://doi.org/10.1021/bm2017959>.
- (55) Wallberg, F.; Tenev, T.; Meier, P. Time-Lapse Imaging of Cell Death. *Cold Spring Harb. Protoc.* **2016**, *2016* (3), 251–258. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot087395>.
- (56) D'Arcy, M. S. Cell Death: A Review of the Major Forms of Apoptosis, Necrosis and Autophagy. *Cell Biol. Int.* **2019**, *43* (6), 582–592. <https://doi.org/10.1002/cbin.11137>.
- (57) Xu, X.; Lai, Y.; Hua, Z. C. Apoptosis and Apoptotic Body: Disease Message and Therapeutic Target Potentials. *Biosci. Rep.* **2019**, *39* (1), BSR20180992. <https://doi.org/10.1042/BSR20180992>.
- (58) Saraste, A.; Pulkki, K. Morphologic and Biochemical Hallmarks of Apoptosis. *Cardiovasc. Res.* **2000**, *45* (3), 528–537.
- (59) Fujimaki, S.; Kubohara, Y.; Kobayashi, I.; Kojima, I. Caspase-Independent Apoptosis Induced by Differentiation-Inducing Factor of Dicytostelium Discoideum in INS-1 Cells. *Eur. J. Pharmacol.* **2001**, *421*, 93–100.
- (60) Nayak, V. L.; Nagesh, N.; Ravikumar, A.; Bagul, C.; Vishnuvardhan, M. V. P. S.; Srinivasulu, V.; Kamal, A. 2-Aryl Benzimidazole Conjugate Induced Apoptosis in Human Breast Cancer MCF-7 Cells through Caspase Independent Pathway. *Apoptosis* **2017**, *22* (1), 118–134. <https://doi.org/10.1007/s10495-016-1290-x>.
- (61) Chung, Y. C.; Tang, F. Y.; Liao, J. W.; Chung, C. H.; Jong, T. T.; Chen, S. S.; Tsai, C. H.; Chiang, E. P. Isatis Indigotica Induces Hepatocellular Cancer Cell Death via Caspase-Independent Apoptosis-Inducing Factor Translocation Apoptotic Pathway in Vitro and in Vivo. *Integr. Cancer Ther.* **2011**, *10* (2), 201–214. <https://doi.org/10.1177/1534735410387420>.
- (62) Park, S.; De Leon, M.; Devarajan, P. Cisplatin Induces Apoptosis in LLC-PK1 Cells via Activation of Mitochondrial Pathways. *J. Am. Soc. Nephrol* **2002**, *13* (4), 858–865.
- (63) Park, N.; Chun, Y. J. Auranofin Promotes Mitochondrial Apoptosis by Inducing Annexin A5 Expression and Translocation in Human Prostate Cancer Cells. *J. Toxicol. Environ. Heal. - Part A Curr. Issues* **2014**, *77*, 1467–1476. <https://doi.org/10.1080/15287394.2014.955834>.
- (64) Hassan, M.; Watari, H.; Abualmaaty, A.; Ohba, Y.; Sakuragi, N. Apoptosis and Molecular Targeting Therapy in Cancer. *Biomed. Res. Int.* **2014**, *2014*, 150845. <https://doi.org/10.1155/2014/150845>.
- (65) Ahmed, D.; Eide, P. W.; Eilertsen, I. A.; Danielsen, S. A.; Eknæs, M.; Hektoen, M.; Lind, G.

- E.; Lothe, R. A. Epigenetic and Genetic Features of 24 Colon Cancer Cell Lines. *Oncogenesis* **2013**, *2*, e71. <https://doi.org/10.1038/oncsis.2013.35>.
- (66) Mármol, I.; Sánchez-de-Diego, C.; Dieste, A. P.; Cerrada, E.; Yoldi, M. J. R. Colorectal Carcinoma: A General Overview and Future Perspectives in Colorectal Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18* (1), 197. <https://doi.org/10.3390/ijms18010197>.
- (67) Leslie, A.; Carey, F. A.; Pratt, N. R.; Steele, R. J. C.; Leslie, M. A. The Colorectal Adenoma-Carcinoma Sequence. *Br. J. Surg.* **2002**, *89*, 845–860.
- (68) Nguyen, H. T.; Duong, H. Q. The Molecular Characteristics of Colorectal Cancer: Implications for Diagnosis and Therapy. *Oncol. Lett.* **2018**, *16* (1), 9–18. <https://doi.org/10.3892/ol.2018.8679>.
- (69) Selvakumaran M; Lin HK; Miyashita T; Wang HG; Krajewski S; Reed JC; Hoffman B; Liebermann D. Immediate Early Up-Regulation of Bax Expression by P53 but Not TGF Beta 1: A Paradigm for Distinct Apoptotic Pathways. *Oncogene* **1994**, *9* (6), 1791–1798.
- (70) Zhan Q; Fan S; Bae I; Guillouf C; Liebermann DA; O'Connor PM; Fornace AJ Jr. Induction of Bax by Genotoxic Stress in Human Cells Correlates with Normal P53 Status and Apoptosis. *Oncogene* **1994**, *9* (12), 3743–3751.
- (71) Kowalczyk, A. E.; Krazinski, B. E.; Godlewski, J.; Kiewisz, J.; Kwiatkowski, P.; Sliwinska-Jewsiewicka, A.; Kiezun, J.; Sulik, M.; Kmiec, Z. Expression of the EP300, TP53 and BAX Genes in Colorectal Cancer: Correlations with Clinicopathological Parameters and Survival. *Oncol. Rep.* **2017**, *38* (1), 201–210. <https://doi.org/10.3892/or.2017.5687>.
- (72) Huang, C.-L.; Kohno, N.; Inufusa, H.; Kodama, K.; Taki, T.; Miyake, M. Overexpression of Bax Associated with Mutations in the Loop-Sheet-Helix Motif of P53. *Am. J. Pathol.* **1999**, *155* (3), 955–965.
- (73) Pryczynicz, A.; Gryko, M.; Niewiarowska, K.; Cepowicz, D.; Ustymowicz, M.; Kemon, A.; Guzińska-Ustymowicz, K. Bax Protein May Influence the Invasion of Colorectal Cancer. *World J. Gastroenterol.* **2014**, *20* (5), 1305–1310. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i5.1305>.
- (74) Shoji, K. F.; Debure, L. Fluorometric Methods for Detection of Mitochondrial Membrane Depolarization Induced by CD95 Activation. In *Methods in Molecular Biology*; Humana Press Inc., 2017; Vol. 1557, pp 49–62. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6780-3\\_6](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6780-3_6).
- (75) Gottlieb, E.; Armour, S. M.; Harris, M. H.; Thompson, C. B. Mitochondrial Membrane Potential Regulates Matrix Configuration and Cytochrome c Release during Apoptosis. *Cell Death Differ.* **2003**, *10* (6), 709–717. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401231>.
- (76) Chiu, S.-M.; Oleinick, N. Dissociation of Mitochondrial Depolarization from Cytochrome c Release during Apoptosis Induced by Photodynamic Therapy. *Br J Cancer* **2001**, *84* (8), 1099–1106. <https://doi.org/doi:10.1054/bjoc.2000.1714>.
- (77) Hwang-Bo, H.; Jeong, J.-W.; Han, M. H.; Park, C.; Hong, S.-H.; Kim, G.-Y.; Moon, S.-K.; Cheong, J.; Kim, W.-J.; Yoo, Y. H.; Choi, Y. H. Auranofin, an Inhibitor of Thioredoxin Reductase, Induces Apoptosis in Hepatocellular Carcinoma Hep3B Cells by Generation of Reactive Oxygen Species. *Gen. Physiol. Biophys.* **2017**, *36* (02), 117–128. [https://doi.org/10.4149/gpb\\_2016043](https://doi.org/10.4149/gpb_2016043).
- (78) Dipaola, R. S. To Arrest or Not To G 2-M Cell-Cycle Arrest Commentary Re: A. K. Tyagi et Al., Silibinin Strongly Synergizes Human Prostate Carcinoma DU145 Cells to Doxorubicin-Induced Growth Inhibition, G 2-M Arrest. *Clin. Cancer Res* **2002**, *8* (11), 3512–3519.

- (79) Parry, M. C.; Bhabra, G.; Sood, A.; Machado, F.; Cartwright, L.; Saunders, M.; Ingham, E.; Newson, R.; Blom, A. W.; Case, C. P. Thresholds for Indirect DNA Damage across Cellular Barriers for Orthopaedic Biomaterials. *Biomaterials* **2010**, *31* (16), 4477–4483. <https://doi.org/10.1016/J.BIOMATERIALS.2010.02.038>.
- (80) Bhabra, G.; Sood, A.; Fisher, B.; Cartwright, L.; Saunders, M.; Evans, W. H.; Surprenant, A.; Lopez-Castejon, G.; Mann, S.; Davis, S. A.; Hails, L. A.; Ingham, E.; Verkade, P.; Lane, J.; Heesom, K.; Newson, R.; Case, C. P. Nanoparticles Can Cause DNA Damage across a Cellular Barrier. *Nat. Nanotechnol.* **2009**, *4* (12), 876–883. <https://doi.org/10.1038/nnano.2009.313>.
- (81) Ahmed Belmokhtar, C.; Hillion, J.; Seâ Gal-Bendirdjian, E. Staurosporine Induces Apoptosis through Both Caspase-Dependent and Caspase-Independent Mechanisms. *Oncogene* **2001**, *20* (26), 3354–3362. <https://doi.org/doi:10.1038/sj.onc.1204436>.
- (82) Ruemmele, F. M.; Schwartz, S.; Seidman, E. G.; Dionne, S.; Levy, E. Butyrate Induced Caco-2 Cell Apoptosis Is Mediated via the Mitochondrial Pathway. *Gut* **2003**, *52* (1), 94–100. <https://doi.org/10.1136/gut.52.1.94>.
- (83) Cohen, G. M.; Sun, X.-M.; Snowden, R. T.; Dinsdale, D.; Skilleter, D. N. Key Morphological Features of Apoptosis May Occur in the Absence of Internucleosomal DNA Fragmentation. *Biochem. J* **1992**, *286*, 331–334.
- (84) Zainal Ariffin, S. H.; Yeen, W. W.; Zainol Abidin, I. Z.; Megat Abdul Wahab, R.; Zainal Ariffin, Z.; Senafi, S. Cytotoxicity Effect of Degraded and Undegraded Kappa and Iota Carrageenan in Human Intestine and Liver Cell Lines. *BMC Complement. Altern. Med.* **2014**, *14* (1), 508. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-14-508>.
- (85) Mirabelli, C. K.; Sung, C.-M.; Zimmerman, J. P.; Hill, D. T.; Mong, S.; Croke, S. T. Interactions of Gold Coordination Complexes with DNA. *Biochem. Pharmacol.* **1986**, *35* (9), 1427–1433. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(86\)90106-1](https://doi.org/10.1016/0006-2952(86)90106-1).
- (86) Omata, Y.; Folan, M.; Melissa, ; Regina, S. ; Messer, L. W.; Petra, ; Lockwood, E.; David, ; Hobbs, T.; Bouillaguet, S.; Sano, H.; Lewis, J. B.; Wataha, J. Sublethal Concentrations of Diverse Gold Compounds Inhibit Mammalian Cytosolic Thioredoxin Reductase (TrxR1). *Toxicol Vitro.* **2006**, *20* (6), 882–890. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2006.01.012>.
- (87) Gandin, V.; Fernandes, A. P.; Rigobello, M. P.; Dani, B.; Sorrentino, F.; Tisato, F.; Björnstedt, M.; Bindoli, A.; Sturaro, A.; Rella, R.; Marzano, C. Cancer Cell Death Induced by Phosphine Gold(I) Compounds Targeting Thioredoxin Reductase. *Biochem. Pharmacol.* **2010**, *79* (2), 90–101. <https://doi.org/10.1016/J.BCP.2009.07.023>.
- (88) Chen, X.; Zhou, H. J.; Huang, Q.; Lu, L.; Min, W. Novel Action and Mechanism of Auranofin in Inhibition of Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-3-Dependent Lymphangiogenesis. *Anticancer Agents Med Chem* **2014**, *14* (7), 946–954. <https://doi.org/10.2174/1871520614666140610102651>.
- (89) Du, Y.; Zhang, H.; Lu, J.; Holmgren, A. Glutathione and Glutaredoxin Act as a Backup of Human Thioredoxin Reductase 1 to Reduce Thioredoxin 1 Preventing Cell Death by Aurothioglucose. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287* (45), 38210–38219. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.392225>.
- (90) Garcia, A.; Machado, R. C.; Grazul, R. M.; Lopes, M. T. P.; Corrêa, C. C.; Dos Santos, H. F.; De Almeida, M. V.; Silva, H. Novel Antitumor Adamantane-Azole Gold(I) Complexes as Potential Inhibitors of Thioredoxin Reductase. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2016**, *21* (2), 275–292. <https://doi.org/10.1007/s00775-016-1338-y>.

- (91) Curran, D.; Dada, O.; Müller-Bunz, H.; Rothemund, M.; Sánchez-Sanz, G.; Schobert, R.; Zhu, X.; Tacke, M. Synthesis and Cytotoxicity Studies of Novel NHC\*-Gold(I) Complexes Derived from Lepidiline A. *Molecules* **2018**, *23* (8), 2031. <https://doi.org/10.3390/molecules23082031>.
- (92) Moloney, J. N.; Cotter, T. G. ROS Signalling in the Biology of Cancer. *Semin. Cell Dev. Biol.* **2018**, *80*, 50–64. <https://doi.org/10.1016/J.SEMCDB.2017.05.023>.
- (93) Wang, J. N.; Zhang, Z. R.; Che, Y.; Yuan, Z. Y.; Lu, Z. L.; Li, Y.; Li, N.; Wan, J.; Sun, H. D.; Sun, N.; Puno, P. T.; He, J. Acetyl-Macrocalin B, an Ent-Kaurane Diterpenoid, Initiates Apoptosis through the ROS-P38-Caspase 9-Dependent Pathway and Induces G2/M Phase Arrest via the Chk1/2-Cdc25C-Cdc2/Cyclin B Axis in Non-Small Cell Lung Cancer. *Cancer Biol. Ther.* **2018**, *19* (7), 609–621. <https://doi.org/10.1080/15384047.2018.1449613>.
- (94) Kang, N.; Jian, J. feng; Cao, S. jie; Zhang, Q.; Mao, Y. wei; Huang, Y. yuan; Peng, Y. fei; Qiu, F.; Gao, X. mei. Physalin A Induces G2/M Phase Cell Cycle Arrest in Human Non-Small Cell Lung Cancer Cells: Involvement of the P38 MAPK/ROS Pathway. *Mol. Cell. Biochem.* **2016**, *415* (1–2), 145–155. <https://doi.org/10.1007/s11010-016-2686-1>.
- (95) Rundlöf, A.-K.; Arnér, E. S. J. Regulation of the Mammalian Selenoprotein Thioredoxin Reductase 1 in Relation to Cellular Phenotype, Growth, and Signaling Events. *Antioxid Redox Signal* **2004**, *6* (1), 41–52.
- (96) Karlenius, T. C.; Tonissen, K. F. Thioredoxin and Cancer: A Role for Thioredoxin in All States of Tumor Oxygenation. *Cancers (Basel)*. **2010**, *2* (2), 209–232. <https://doi.org/10.3390/cancers2020209>.
- (97) Pietkiewicz, S.; Schmidt, J. H.; Lavrik, I. N. Quantification of Apoptosis and Necroptosis at the Single Cell Level by a Combination of Imaging Flow Cytometry with Classical Annexin V/Propidium Iodide Staining. *J. Immunol. Methods* **2015**, *423*, 99–103. <https://doi.org/10.1016/J.JIM.2015.04.025>.
- (98) Kim, H. J.; Hwang, K. E.; Park, D. S.; Oh, S. H.; Jun, H. Y.; Yoon, K. H.; Jeong, E. T.; Kim, H. R.; Kim, Y. S. Shikonin-Induced Necroptosis Is Enhanced by the Inhibition of Autophagy in Non-Small Cell Lung Cancer Cells. *J. Transl. Med.* **2017**, *15* (1), 123. <https://doi.org/10.1186/s12967-017-1223-7>.
- (99) Cui, J.; Yan, M.; Liu, X.; Yin, S.; Lu, S.; Fan, L.; Hu, H. Inorganic Selenium Induces Nonapoptotic Programmed Cell Death in PC-3 Prostate Cancer Cells Associated with Inhibition of Glycolysis. *J. Agric. Food Chem.* **2019**, *67* (38), 10637–10645. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b03875>.
- (100) Zhang, D.-W.; Shao, J.; Lin, J.; Zhang, N.; Lu, B.-J.; Lin, S.-C.; dong, M.-Q.; Han, J. RIP3, an Energy Metabolism Regulator That Switches TNF-Induced Cell Death from Apoptosis to Necrosis. *Science (80-. )*. **2009**, *325* (5938), 332–336. <https://doi.org/10.1126/science.1172308>.
- (101) Metzigg, M. O.; Fuchs, D.; Tagscherer, K. E.; Gröne, H. J.; Schirmacher, P.; Roth, W. Inhibition of Caspases Primes Colon Cancer Cells for 5-Fluorouracil-Induced TNF- $\alpha$ -Dependent Necroptosis Driven by RIP1 Kinase and NF-KB. *Oncogene* **2016**, *35* (26), 3399–3409. <https://doi.org/10.1038/onc.2015.398>.
- (102) Han, W.; Xie, J.; Fang, Y.; Wang, Z.; Pan, H. Nec-1 Enhances Shikonin-Induced Apoptosis in Leukemia Cells by Inhibition of RIP-1 and ERK1/2. *Int. J. Mol. Sci.* **2012**, *13* (6), 7212–7225. <https://doi.org/10.3390/ijms13067212>.

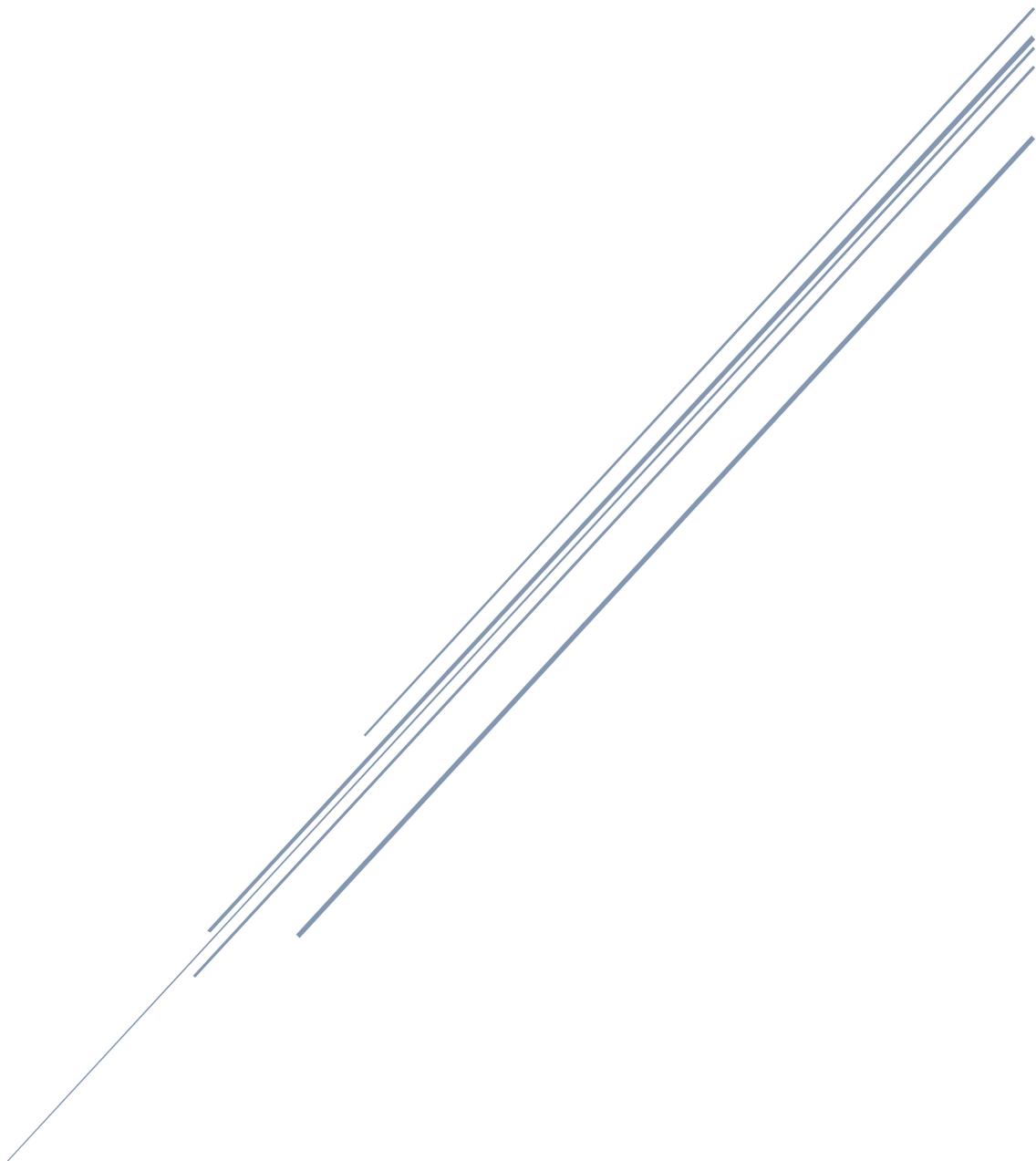
- (103) Khorsandi, L.; Orazizadeh, M.; Niazvand, F.; Abbaspour, M. R.; Mansouri, E.; Khodadadi, A. Quercetin Induces Apoptosis and Necroptosis in MCF-7 Breast Cancer Cells. *Bratislava Med. J.* **2017**, *118* (2), 123–128. [https://doi.org/10.4149/BLL\\_2017\\_025](https://doi.org/10.4149/BLL_2017_025).
- (104) Xu, Y.; Ma, H.; Fang, Y.; Zhang, Z.; Shao, J.; Hong, M.; Huang, C.; Liu, J.; Chen, R. Cisplatin-Induced Necroptosis in TNF $\alpha$  Dependent and Independent Pathways. *Cell. Signal.* **2017**, *31*, 112–123. <https://doi.org/10.1016/J.CELLSIG.2017.01.004>.
- (105) Jiang, Y.; Shan, S.; Chi, L.; Zhang, G.; Gao, X.; Li, H.; Zhu, X.; Yang, J. Methyl Methanesulfonate Induces Necroptosis in Human Lung Adenoma A549 Cells through the PIG-3-Reactive Oxygen Species Pathway. *Tumor Biol.* **2016**, *37* (3), 3785–3795. <https://doi.org/10.1007/s13277-015-3531-y>.
- (106) Gong, Y.; Fan, Z.; Luo, G.; Yang, C.; Huang, Q.; Fan, K.; Cheng, H.; Jin, K.; Ni, Q.; Yu, X.; Liu, C. The Role of Necroptosis in Cancer Biology and Therapy. *Mol. Cancer* **2019**, *18* (1), 100. <https://doi.org/10.1186/s12943-019-1029-8>.
- (107) Zhang, Y.; Su, S. S.; Zhao, S.; Yang, Z.; Zhong, C. Q.; Chen, X.; Cai, Q.; Yang, Z. H.; Huang, D.; Wu, R.; Han, J. RIP1 Autophosphorylation Is Promoted by Mitochondrial ROS and Is Essential for RIP3 Recruitment into Necrosome. *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 14329. <https://doi.org/10.1038/ncomms14329>.
- (108) Qiu, X.; Zhang, Y.; Han, J. RIP3 Is an Upregulator of Aerobic Metabolism and the Enhanced Respiration by Necrosomal RIP3 Feeds Back on Necrosome to Promote Necroptosis. *Cell Death Differ.* **2018**, *25* (5), 821–824. <https://doi.org/10.1038/s41418-018-0075-x>.
- (109) Yu, W. N.; Lai, Y. J.; Ma, J. W.; Ho, C. T.; Hung, S. W.; Chen, Y. H.; Chen, C. T.; Kao, J. Y.; Way, T. Der. Citronellol Induces Necroptosis of Human Lung Cancer Cells via TNF- $\alpha$  Pathway and Reactive Oxygen Species Accumulation. *In Vivo (Brooklyn)*. **2019**, *33* (4), 1193–1201. <https://doi.org/10.21873/invivo.11590>.
- (110) Tsuchiya, A.; Kaku, Y.; Nakano, T.; Nishizaki, T. Diarachidonoylphosphoethanolamine Induces Apoptosis of Malignant Pleural Mesothelioma Cells through a Trx/ASK1/P38 MAPK Pathway. *J. Pharmacol. Sci.* **2015**, *129* (3), 160–168. <https://doi.org/10.1016/j.jphs.2015.10.003>.
- (111) Li, H.; Hu, J.; Wu, S.; Wang, L.; Cao, X.; Zhang, X.; Dai, B.; Cao, M.; Shao, R.; Zhang, R.; Majidi, M.; Ji, L.; Heymach, J. V.; Wang, M.; Pan, S.; Minna, J.; Mehran, R. J.; Swisher, S. G.; Roth, J. A.; Fang, B. Auranofin-Mediated Inhibition of PI3K/AKT/MTOR Axis and Anticancer Activity in Non-Small Cell Lung Cancer Cells. *Oncotarget* **2016**, *7* (3), 3548–3558. <https://doi.org/doi:10.18632/oncotarget.6516>.
- (112) Mármol, I.; Virumbrales-Muñoz, M.; Quero, J.; Sánchez-de-Diego, C.; Fernández, L.; Ochoa, I.; Cerrada, E.; Yoldi, M. J. R. Alkynyl Gold(I) Complex Triggers Necroptosis via ROS Generation in Colorectal Carcinoma Cells. *J. Inorg. Biochem.* **2017**, *176*, 123–133. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2017.08.020>.
- (113) Durazo, S. A.; Kadam, R. S.; Drechsel, D.; Patel, M.; Kompella, U. B. Brain Mitochondrial Drug Delivery: Influence of Drug Physicochemical Properties. *Pharm. Res.* **2011**, *28* (11), 2833–2847. <https://doi.org/10.1007/s11095-011-0532-4>.
- (114) Gavara, R.; Llorca, J.; Lima, J. C.; Rodríguez, L. A Luminescent Hydrogel Based on a New Au(I) Complex. *Chem. Commun.* **2013**, *49* (1), 72–74. <https://doi.org/10.1039/c2cc37262b>.
- (115) Blanco, M. C.; Cámara, J.; Gimeno, M. C.; Jones, P. G.; Laguna, A.; López-De-Luzuriaga, J.

- M.; Olmos, M. E.; Villacampa, M. D. Luminescent Homo- and Heteropolynuclear Gold Complexes Stabilized by a Unique Acetylde Fragment. *Organometallics* **2012**, *31* (7), 2597–2605. <https://doi.org/10.1021/om200397t>.
- (116) Breslin, S.; O'Driscoll, L. Three-Dimensional Cell Culture: The Missing Link in Drug Discovery. *Drug Discov. Today* **2013**, *18* (5–6), 240–249. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2012.10.003>.
- (117) Kapałczyńska, M.; Kolenda, T.; Przybyła, W.; Zajączkowska, M.; Teresiak, A.; Filas, V.; Ibbs, M.; Bliźniak, R.; Łuczewski, Ł.; Lamperska, K. 2D and 3D Cell Cultures – a Comparison of Different Types of Cancer Cell Cultures. *Arch. Med. Sci.* **2018**, *14* (4), 910–919. <https://doi.org/10.5114/aoms.2016.63743>.
- (118) Nath, S.; Devi, G. R. Three-Dimensional Culture Systems in Cancer Research: Focus on Tumor Spheroid Model. *Pharmacol. Ther.* **2016**, *163*, 94–108. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2016.03.013>.
- (119) Hoffmann, O. I.; Ilmberger, C.; Magosch, S.; Joka, M.; Jauch, K.-W.; Mayer, B. Impact of the Spheroid Model Complexity on Drug Response. *J. Biotechnol.* **2015**, *205*, 14–23. <https://doi.org/10.1016/J.JBIOTEC.2015.02.029>.
- (120) Ayuso, J. M.; Basheer, H. A.; Monge, R.; Sánchez-Álvarez, P.; Doblaré, M.; Shnyder, S. D.; Vinader, V.; Afarinkia, K.; Fernández, L. J.; Ochoa, I. Study of the Chemotactic Response of Multicellular Spheroids in a Microfluidic Device. *PLoS One* **2015**, *10* (10), e0139515. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0139515>.
- (121) Rosen, L. S.; Jacobs, I. A.; Burkes, R. L. Bevacizumab in Colorectal Cancer: Current Role in Treatment and the Potential of Biosimilars. *Target. Oncol.* **2017**, *12* (5), 599–610. <https://doi.org/10.1007/s11523-017-0518-1>.
- (122) Roder, C.; Thomson, M. J. Auranofin: Repurposing an Old Drug for a Golden New Age. *Drugs R D* **2015**, *15* (1), 13–20. <https://doi.org/10.1007/s40268-015-0083-y>.

# CAPITULO 2

## EFFECTO COMBINADO DE UN ALQUINIL DERIVADO DE ORO(I) Y EXTRACTOS VEGETALES

- *Antioxidants (Basels)*. 2019; 9(1):17





El uso de los extractos vegetales como potenciales adyuvantes para el cisplatino ha sido mencionado en el apartado 1.4 como una posible estrategia mediante la cual se podría aumentar la eficacia de este fármaco y/o reducir sus efectos secundarios y la resistencia a la terapia (pág. 55; Figura 17). La posibilidad de desarrollar nuevas terapias combinatorias que contengan extractos vegetales ha surgido recientemente como una alternativa a las actuales opciones terapéuticas, y se plantea como un interesante campo de estudio en vista de la ya mencionada necesidad de dar con nuevos tratamientos más eficaces y seguros con los que mejorar la calidad y la esperanza de vida de los pacientes.

Sin embargo, hasta el momento no se ha profundizado en la materia prima a partir de la cual se obtendrían dichos extractos, un tema que debe ser tomado en consideración antes de plantearnos el desarrollo de estas nuevas terapias. Aunque existe un gran número de trabajos de investigación que parten de frutas y verduras frescas de las que se obtienen extractos y compuestos bioactivos aislados con potencial antitumoral, existe un dilema moral en relación al uso de piezas aptas para consumo humano con fines farmacológicos, puesto que gran parte del mundo se ve asolado por una epidemia de hambruna<sup>1</sup>. Por otra parte, esto sería innecesario además de inmoral, dado que se ha observado que partes del vegetal como la cáscara, las semillas o las pieles que, o bien no son aptas para el consumo humano o bien suelen ser descartadas y no se aprovechan, poseen un contenido en polifenoles comparable al de las pulpas. Así como el descubrimiento de las propiedades antitumorales del oro fue posible gracias a que previamente se observó que el platino tenía un potente efecto anticancerígeno, el uso de partes no comestibles con fines terapéuticos tiene su origen en la medicina tradicional, cuyos remedios recurrían a frutas y hierbas silvestres entre otros ingredientes<sup>2</sup>. Por ejemplo, la corteza de pino se incluía en la preparación de tisanas para sanar distintos males, lo que posteriormente despertaría la curiosidad de los investigadores modernos y permitiría identificar a este residuo forestal como fuente de compuestos bioactivos de interés frente a diversos trastornos cuya incidencia en la actualidad es muy alta, como el cáncer o la aterosclerosis<sup>3,4</sup>.

Además de los productos de desecho que resultan de los procesos de deforestación, los frutos silvestres también son una fuente interesante de extractos vegetales que pueden ser utilizados en investigación farmacéutica. Un ejemplo es el escaramujo (*Rosa canina*), que ha sido objeto de numerosas investigaciones durante los últimos años debido a su composición rica en antioxidantes. De las más de 100 especies distintas del género *Rosa* que se encuentran a lo largo de todo el mundo, la *R. canina* es la variante más común en Europa. En algunas regiones, estos pequeños pseudofrutos son utilizados en mermeladas, yogures o infusiones, y han formado parte de remedios tradicionales frente a trastornos que causan dolencias leves, entre los que se encuentran las molestias articulares asociadas a la artritis reumatoide, problemas gastrointestinales o los síntomas del resfriado<sup>5,6</sup>. Sus propiedades antioxidantes y su alto contenido en

polifenoles<sup>7,8</sup> la convierten en una candidata ideal a ser investigada por sus propiedades antitumorales<sup>5</sup>.

Hasta la fecha, la mayor parte de estos estudios se han limitado a modelos celulares para determinar su mecanismo de acción, obteniéndose en general resultados bastante prometedores. Debe tenerse en cuenta, no obstante, que es difícil reproducir los resultados obtenidos por diferentes investigadores, puesto que tanto la procedencia de las muestras como el método de extracción van a condicionar el contenido final en polifenoles y, por consiguiente, el efecto biológico de las mismas<sup>9-12</sup>. A modo de ejemplo, se van a comparar los resultados obtenidos por dos grupos de investigación distintos. En primer lugar, Tumbas *et al.*<sup>13</sup> evaluaron el efecto antitumoral de bayas de *Rosa canina* crecidas en la proximidad de la montaña Rtanj de Serbia. Procesaron sus muestras mediante extracción con fase sólida y obtuvieron tres fracciones: vitamina C, flavonoides y ácidos fenólicos. Trabajaron con tres modelos tumorales, las líneas celulares HeLa (carcinoma cervical), MCF-7 (adenocarcinoma de mama) y HT-29 (adenocarcinoma de colon), observando que la vitamina C era ineficaz sobre todos los modelos de estudio, mientras que las otras dos fracciones mostraron un efecto antiproliferativo dependiente de la concentración. Por su parte, Jiménez *et al.*<sup>14</sup> sí encontraron un descenso significativo en la viabilidad de células Caco-2 indiferenciadas al ser tratadas con cantidades crecientes de vitamina C extraída de los frutos de la *Rosa canina* en un trabajo posterior. En este caso, los investigadores obtuvieron sus muestras de la región de Alicante, España, y las procesaron del mismo modo que Tumbas *et al.*<sup>13</sup> previamente. Por consiguiente, los investigadores deben ser cuidadosos al intentar replicar un resultado obtenido por otro grupo de investigación, ya que en esta clase de estudios influye una gran cantidad de variantes, aunque se pueden obtener datos orientativos de gran utilidad para diseñar futuros experimentos.

De igual manera, los distintos trabajos realizados acerca del potencial antitumoral de los extractos de escaramujo han arrojado resultados prometedores, aunque también dispares. A la hora de compararlos, debe tomarse en consideración que no solo el contenido en polifenoles del extracto va a ser determinante sobre su efecto biológico, sino que puede ocurrir que los distintos tipos de tumor no respondan de igual forma. Curiosamente, aunque el efecto antiproliferativo de los extractos de las pseudofrutas del género *Rosa* ha sido demostrado en varias ocasiones por autores diferentes, de acuerdo a datos recogidos en un artículo de tipo revisión en el que participó la autora de la presente memoria<sup>5</sup>, pocos han ido más allá y existen pocos trabajos acerca de su diana o dianas más probables. Uno de estos trabajos es el de Turan *et al.*<sup>15</sup>, en el que recogieron el descenso en la expresión de la enzima telomerasa en células de cáncer de colon (línea WiDr) tras la incubación con extractos de bayas de *R. canina* procedentes de la región este de Anatolia, Turquía. En su caso, la extracción se realizó usando DMSO como disolvente, y se observó que los extractos actuaban selectivamente frente a las células tumorales, causando un descenso en la expresión del gen *hTERT* dependiente

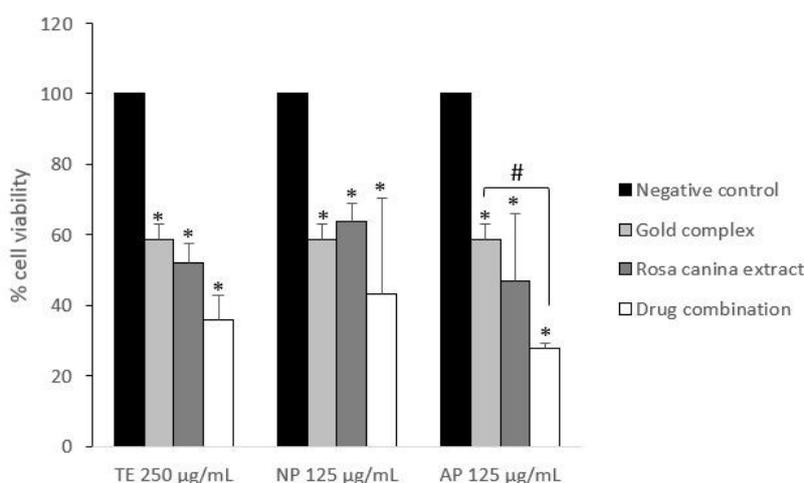
del tiempo de incubación. Otros investigadores han optado por analizar la posible selectividad de estos extractos, como observaron Kilinc *et al.*<sup>16</sup> en una continuación del trabajo anterior. Los autores compararon la citotoxicidad de sus muestras sobre un modelo no tumoral (fibroblastos humanos) y dos líneas tumorales (PC-3, cáncer de próstata, y A549, de pulmón), observándose un efecto antiproliferativo sobre los dos modelos cancerígenos, pero no así sobre el modelo no tumoral. En definitiva, estos datos sugieren que los extractos de *Rosa canina* podrían reunir las dos características ya mencionadas del agente quimioterapéutico ideal: efectividad y selectividad.

En el anteriormente citado trabajo, Jiménez *et al.*<sup>14</sup> evaluaron el efecto antiproliferativo del extracto total del fruto de la *R. canina* sobre la línea Caco-2, así como de tres fracciones derivadas del mismo: vitamina C, polifenoles neutros y polifenoles ácidos. Se observó que, si bien las cuatro muestras fueron capaces de reducir significativamente la viabilidad del cultivo, siendo este efecto dependiente de la concentración, las dos fracciones ricas en polifenoles resultaron ser más eficaces que el extracto total o la vitamina C. Los autores observaron, además, que este efecto parecía ser debido a la inducción de apoptosis. A la vista de los interesantes resultados obtenidos, se decidió estudiar el posible papel de estos extractos como coadyuvantes para un fármaco metálico. Sin embargo, se tomó la decisión de dejar fuera del estudio a la fracción que únicamente contenía a la vitamina C. Pese a sus propiedades antiproliferativas, la conservación de la muestra resultaba problemática, ya que para mantener intactas sus propiedades debía mantenerse a -80°C, pero almacenamientos superiores a un mes tenían como desagradable consecuencia la formación de una pasta apelmazada que resultaba complicado pesar y disolver en el medio de cultivo. Además, inducía leves cambios en el pH del medio que podrían afectar al derivado metálico. Por todo ello, se limitó el estudio a las tres fracciones restantes: extracto total (en adelante TE; *Total Extract*), polifenoles neutros (NP; *Neutral Polyphenols*) y polifenoles ácidos (AP; *Acidic Polyphenols*).

A la hora de escoger un derivado metálico que incluir en el cóctel farmacológico (DC; *Drug Combination*) junto con los extractos vegetales, debido al efecto antitumoral descrito para el complejo  $[\text{Au}(\text{C}\equiv\text{C}-2\text{-NC}_5\text{H}_4)(\text{PTA})]$  (**2a**) (en adelante GC; *Gold Complex*) en el capítulo anterior, lo consideramos un candidato interesante para el desarrollo de esta nueva terapia combinada enfocada al tratamiento de tumores colorrectales especialmente agresivos, dada su capacidad de inducir necroptosis y los buenos resultados obtenidos en el modelo tridimensional<sup>17</sup>. Así pues, el objetivo principal de este capítulo consistiría en determinar si, al igual que ocurre en el caso del cisplatino, podría resultar beneficioso el combinar un complejo de oro con extractos vegetales.

A modo de ensayo preliminar, se decidió evaluar la respuesta del cultivo con cada una de las tres fracciones al ser administradas junto con el complejo **2a**. Así, las células Caco-2 indiferenciadas fueron incubadas durante 72h con el IC<sub>50</sub> previamente calculado

para **2a** (3,80  $\mu$ M; ver Capítulo 1, pág. 121; Tabla 4) junto con cada una de las tres fracciones, cuyos IC<sub>50</sub> habían sido previamente calculados por Jiménez *et al.* (IC<sub>50</sub> TE: 250  $\mu$ g/ml; IC<sub>50</sub>NP: 125  $\mu$ g/ml; IC<sub>50</sub> AP: 125  $\mu$ g/ml). La única de las combinaciones que mostró un descenso significativo ( $p < 0,05$ ) de la viabilidad celular con respecto al complejo de oro administrado de forma individual fue la contenía a **2a** y a la fracción de polifenoles ácidos (Figura 52). Por consiguiente, esta fracción era la única que mejoraba las propiedades antiproliferativas del derivado metálico, de modo que se descartaron las otras dos para futuros ensayos. La concentración de cada uno de los agentes que componen esta combinación de fármacos (DC; *Drug Combination*) se muestra en la Tabla 10, y serán las que se administren en los ensayos descritos a continuación salvo que se especifique lo contrario.



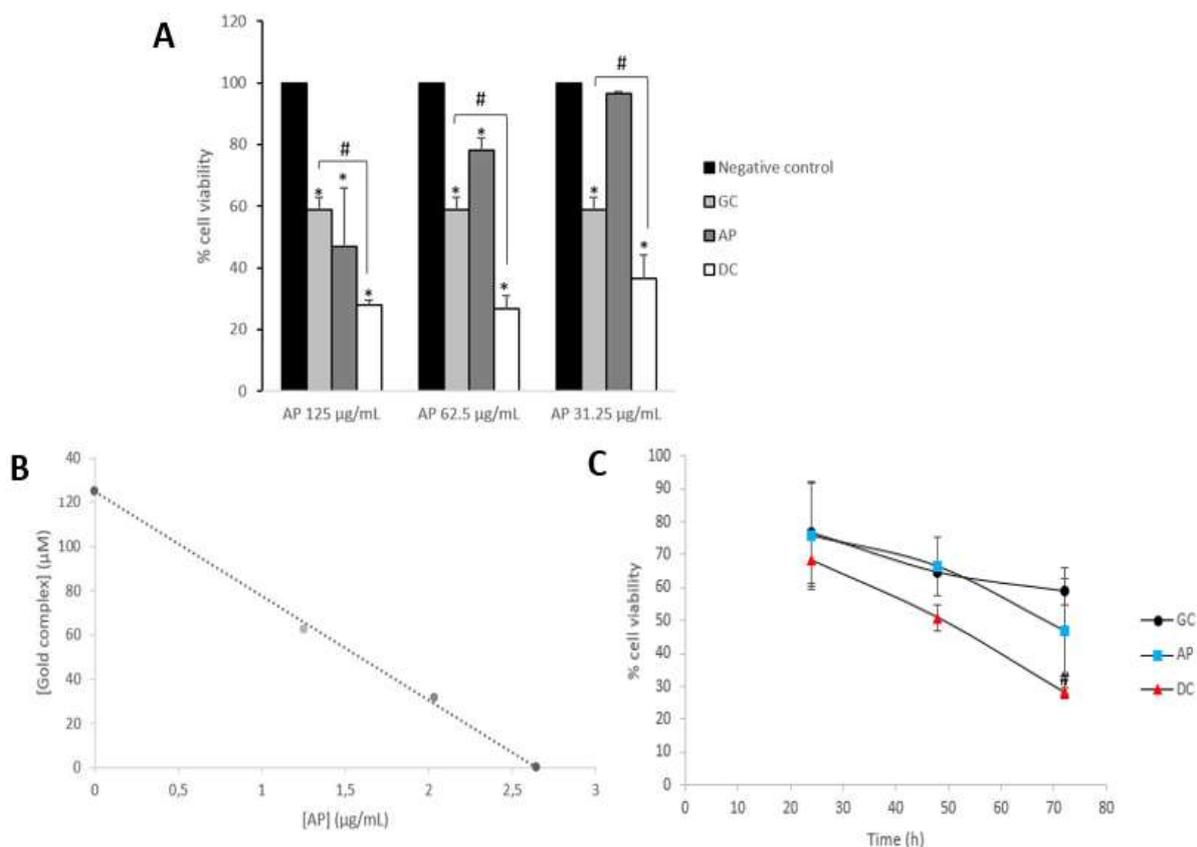
**Figura 52.** Medida del efecto antiproliferativo de **2a**, el extracto total de *Rosa canina* (TE), sus polifenoles neutros (NP) y sus polifenoles ácidos (AP), solos o en combinación con el complejo de oro, sobre células Caco-2 indiferenciadas tras 72h de incubación. \* $p < 0,05$  vs control negativo. # $p < 0,05$  vs complejo de oro.

**Tabla 10.** Concentraciones de los dos componentes de la combinación de fármacos (DC).

Componente	Concentración
[Au(C≡C-2-NC <sub>5</sub> H <sub>4</sub> )(PTA)] ( <b>2a</b> ) (GC)	3,80 $\mu$ M
Polifenoles ácidos (AP)	125 $\mu$ g/ml

A continuación, se estudió el efecto de la concentración de la fracción correspondiente a los polifenoles ácidos (AP) sobre la citotoxicidad del complejo de oro. Para ello, se incubaron células Caco-2 durante 72h con una cantidad fija del compuesto metálico, correspondiente a su IC<sub>50</sub>, con tres concentraciones de AP: 125, 62,5 y 31,25  $\mu$ g/ml respectivamente. En la Figura 53A puede apreciarse que, en los tres casos, la combinación de fármacos causó un descenso en la viabilidad del cultivo significativamente mayor ( $p < 0,05$ ) que el inducido en respuesta al tratamiento con el

complejo **2a** en solitario. Las combinaciones que contenían 125 y 62,5 µg/ml de AP dieron lugar a valores prácticamente idénticos del porcentaje de viabilidad celular ( $27,94 \pm 1,51$  y  $26,72 \pm 2,13$  respectivamente), mientras que el obtenido al utilizar una concentración de 31,25 µg/ml fue ligeramente más alto, aunque no significativamente diferente. Es interesante mencionar que, en este último caso, el tratamiento del cultivo con únicamente AP en ausencia de **2a** no dio lugar a modificaciones significativas de la viabilidad celular, es decir, a esta concentración AP carece de efecto antiproliferativo, aunque puede influir positivamente sobre la del derivado metálico.



**Figura 53.** Estudio preliminar del efecto conjunto de **2a** (GC) y los polifenoles ácidos de *Rosa canina* (AP). A) Medida de cambios en la viabilidad de un cultivo de células Caco-2 tras 72h de incubación con una concentración fija GC (3,8 µM) y tres concentraciones de AP (125, 62,5 y 31,25 µg/ml). \* $p < 0,05$  vs control negativo. # $p < 0,05$  vs GC. B) Análisis de la interacción farmacológica entre GC y AP realizado mediante isoblograma. C) Medida de cambios en la viabilidad de un cultivo de células Caco-2 tras 24, 48 o 72h de incubación con GC (3,8 µM), AP (125 µg/ml) o la combinación de ambos (DC). # $p < 0,05$  vs GC.

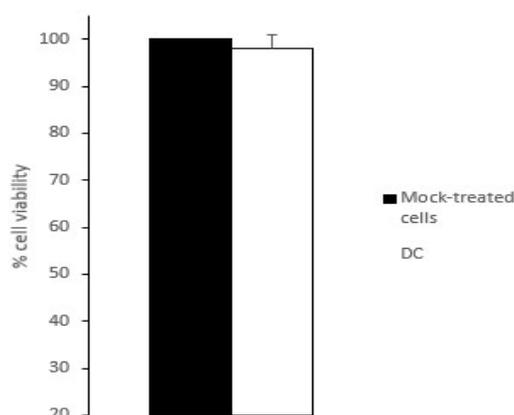
Cuando se combinan dos o más fármacos pueden darse tres tipos de interacciones farmacológicas diferentes. En primer lugar, se encuentra el antagonismo, según el cual el efecto de los fármacos en conjunto es menor que el de cada compuesto por separado. En segundo lugar, la sinergia, de acuerdo con la cual el efecto conjunto es mayor que el esperado al sumar sus efectos individuales. Finalmente, la situación más común es la de aditividad, supuesto en el que el efecto conjunto es la suma de los efectos individuales<sup>18</sup>.

En nuestro caso particular, los ensayos preliminares realizados hasta el momento habían permitido descartar una relación de antagonismo entre **2a** y la fracción rica en polifenoles ácidos (Figuras 52 y 53A). Por lo tanto, quedaban dos posibilidades. Para dilucidar esta alternativa, se decidió realizar un isoblograma mediante el modelo de Loewe, una aproximación que consiste en trazar una gráfica, representando el eje X la concentración de un fármaco y el eje Y la del otro. En el eje correspondiente se tomará el punto equivalente al IC<sub>50</sub> de cada fármaco y se trazará la recta que los une, en adelante denominada “línea de aditividad”. A continuación, se representarán en el gráfico resultante distintos puntos obtenidos a partir de la combinación de dos concentraciones de ambos fármacos, y su situación respecto a la línea de aditividad determinará el tipo de interacción farmacológica que se establece entre ambos. En caso de quedar por debajo de la línea, se trata de antagonismo; por encima, de sinergia; y, finalmente, los puntos que caigan sobre la línea representarán una interacción de tipo aditivo<sup>19</sup>.

Para trazar el isoblograma, fue necesario recalcular el IC<sub>50</sub> de **2a** en presencia de dos concentraciones de AP (62,5 y 31,25 µg/ml), obteniéndose dos nuevos valores: 1,25 y 2,04 µM respectivamente. La representación de estos puntos sobre la línea de aditividad permitió determinar que la relación que se establece entre ambos fármacos es de tipo aditivo (Figura 53B). De acuerdo con la hipótesis establecida por Ooko *et al.*<sup>20</sup> en su estudio relativo a la interacción farmacológica entre la curcumina y el ácido ascórbico sobre diferentes modelos tumorales, esta clase de interacción farmacológica era la esperable. Los autores sostienen que, para que se produzca una interacción de tipo sinérgico, es necesario que ambos fármacos actúen sobre la misma diana terapéutica, maximizándose así sus efectos. No obstante, un extracto vegetal contiene diferentes compuestos bioactivos, cada uno de los cuales actúa, por lo general, sobre una diana distinta; por ello, es esperable que entre compuestos naturales se establezcan interacciones de tipo aditivo. Aplicando esta hipótesis a nuestro caso de estudio concreto, los datos obtenidos parecen apuntar a que el complejo **2a** y la fracción de polifenoles ácidos (AP) de *Rosa canina* poseerían dianas terapéuticas distintas, lo que podría explicar por qué sus efectos biológicos no se anulan, pero tampoco se magnifican.

El último de estos ensayos preliminares se realizó con el fin de determinar el tiempo de incubación óptimo de cara a estudiar el posible mecanismo de acción de la combinación de fármacos. Así, se analizó el efecto sobre la viabilidad de un cultivo de células Caco-2 durante 24, 48 y 72h de incubación con **2a** (3,8 µM) y AP (125 µg/ml). En la Figura 53C puede observarse que la combinación de fármacos causa un efecto significativamente mayor ( $p < 0,05$ ) que **2a** administrado en solitario pasadas 72h de incubación. Por ello, se consideró que la maquinaria molecular que desencadenaba el efecto conjunto comenzaba a funcionar antes de dicho tiempo, y, por consiguiente, se decidió estudiar el tipo de muerte celular, entre otros parámetros, a tiempos de incubación más bajos.

En vista de la considerable acción antiproliferativa de la combinación de fármacos (DC), consideramos necesario evaluar su efecto sobre un modelo no tumoral, puesto que, si se pusiese en peligro la integridad de los tejidos sanos, esta nueva combinación quedaría descartada de inmediato como posible cóctel quimioterapéutico. Por consiguiente, se analizó la viabilidad de un cultivo de células Caco-2 diferenciadas tras 72h de exposición a la combinación de fármacos. De acuerdo con los datos mostrados en la Figura 54, no se encontraron diferencias significativas respecto al control negativo, un dato preliminar que, pese a ser necesario validarlo sobre un modelo animal, sugería que DC podría actuar de forma selectiva frente al tejido tumoral. Este efecto podría estar mediado, quizá, por la acción antioxidante de los polifenoles, que podrían proteger a los enterocitos frente a un posible daño oxidativo causado por la exposición al complejo **2a**, de acuerdo con datos previos obtenidos con cócteles compuestos por cisplatino y extractos vegetales<sup>21,22</sup>. Esta suposición se apoya sobre el hecho de que, al administrar el derivado metálico junto con los polifenoles ácidos de *Rosa canina*, se aumenta la reproducibilidad en comparación con los datos previamente mostrados en la Figura 26 (ver Capítulo 1).



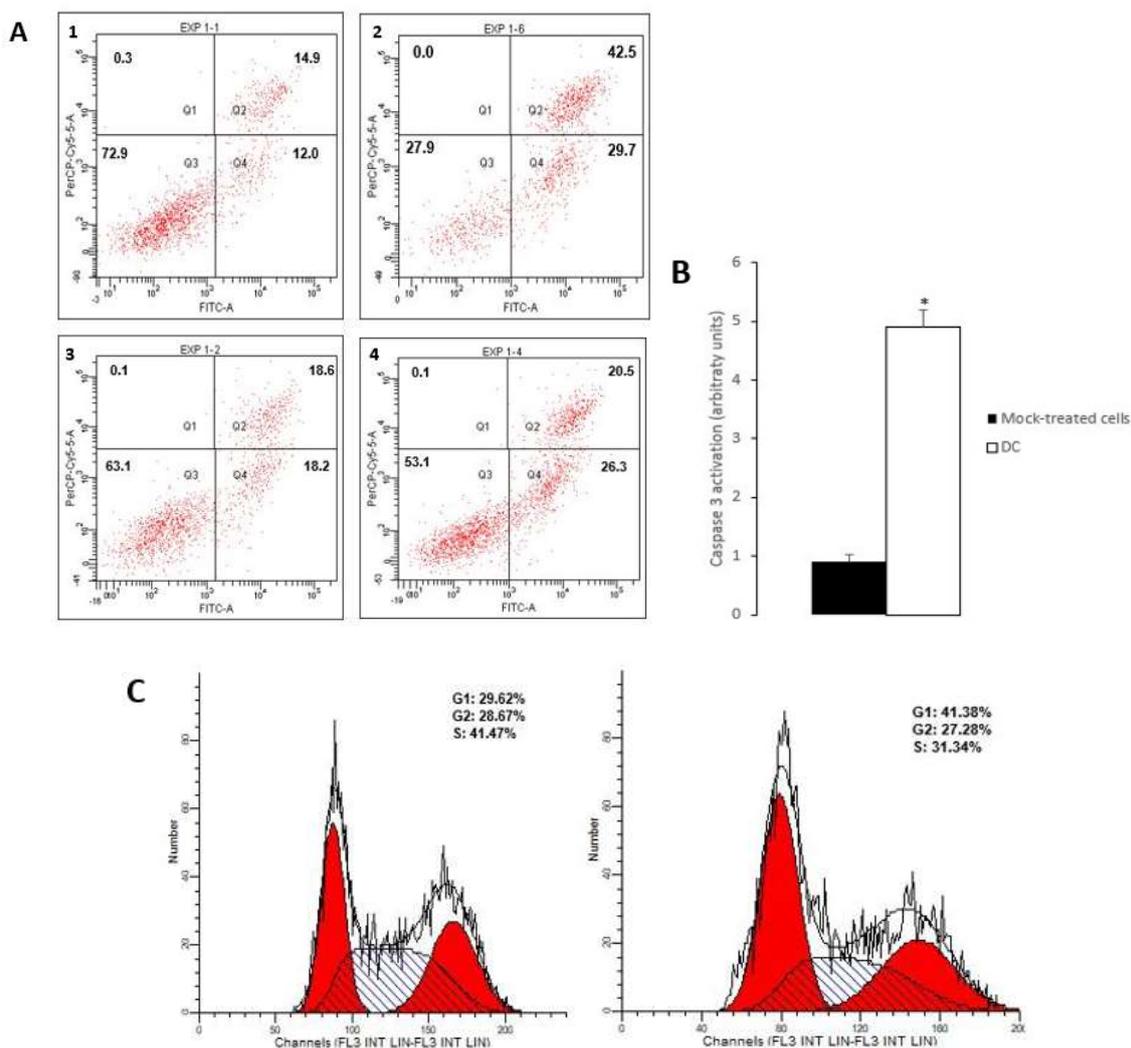
**Figura 54.** Estudio de la toxicidad sobre un modelo *in vitro* de la mucosa intestinal. Efecto de 72h de incubación con la combinación de fármacos (DC) en la línea Caco-2 diferenciada.

Dados por concluidos los estudios preliminares al determinar que los polifenoles ácidos podían aumentar el efecto terapéutico de  $[\text{Au}(\text{C}\equiv\text{C}-2\text{-NC}_5\text{H}_4)(\text{PTA})]$  (**2a**) sin alterar su selectividad, se procedió a analizar el tipo de muerte celular inducida por la combinación de fármacos. Antes de analizar las poblaciones necróticas y apoptóticas, había varios puntos a tener en cuenta. El primero de ellos, que **2a** por sí solo ya es capaz de inducir cambios significativos en la viabilidad, así como necroptosis, tras 24h de incubación, mientras que los polifenoles ácidos requieren de un mayor tiempo de tratamiento para desencadenar la muerte celular, que en este caso es apoptosis, de acuerdo con los datos recabados por Jiménez *et al.*<sup>14</sup> A raíz de estos resultados previos, resultaba complicado establecer una hipótesis inicial acerca del tipo de muerte predominante. Por un lado, existen evidencias acerca de la capacidad de un único agente quimioterapéutico de inducir simultáneamente apoptosis y necroptosis<sup>23,24</sup>,

aunque quizá resulte más interesante, por proximidad a nuestro estudio actual, el trabajo realizado por Pietkiewicz *et al.*<sup>25</sup> En este estudio, los autores utilizaron una combinación del ligando del receptor mortal CD95 y el análogo de nucleósidos gemcitabina para desencadenar la muerte de un modelo de cáncer de páncreas (línea SUIT-020) vía necroptosis y apoptosis. De acuerdo con dicho trabajo, resultaba plausible que una combinación de fármacos como la nuestra pudiese provocar el inicio de ambos tipos de muerte al mismo tiempo.

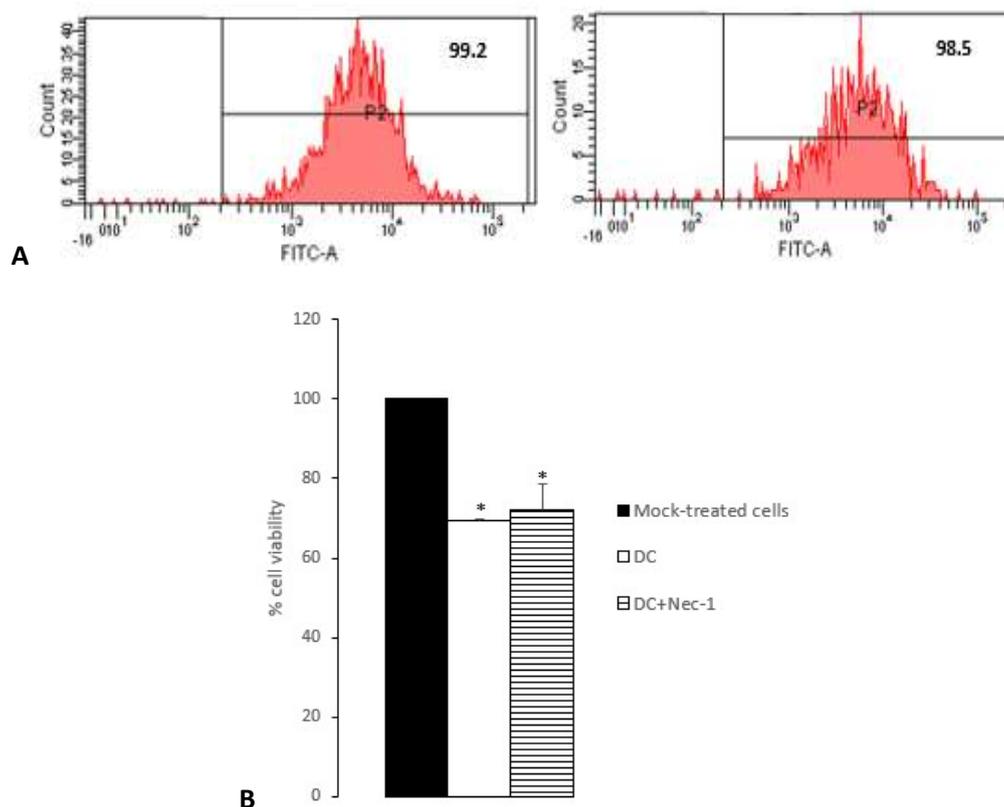
Se llevó a cabo una doble tinción anexina V-FITC y yoduro de propidio para analizar la capacidad de ambos agentes administrados conjuntamente de inducir apoptosis y/o necrosis. Tras 48h de incubación con la combinación de fármacos, se encontró un aumento de 2,5 veces en la población celular en apoptosis temprana y un incremento de 2,8 veces en la población en apoptosis tardía en comparación con el control negativo, sin verse modificada la población necrótica. Tras el mismo tiempo de incubación, no se produjo ningún cambio destacable en las poblaciones apoptóticas de los cultivos tratados con cada fármaco por separado, lo cual sugiere que el efecto pro-apoptótico observado es consecuencia directa de la combinación de ambos (Figura 55A). Además, se encontró un aumento del 5,4 en la activación de la caspasa 3 (Figura 55B), que junto con el incremento de células en fase G<sub>1</sub> del ciclo celular (Figura 55C), permitió concluir que la combinación de fármacos causaba la muerte de las células Caco-2 por apoptosis a las 48h de incubación.

No obstante, no debemos perder de vista lo desarrollado en el capítulo anterior acerca de la ineficacia a la hora de diferenciar entre células en apoptosis tardía y necroptosis<sup>26</sup>. Para determinar si este incremento de 2,8 veces en la población en apoptosis tardía en respuesta al tratamiento con la combinación de fármacos (Figura 55A, panel 2) se correspondía efectivamente con esta clase de muerte o bien se trataba de necroptosis mal clasificada, se midió la activación de la proteína RIP-1 tras 24h de incubación con ambos agentes. Este tiempo fue escogido ya que previamente se había observado un aumento significativo de este parámetro al caracterizar el efecto biológico de **2a** (ver Capítulo 1, pág. 143; Figura 42A). No obstante, al tratar el cultivo no solo con el complejo de oro sino además con los polifenoles ácidos, no se encontraron cambios significativos respecto al control negativo (Figura 56A). Esto podría sugerir que la proteína RIP-1 no se activa en respuesta al tratamiento con la combinación de fármacos utilizada.



**Figura 55.** Estudio del tipo de muerte celular inducida por la combinación de fármacos (DC) tras 48h de incubación sobre células Caco-2. A) Estudio de las poblaciones apoptóticas y necróticas tras ser tratadas con 1) DMSO (control negativo; 3,5 mM); 2) DC; 3) **2a** (GC); 4) polifenoles ácidos (AP). B) Medida de la activación de la caspasa 3. \* $p < 0,05$  vs control negativo. C) Análisis del número de células (indicado en porcentajes) en cada fase del ciclo celular tras la incubación con DMSO (panel izquierdo) o DC (panel derecho).

Para confirmar estos datos, se pre-incubó el cultivo con Nec-1 antes de realizar el tratamiento con ambos agentes. De acuerdo con los datos mostrados en la Figura 56B, el inhibidor de la necroptosis no modificó la capacidad antiproliferativa de la combinación de fármacos respecto a una muestra que no había recibido el pre-tratamiento. Por consiguiente, aunque cuando **2a** es utilizado como fármaco único puede inducir necroptosis, al ser administrado junto con los polifenoles ácidos de *R. canina* esta capacidad se pierde en favor de la activación de la maquinaria apoptótica.



**Figura 56.** Estudio de la inducción de necroptosis sobre células Caco-2 tras 24h de incubación con la combinación de fármacos (DC). A) Medida de la activación de la proteína RIP-1 tras el tratamiento con DMSO (control negativo; 3,5 mM) (panel izquierdo) o DC (panel derecho). B) Análisis de la viabilidad celular tras el tratamiento con DC en ausencia o presencia del inhibidor de necroptosis Nec-1 (50  $\mu$ M, 1h). \* $p < 0,05$  vs control negativo.

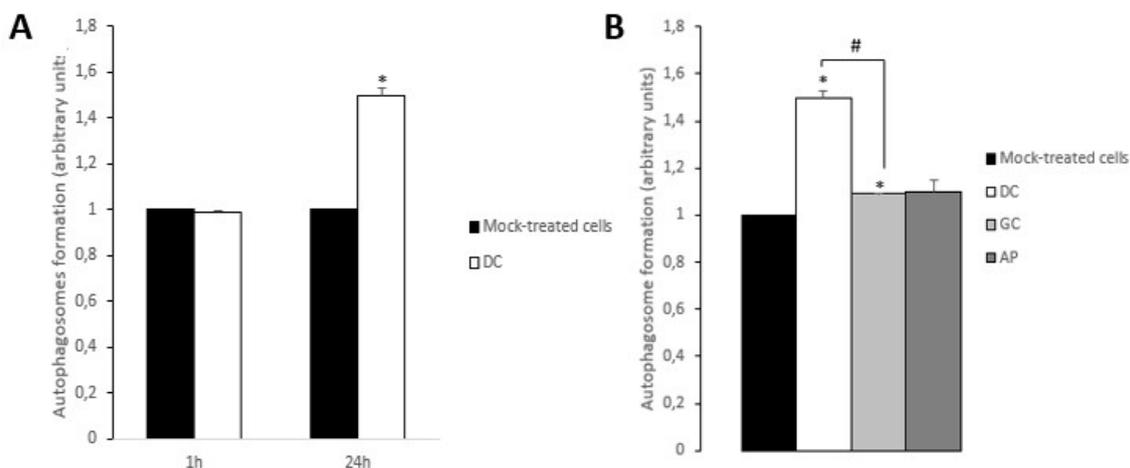
Ya en el capítulo anterior, se ha discutido acerca de la estrecha relación entre los diversos tipos de muerte celular. En concreto, se mostró cómo el complejo **2a** podía causar la muerte por apoptosis al bloquearse farmacológicamente la necroptosis con Nec-1 (ver Capítulo 1, pág. 146; Figura 44). De acuerdo con estos datos previos, los resultados mostrados en la Figura 55 podrían ser consecuencia de un bloqueo de la necroptosis causado por los polifenoles ácidos de *R. canina*, de manera análoga al efecto que tiene Nec-1 al impedir la activación de RIP-1 y, con ello, la necroptosis. En un interesante trabajo desarrollado sobre un modelo animal de inducción de epilepsia, Wang *et al.*<sup>27</sup> observaron que el uso del polifenol curcumina podía bloquear la necroptosis, reduciendo así la tasa de muerte celular y daños en el hipocampo del animal. Esta capacidad de inhibir la necroptosis estaba mediada por un aumento de la autofagia, que actuaba presumiblemente en su vertiente citoprotectora, retirando las estructuras celulares dañadas para evitar la inducción de necroptosis. Aunque debe tenerse en cuenta que estos estudios no fueron realizados sobre un modelo tumoral, sí ponen el foco sobre una posible intervención de la autofagia en nuestro caso concreto, ya que, además, existen otras evidencias acerca del papel protector de la autofagia que tienen como consecuencia el bloqueo de la necroptosis, si bien el objetivo sigue siendo

promover la supervivencia celular<sup>28</sup>. Por otra parte, se ha reportado en numerosas ocasiones la capacidad de los extractos, así como de fitocomponentes aislados, de iniciar la autofagia como parte de su mecanismo de acción antitumoral<sup>29-31</sup>. Esto nos hizo suponer que el uso de los polifenoles ácidos de la *Rosa canina* podría estimular la inducción de autofagia, lo que podría bloquear la necroptosis causada por el complejo metálico; a causa de este bloqueo, se forzaría la muerte por apoptosis de forma análoga a como se describió en la Figura 44 (ver Capítulo 1, pág. 146).

Para comprobar esta hipótesis, se estudió la formación de autofagosomas en respuesta al tratamiento con la combinación de fármacos, puesto que es uno de los primeros eventos del proceso autofágico<sup>32</sup> (ver apartado 1.2, pág. 41; Figura 10). A la hora de diseñar este experimento, se escogieron dos tiempos de incubación: 1 y 24h. Esta decisión estaba motivada por los resultados previos obtenidos con **2a** en solitario, según los cuales se encontraron evidencias de la inducción de necroptosis ya a las 24h (ver Capítulo 1, pág. 143; Figura 42). Por tanto, en caso de que los polifenoles ácidos fuesen capaces de bloquear el proceso necroptótico mediante autofagia, esta vía tendría que iniciarse antes de las 24h, motivo por el cual se escogió un tiempo de exposición tan corto como 1h. La Figura 57A muestra que, si bien a este tiempo tan breve no se modificó la formación de autofagosomas, tras 24h sí se observó un incremento significativo ( $p < 0,05$ ), que podría indicar que la autofagia se ha iniciado en un momento por determinar entre la primera hora y las 24h de incubación.

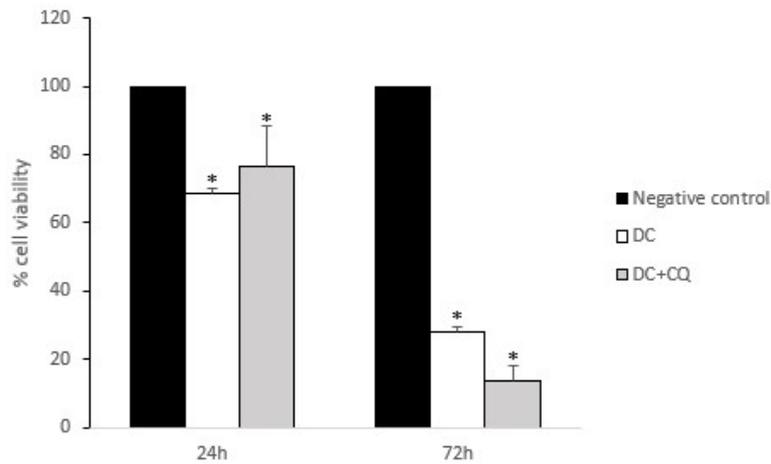
A la vista de estos resultados, consideramos necesario comprobar si este efecto lo producía exclusivamente la combinación de fármacos o si bien alguno de sus componentes podía causarlo al ser administrado de manera individual. Tras 24h de incubación, el tratamiento con polifenoles ácidos no causó ningún cambio respecto al control negativo, mientras que  $[\text{Au}(\text{C}\equiv\text{C}-2\text{-NC}_5\text{H}_4)(\text{PTA})]$  (**2a**) sí fue capaz de incrementar significativamente ( $p < 0,05$ ) la producción de autofagosomas, aunque el efecto causado por la combinación de fármacos era mucho más destacable (Figura 57B). La capacidad de **2a** de estimular la activación de la autofagia podría ser una respuesta de la célula para evitar la muerte causada por el fallo mitocondrial, de forma similar al incremento en la expresión de la TrxR y la tioredoxina observado en respuesta al tratamiento con **1a** (ver Capítulo 1, pág. 140; Figura 39). Dado que el principal cometido de la autofagia es promover la supervivencia celular, eliminando para ello estructuras dañadas que pudiesen comprometer la integridad de la célula, es razonable suponer que este proceso se active para retirar las mitocondrias dañadas por la formación de agregados de **2a** en su interior, aunque este parece ser un esfuerzo vano a la hora de frenar la muerte por necroptosis, de acuerdo con los resultados del capítulo anterior. No obstante, al ser administrado el derivado metálico junto con los polifenoles ácidos, la inducción de autofagia parece verse fuertemente estimulada. Es desconocido, por el momento, el estímulo que promueve el inicio del proceso, pero en este punto resulta indudable que es consecuencia de la administración conjunta de ambos fármacos. Puede asumirse, así

mismo, que es la inducción de autofagia la responsable del bloqueo de la necroptosis observado.



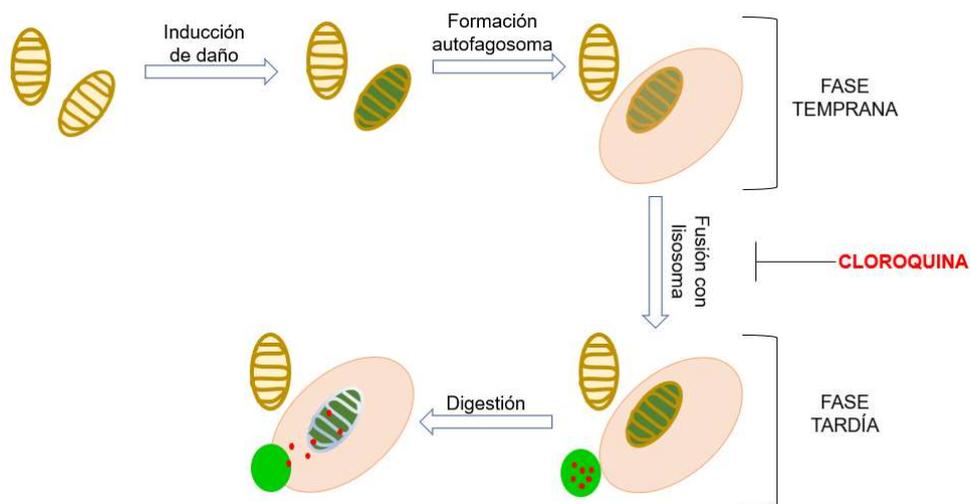
**Figura 57.** Estudio de la formación de autofagosomas en células Caco-2. A) Medida de la formación de autofagosomas tras 1 ó 24h de incubación con la combinación de fármacos (DC). \* $p < 0,05$  vs control negativo. B) Medida de la formación de autofagosomas tras 24h de incubación con **2a** (GC), los polifenoles ácidos (AP) o DC. \* $p < 0,05$  vs control negativo. # $p < 0,05$  vs GC.

Aunque los resultados mostrados en la Figura 57 revelaban un aumento de la inducción de autofagia en respuesta al tratamiento con la combinación de fármacos, dada la dualidad citoprotectora y citotóxica de este proceso previamente desarrollada<sup>33,34</sup>, se planteó la siguiente pregunta: ¿el bloqueo de la autofagia favorecería o entorpecería la muerte celular causada por la combinación de fármacos? De acuerdo con la hipótesis seguida hasta el momento, la autofagia podría ser la responsable del bloqueo de la necroptosis y la subsiguiente muerte vía apoptosis, según lo cual podría deducirse que se trata de un mecanismo de autopreservación que sale mal. En este sentido, añadir un tercer componente a la combinación de fármacos cuyo objeto fuese inhibir la autofagia citoprotectora podría incrementar la eficacia terapéutica del mismo al evitar que la célula pudiese eliminar parte de los daños producidos por efecto del tratamiento. En tal caso, debería producirse un aumento en la apoptosis debido a la acumulación de daños y quizá un desbloqueo de la necroptosis que también podría contribuir al efecto antiproliferativo de ambos agentes. Esta hipótesis se apoya en el éxito obtenido por algunos investigadores al aumentar la eficacia del cisplatino sobre varias líneas celulares inhibiendo farmacológicamente la autofagia<sup>35,36</sup>. Así pues, se realizó una pre-incubación con el inhibidor de autofagia cloroquina (CQ) y se midió la viabilidad del cultivo tras 24 y 72h de incubación con la combinación de fármacos. Sin embargo, no se encontraron cambios significativos con respecto al tratamiento en ausencia de cloroquina (Figura 58).



**Figura 58.** Medida de la viabilidad de un cultivo de células Caco-2 tras una pre-incubación con cloroquina (CQ) (10  $\mu$ M, 1h) y 24 ó 72h de incubación con la combinación de fármacos (DC). \* $p < 0,05$  vs control negativo.

Estos resultados plantearon una tercera posibilidad que no se había considerado hasta el momento. Según puede observarse en el esquema que se muestra en la Figura 59, la cloroquina inhibe la etapa tardía de la autofagia al bloquear la fusión de autofagosoma y lisosoma<sup>37</sup>. De acuerdo con los datos de la Figura 57, podemos suponer que la fase temprana, en la que se forma el autofagosoma, se ha completado, pero dado el efecto no significativo de la CQ (Figura 58), cabe la posibilidad de que la etapa tardía no tenga lugar. Es decir, los resultados hasta el momento parecen apuntar hacia una ausencia de fusión entre lisosoma y autofagosoma.



**Figura 59.** Efecto de la cloroquina sobre el flujo autofágico.

En el apartado 1.2 se ha mencionado la relación entre autofagia y apoptosis, pero siempre considerando que el flujo autofágico se completaba, dejando a un lado lo que puede ocurrir cuando este proceso se interrumpe. La ausencia de fusión entre un

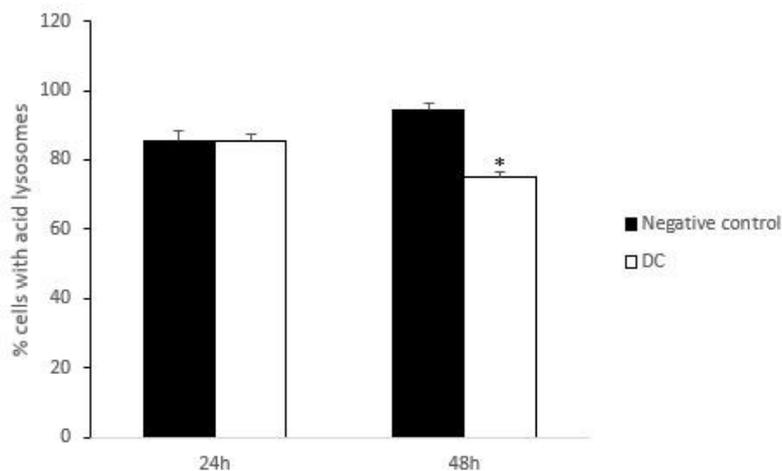
autofagosoma maduro y un lisosoma se ha estudiado con gran detalle en modelos neuronales, puesto que el bloqueo de la autofagia parece ser la causa subyacente a varias enfermedades neurodegenerativas, entre ellas el Parkinson y el Alzheimer. En este contexto, la muerte neuronal estaría causada por fallos en la función lisosomal que impiden la degradación de estructuras dañadas vía autofagia, una ruta metabólica clave para la supervivencia de la neurona<sup>38,39</sup>. Tan relevantes son estos descubrimientos que se ha llegado a proponer que la muerte celular causada específicamente por el bloqueo de la autofagia debería ser considerado un nuevo e independiente tipo de muerte celular: la **karyoptosis**. A nivel morfológico, la karyoptosis comparte las características típicas de la apoptosis, incluyendo encogimiento celular y degeneración del núcleo, aunque no se forman los cuerpos apoptóticos<sup>40</sup>. A pesar de que el concepto de karyoptosis es muy reciente y no ha calado del todo en la comunidad científica, especialmente por todos los interrogantes que aún rodean a este proceso, sí se han encontrado interesantes hallazgos en relación al bloqueo de la autofagia y la muerte de la célula sobre modelos no neuronales. Uno de los más relevantes es el que hace alusión al papel clave de los lisosomas en el proceso. Se ha observado que el daño producido por exposición a cadmio en tejidos sanos podría estar mediado por un fallo en la función de los lisosomas que impide la fase tardía de la autofagia, con la consecuente falta de eliminación de las estructuras celulares dañadas vía autofagia<sup>27,41</sup>. En cuanto a su implicación en quimioterapia, es posible inducir la muerte a las células tumorales a través del bloqueo del flujo autofágico, dado que al no destruirse adecuadamente el contenido de los autofagosomas se promueve la muerte celular<sup>42-44</sup>.

En relación con este último punto, destacan los datos de Pan *et al.*<sup>42</sup> por su similitud con los aquí descritos. En el citado trabajo, los autores analizaron el potencial antitumoral de un extracto vegetal sobre un modelo de cáncer de colon (líneas HT-29 y HCT-116). Los autores observaron que, si bien un inhibidor de la fase temprana de la autofagia reducía los daños causados por el tratamiento, la cloroquina los potenciaba. Llegaron así a la conclusión de que la muerte celular podría estar mediada por interferencias en fusión entre autofagosomas y lisosomas, y añadir al cóctel farmacológico un segundo inhibidor contribuía a promover la inducción de apoptosis. A pesar de que en nuestro caso concreto de estudio no hemos encontrado diferencias significativas entre el cultivo tratado o no con cloroquina, sí puede apreciarse un ligero descenso en la viabilidad celular al añadir este compuesto a las células (Figura 53), lo que podría ser comparable con los datos obtenidos por Pan *et al.*<sup>42</sup> Por tanto, los resultados recabados hasta el momento parecen apuntar al bloqueo del flujo autofágico como posible mecanismo a través del cual la combinación de fármacos induce apoptosis en células Caco-2.

Se ha mencionado someramente que una de las posibles causas tras el bloqueo de la fusión entre autofagosoma y lisosoma sería la disfunción de este último, de acuerdo con resultados obtenidos sobre tejidos sanos. Esta disfunción se traduce en un aumento de

la alcalinización del interior del lisosoma, que impediría el funcionamiento de las proteasas lisosomales<sup>27</sup>. También sobre modelos tumorales se han obtenido datos similares. He *et al.*<sup>45</sup> observaron que el tratamiento de células de cáncer de páncreas con el compuesto bioactivo alantolactona daba lugar a un descenso en la expresión y la actividad de las catepsinas B y D, ambas implicadas en la correcta función lisosomal y cuya ausencia se ha correlacionado con enfermedades como la diabetes o trastornos neurodegenerativos<sup>46,47</sup>. Por su parte, Stamelos *et al.*<sup>48</sup> encontraron un modo de acción diferente que condujo al mismo resultado. En su estudio acerca del papel antitumoral de un mimético de la proteína BH3 denominado obatoclax, observaron que este compuesto alteraba la función lisosomal al acumularse en el interior de este orgánulo y causar su alcalinización. La pérdida de su pH ácido se correspondía con una pérdida de su función, causando así el bloqueo de la autofagia.

Por consiguiente, decidimos evaluar una posible alcalinización de los lisosomas tras el tratamiento con la combinación de fármacos, como medida de la función lisosomal, inspirándonos en los experimentos diseñados por Stamelos *et al.*<sup>48</sup> Se escogieron dos tiempos de incubación, 24 y 48h, y se observó que la pérdida de acidificación del lisosoma era un proceso dependiente del tiempo, puesto que tras 24h no se encontraron cambios significativos, aunque sí se observaron pasadas 48h (Figura 60). Estos datos sugieren que el malfuncionamiento de los lisosomas podría ser el responsable del bloqueo del flujo autofágico observado.



**Figura 60.** Medida de la acidificación de los lisosomas de un cultivo de células Caco-2 tras 24 y 48h de incubación con la combinación de fármacos (DC). \* $p < 0,05$  vs control negativo.

Resulta llamativo que la formación de los autofagosomas comience antes de que se encuentren evidencias de la disfunción lisosomal (24 y 48 horas respectivamente). Si además consideramos que tras 24h ya se observa un descenso significativo en la viabilidad celular, los datos obtenidos podrían indicar que la alcalinización del lisosoma y el consiguiente bloqueo de la autofagia no son el principal mecanismo de acción de la combinación de fármacos. De acuerdo con este razonamiento, la disfunción lisosomal

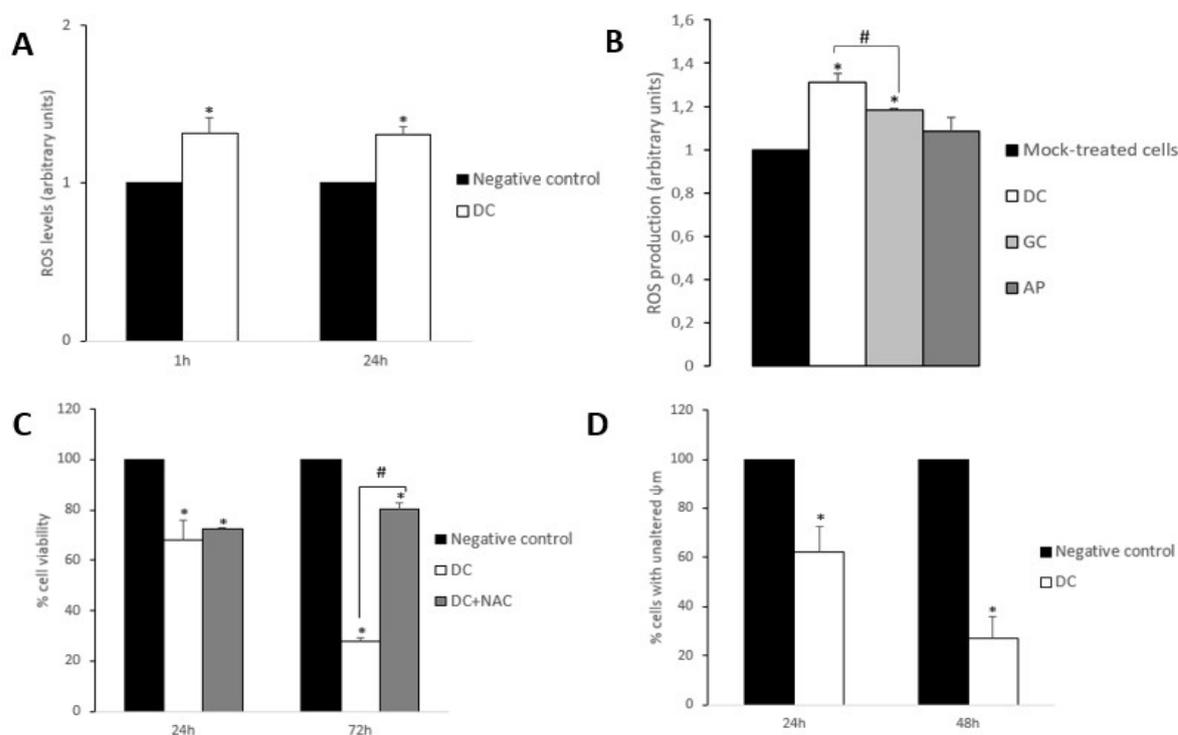
sería una consecuencia secundaria del tratamiento con la combinación de fármacos. Este modelo se vería apoyado por los descubrimientos llevados a cabo sobre modelos de enfermedades neurodegenerativas, en los cuales se indagó acerca de la estrecha relación entre mitocondria y lisosoma. Se observó que la pérdida de función mitocondrial tenía entre sus consecuencias más notorias la disfunción lisosomal. Curiosamente, los autores del trabajo encontraron que esta relación se basaba no tanto en los cambios que se producían en la dinámica mitocondrial en sí, sino en la producción descontrolada de ROS que tenía lugar al interrumpirse la función mitocondrial normal<sup>49</sup>.

Puesto que en nuestros ensayos previos se determinó que el complejo **2a** era capaz de entrar en la mitocondria y alterar su función normal (ver Capítulo 1, págs. 150 y 151; Figuras 48 y 49), así como causar una ruptura de la homeostasis redox (ver Capítulo 1, pág. 148; Figura 46), se vio necesario determinar si esta capacidad de inducir la producción de ROS se mantenía indemne en presencia de los polifenoles ácidos. En la Figura 61A se observa un rápido incremento en los niveles de ROS (1h de incubación) que se mantiene constante tras 24h de exposición al tratamiento. Estos datos sugieren que la producción aberrante de ROS podría ser la causa de la pérdida de función del lisosoma previamente descrita.

Al evaluar los niveles de radicales libres intracelulares tras la incubación con cada uno de los componentes de la combinación de fármacos administrados de forma individual, encontramos que los polifenoles ácidos no causaban cambios significativos, pero que la combinación de fármacos inducía una mayor producción de ROS que el complejo metálico por sí solo (Figura 61B). Esto implica que, aunque los polifenoles ácidos no son capaces de inducir un efecto pro-oxidante por sí solos, sí parecen potenciar el del complejo **2a**. Dado que en los apartados 1.1 y 1.4 se ha discutido acerca de la relevancia del potencial antioxidante de los polifenoles<sup>21,22,50</sup>, podría resultar incoherente sugerir que potencian el efecto prooxidante del derivado metálico. No obstante, se ha observado que los polifenoles pueden mostrar un comportamiento dual antioxidante-prooxidante dependiendo de varios factores, entre los que destacan su concentración y el tipo de célula (tumoral o no tumoral)<sup>51</sup>.

Se cree que esta dualidad es la responsable de que puedan actuar tanto a nivel de prevención como en el tratamiento de los tumores; sobre el tejido sano, su acción antioxidante podría reducir un exceso de daño oxidativo en el ADN, disminuyendo el riesgo de transformación tumoral, mientras que estudios llevados a cabo sobre modelos tumorales sugieren que la inducción de ROS podría ser uno de los principales mecanismos responsables a través de los cuales los extractos vegetales producen la muerte de la célula cancerígena. En un interesante estudio realizado sobre un modelo animal, Pillion *et al.*<sup>52</sup> concluyeron que los extractos vegetales podían causar muerte celular tanto dependiente como independiente de la generación de estrés oxidativo. Los autores evaluaron el potencial anticancerígeno de dos extractos vegetales distintos, la

citronela y el té blanco. Ambos causaban una reducción efectiva de la masa tumoral mediante la inducción de apoptosis, pero mientras que la citronela promovía una apoptosis dependiente de ROS, el extracto de té blanco no era capaz. La explicación más probable reside en la diferente composición en polifenoles de ambos extractos. Otros autores han sugerido que el efecto pro-oxidante que presentan algunos extractos podría estar detrás de la re-sensibilización al cisplatino que se ha encontrado al administrarlo conjuntamente con extractos vegetales<sup>53</sup>. En definitiva, aunque los polifenoles ácidos de *Rosa canina* no muestren un claro efecto sobre los niveles de ROS tras 24h de incubación, todo parece apuntar que sí son capaces de potenciar el efecto pro-oxidante de **2a**, lo que podría guardar relación con el mayor efecto antiproliferativo de la combinación de fármacos en comparación con el del derivado metálico administrado de manera individual.



**Figura 61.** Estudio de la producción de ROS y la función mitocondrial de un cultivo de células Caco-2. A) Medida de los niveles de ROS tras 1 y 24h de incubación con la combinación de fármacos (DC). \* $p < 0,05$  vs control negativo. B) Medida de los niveles de ROS tras 24h de incubación con **2a** (GC), los polifenoles ácidos (AP) o DC. \* $p < 0,05$  vs control negativo. # $p < 0,05$  vs GC. C) Análisis de la viabilidad celular tras 24 y 72h de incubación con DC en presencia o ausencia de NAC (1h, 3mM). \* $p < 0,05$  vs control negativo. # $p < 0,05$  vs ausencia de NAC. D) Estudio de la pérdida del potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\psi$ ) tras 24 y 48h de incubación con DC \* $p < 0,05$  vs control negativo.

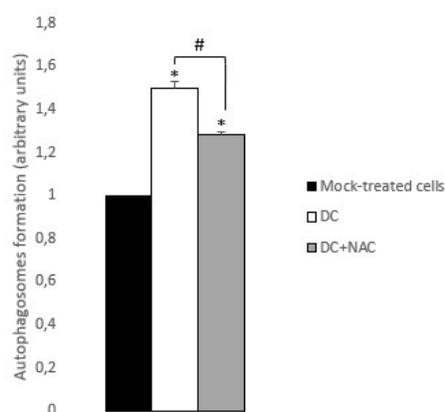
Para determinar si la ruptura de la homeostasis redox era un paso necesario para la inducción de apoptosis, se analizó la viabilidad del cultivo tras 24 y 72h de incubación

con la combinación de fármacos en presencia del antioxidante N-acetil-cisteína (NAC), de forma similar a como se hizo previamente en el estudio del mecanismo de acción de **2a** (ver Capítulo 1, pág. 148; Figura 46B). En la Figura 61C puede observarse que el uso de NAC no supone ningún cambio tras 24h de incubación, pero pasadas 72h sí protege parcialmente de los daños inducidos por la combinación de fármacos. Estos resultados sugieren que la inducción de ROS podría tener un gran peso sobre el proceso apoptótico, pero no ser su única causa. Es decir, parece que existe un mecanismo secundario independiente de los niveles de ROS que estimula la muerte celular causada por la combinación de fármacos. En este aspecto, nuestros resultados podrían correlacionarse con los previamente encontrados por Quin *et al.*<sup>54</sup> al incubar células HepG2 (hepatocarcinoma humano) con el fármaco artesunato. Los autores describieron que el tratamiento inducía apoptosis intrínseca y un incremento en los niveles de ROS, si bien la pre-incubación con antioxidantes no modificaba el descenso en la viabilidad celular. De acuerdo con estos datos, no resulta descabellado suponer que, en la inducción de apoptosis mediada por nuestra combinación de fármacos, exista un fuerte componente dependiente de ROS y uno minoritario independiente de las mismas.

En último lugar, se consideró que los datos obtenidos hasta el momento parecían apuntar a un fallo en la función mitocondrial. Para determinarlo, se analizó la integridad de este orgánulo estudiando cambios en el potencial de membrana mitocondrial tras 24 y 48h de incubación, los mismos tiempos que se habían escogido anteriormente para estudiar la acidificación lisosomal. Pasadas las primeras 24h de tratamiento, ya se observa un descenso significativo ( $p < 0,05$ ) en el número de células que mantienen intacto su  $\Delta\psi$ , y esta disminución es más pronunciada tras 48h de incubación (Figura 61D). La pérdida de función mitocondrial parece tratarse, por consiguiente, de un fenómeno dependiente del tiempo. Los resultados aquí mostrados sugieren que la pérdida de la integridad mitocondrial es un paso previo a la alcalinización del lisosoma (Figura 60), tal como sugería la literatura preexistente<sup>49</sup>.

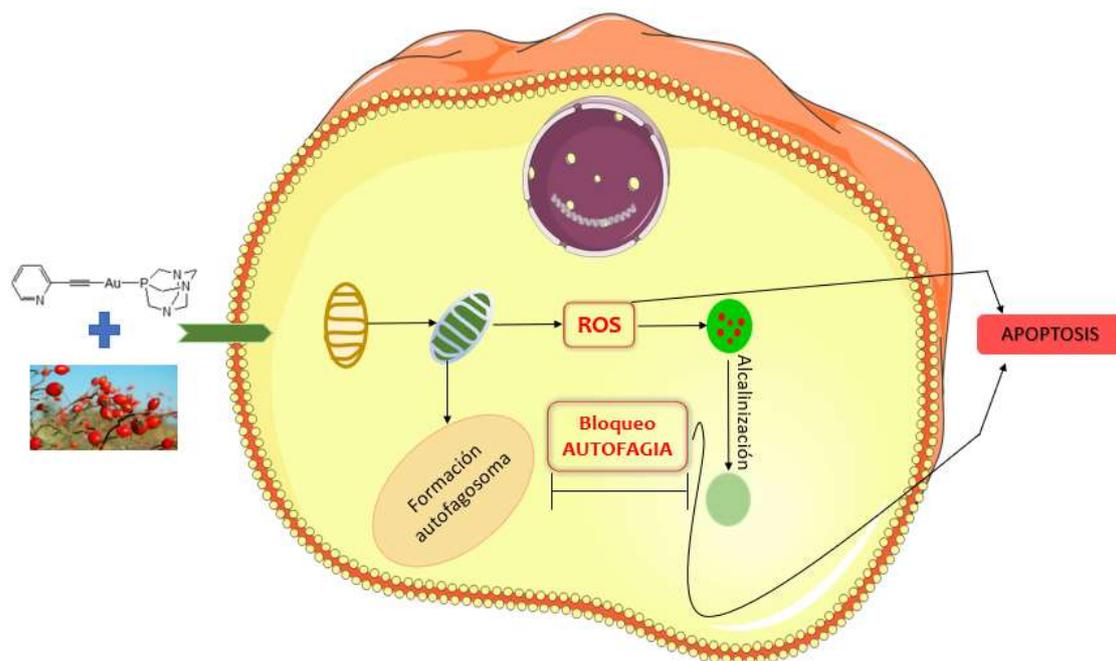
De acuerdo con todos los datos obtenidos hasta el momento, el principal desencadenante de la muerte celular, si bien no el único, parece ser la ruptura del equilibrio redox causada tras solo 1h de incubación con la combinación de fármacos. Esto provoca una disfunción mitocondrial, lo que podría causar un aumento de la autofagia en respuesta para tratar de eliminar los orgánulos dañados y sobrevivir al tratamiento. Existen dos razones en las que se apoya que la pérdida de la función mitocondrial podría desencadenar una autofagia citoprotectora. La primera de ellas es la existencia de la **mitofagia**, un tipo concreto de autofagia que lleva a cabo una eliminación selectiva de las mitocondrias dañadas mediante su traslado al autofagosoma. La maquinaria molecular que controla este proceso se pone en marcha en respuesta a la despolarización de la mitocondria, siendo en apariencia independiente de las fluctuaciones en los niveles de ROS<sup>55,56</sup>. Además de contar con un mecanismo para eliminar específicamente a las mitocondrias cuyo  $\Delta\psi$  se ha alterado, la autofagia general

o **macroautofagia** sí se correlaciona con un aumento en los niveles intracelulares de ROS, puesto que los daños que se generan en consecuencia promueven la formación de los autofagosomas<sup>57,58</sup>. A raíz del papel de las especies reactivas de oxígeno en la formación de autofagosomas, se evaluó este parámetro tras una pre-incubación con NAC y 24h de exposición a la combinación de fármacos. Se encontró un descenso significativo ( $p < 0,05$ ) en la formación de autofagosomas en comparación con el cultivo al que no se le administró NAC, aunque la presencia de este antioxidante no revirtió el proceso por completo (Figura 62). Por tanto, parece que se activan tanto macroautofagia dependiente de ROS como mitofagia dependiente de la pérdida del valor de  $\Delta\psi$  tras el tratamiento con la combinación de fármacos.



**Figura 62.** Análisis de la formación de autofagosomas tras 24h de incubación con la combinación de fármacos (DC) en presencia o ausencia de NAC (1h, 3mM). \* $p < 0,05$  vs control negativo. # $p < 0,05$  vs ausencia de NAC.

En conclusión, de los tres posibles efectos mencionados en la sección 1.4 (ver Figura 17; pág. 55) que podrían obtenerse al combinar un fármaco metálico con un extracto vegetal, se ha encontrado que la combinación formada por  $[\text{Au}(\text{C}\equiv\text{C}-2-\text{NC}_5\text{H}_4)(\text{PTA})]$  (**2a**) y los polifenoles ácidos de *Rosa canina* dan lugar al tercero de los mismos, esto es, a un incremento de la acción terapéutica del fármaco. Se trata de una interacción de tipo aditivo cuya primera consecuencia es un rápido incremento de la producción de ROS. La ruptura del equilibrio redox dar lugar a una despolarización de la mitocondria, así como a la activación de la autofagia como medida protectora. La principal consecuencia de la activación de este proceso es el bloqueo de la necroptosis inducida por **2a**. Sin embargo, la pérdida de la función mitocondrial causa una alcalinización del lisosoma, lo que impide que se complete la autofagia y desencadena la muerte de la célula por apoptosis (Figura 63).



**Figura 63.** Mecanismo de acción de la combinación de fármacos.

En el presente capítulo se ha demostrado por primera vez, de acuerdo con una revisión exhaustiva de la literatura científica disponible, que el uso de extractos vegetales puede mejorar el efecto terapéutico de un alquino derivado de oro(I) coordinado con la fosfina PTA. Estos resultados podrían suponer un cambio de planteamiento a la hora de diseñar nuevos cócteles de fármacos quimioterapéuticos frente al cáncer colorrectal, de cara a potenciar la acción biológica del derivado metálico sin necesidad de aumentar su cantidad. Esto podría tener consecuencias beneficiosas para el paciente, ya que podría reducirse el tiempo necesario para que la terapia surtiese efecto y, por lo tanto, las posibilidades de que apareciesen efectos secundarios debidos a una exposición prolongada a los derivados metálicos disminuirían.

Por otra parte, se ha puesto de manifiesto la importancia de abordar la medicina tradicional desde un punto de vista actual, utilizando las herramientas a nuestra disposición para realizar un análisis veraz. Aunque el reino vegetal pueda ser una fuente de nuevos compuestos bioactivos, algunas corrientes actuales que se basan en criterios poco o nada fiables han puesto en riesgo la salud de la ciudadanía al recomendar prácticas supuestamente basadas en la medicina tradicional y orientadas a curar enfermedades graves como el cáncer, teniendo como resultado en la mayoría de los casos la muerte de los pacientes. Sin embargo, una investigación exhaustiva acerca de la composición de los vegetales, seguida por ensayos preclínicos sobre modelos celulares y animales, podría dar lugar a considerables beneficios para los pacientes de cáncer. Modernizar la medicina tradicional es una tarea que debe ser llevada a cabo con precaución, pero que podría comportar resultados muy positivos de cara a un futuro próximo.

No obstante, el uso clínico de los extractos vegetales conlleva dificultades debido a la gran variabilidad entre lotes y a su reducida biodisponibilidad. Se han destinado grandes esfuerzos al desarrollo de *nanocarriers* y otros sistemas con los que preservar la integridad de los extractos y maximizar su efecto terapéutico, aunque en el capítulo siguiente se presentará una interesante alternativa que permite conservar algunas propiedades de los polifenoles al tiempo que se cuenta con el potencial antitumoral de un complejo de oro(I).

## REFERENCIAS

---

- (1) Ruel-Bergeron, J. C.; Stevens, G. A.; Sugimoto, J. D.; Roos, F. F.; Ezzati, M.; Black, R. E.; Kraemer, K. Global Update and Trends of Hidden Hunger, 1995-2011: The Hidden Hunger Index. *PLoS One* **2015**, *10* (12), e0143497. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0143497>.
- (2) Makris, D. P.; Şahin, S. Polyphenolic Antioxidants from Agri-Food Waste Biomass. *Antioxidants* **2019**, *8* (12), 624. <https://doi.org/10.3390/antiox8120624>.
- (3) Mármol, I.; Quero, J.; Jiménez-Moreno, N.; Rodríguez-Yoldi, M. J.; Ancín-Azpilicueta, C. A Systematic Review of the Potential Uses of Pine Bark in Food Industry and Health Care. *Trends Food Sci. Technol.* **2019**, *88* (June 2018), 558–566. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.07.007>.
- (4) Gascón, S.; Jiménez-Moreno, N.; Jiménez, S.; Quero, J.; Rodríguez-Yoldi, M. J.; Ancín-Azpilicueta, C. Nutraceutical Composition of Three Pine Bark Extracts and Their Antiproliferative Effect on Caco-2 Cells. *J. Funct. Foods* **2018**, *48* (December 2017), 420–429. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.07.040>.
- (5) Mármol, I.; Jiménez-Moreno, N.; Ancín-Azpilicueta, C.; Osada, J.; Cerrada, E.; Rodríguez-Yoldi, M. J. A Combination of Rosa Canina Extracts and Gold Complex Favors Apoptosis of Caco-2 Cells by Increasing Oxidative Stress and Mitochondrial Dysfunction. *Antioxidants* **2019**, *9* (1), 17. <https://doi.org/10.3390/antiox9010017>.
- (6) Ayati, Z.; Amiri, M. S.; Ramezani, M.; Delshad, E.; Sahebkar, A.; Emami, S. A. Phytochemistry, Traditional Uses and Pharmacological Profile of Rose Hip: A Review. *Curr. Pharm. Des.* **2018**, *24* (35), 4101–4124. <https://doi.org/10.2174/1381612824666181010151849>.
- (7) Koczka, N.; Stefanovits-Bányai, É.; Ombódi, A. Total Polyphenol Content and Antioxidant Capacity of Rosehips of Some Rosa Species. *Medicines* **2018**, *5* (3), 84. <https://doi.org/10.3390/medicines5030084>.
- (8) Mihaylova, D.; Vrancheva, R.; Petkova, N.; Ognyanov, M.; Desseva, I.; Ivanov, I.; Popova, M.; Popova, A. Carotenoids, Tocopherols, Organic Acids, Carbohydrate and Mineral Content in Different Medicinal Plant Extracts. *Zeitschrift fur Naturforsch. - Sect. C J. Biosci.* **2018**, *73* (11–12), 439–448. <https://doi.org/10.1515/znc-2018-0057>.
- (9) Di Ferdinando, M.; Brunetti, C.; Agati, G.; Tattini, M. Multiple Functions of Polyphenols in Plants Inhabiting Unfavorable Mediterranean Areas. *Environ. Exp. Bot.* **2014**, *103*, 107–116. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2013.09.012>.
- (10) Lattanzio, V.; Lattanzio, V. M. T.; Cardinali, A. Role of Polyphenols in the Resistance Mechanisms of Plants Against Fungal Pathogens and Insects. In *Phytochemistry: Advances in Research*; Imperato, F., Ed.; Research Signpost: 37/661 (2), Fort P.O., Trivandrum-695 023, Kerala, India, 2006; pp 24–67.
- (11) Lavola, A.; Maukonen, M.; Julkunen-Tiitto, R. Variability in the Composition of Phenolic Compounds in Winter-Dormant *Salix pyrolifolia* in Relation to Plant Part and Age. *Phytochemistry* **2018**, *153*, 102–110. <https://doi.org/10.1016/J.PHYTOCHEM.2018.05.021>.
- (12) Karalija, E.; Muratović, E.; Tarkowski, P.; Zeljkovic, S. C. Variation in Phenolic Composition

- of *Knautia Arvensis* in Correlation with Geographic Area and Plant Organ. *Nat. Prod. Commun.* **2017**, *12* (4), 545–548.
- (13) Tumbas, V. T.; Čanadanović-Brunet, J. M.; Četojević-Simin, D. D.; Četković, G. S.; Dilas, S. M.; Gille, L. Effect of Rosehip (*Rosa Canina* L.) Phytochemicals on Stable Free Radicals and Human Cancer Cells. *J. Sci. Food Agric.* **2012**, *92* (6), 1273–1281. <https://doi.org/10.1002/jsfa.4695>.
- (14) Jiménez, S.; Gascón, S.; Luquin, A.; Laguna, M.; Ancin-Azpilicueta, C.; Rodríguez-Yoldi, M. J. *Rosa Canina* Extracts Have Antiproliferative and Antioxidant Effects on Caco-2 Human Colon Cancer. *PLoS One* **2016**, *11* (7), e0159136. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0159136>.
- (15) Turan, I.; Demir, S.; Kilinc, K.; Yaman, S. O.; Misir, S.; Kara, H.; Genc, B.; Mentese, A.; Aliyazicioglu, Y.; Deger, O. Cytotoxic Effect of *Rosa Canina* Extract on Human Colon Cancer Cells through Repression of Telomerase Expression. *J. Pharm. Anal.* **2018**, *8* (6), 394–399. <https://doi.org/10.1016/J.JPHA.2017.12.005>.
- (16) Kilinc, K.; Demir, S.; Turan, I.; Mentese, A.; Orem, A.; Sonmez, M.; Aliyazicioglu, Y. *Rosa Canina* Extract Has Antiproliferative and Proapoptotic Effects on Human Lung and Prostate Cancer Cells. *Nutr. Cancer* **2020**, *72* (2), 273–282. <https://doi.org/10.1080/01635581.2019.1625936>.
- (17) Mármol, I.; Virumbrales-Muñoz, M.; Quero, J.; Sánchez-de-Diego, C.; Fernández, L.; Ochoa, I.; Cerrada, E.; Yoldi, M. J. R. Alkynyl Gold(I) Complex Triggers Necroptosis via ROS Generation in Colorectal Carcinoma Cells. *J. Inorg. Biochem.* **2017**, *176*, 123–133. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2017.08.020>.
- (18) Roell, K. R.; Reif, D. M.; Motsinger-Reif, A. A. An Introduction to Terminology and Methodology of Chemical Synergy-Perspectives from across Disciplines. *Front. Pharmacol.* **2017**, *8* (APR), 158. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00158>.
- (19) Huang, R. Y.; Pei, L.; Liu, Q.; Chen, S.; Dou, H.; Shu, G.; Yuan, Z. X.; Lin, J.; Peng, G.; Zhang, W.; Fu, H. Isobologram Analysis: A Comprehensive Review of Methodology and Current Research. *Front. Pharmacol.* **2019**, *10* (OCT), 1222. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.01222>.
- (20) Ooko, E.; Kadioglu, O.; Greten, H. J.; Efferth, T. Pharmacogenomic Characterization and Isobologram Analysis of the Combination of Ascorbic Acid and Curcumin-Two Main Metabolites of *Curcuma Longa*-in Cancer Cells. *Front. Pharmacol.* **2017**, *8* (FEB), 38. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00038>.
- (21) Brahmi, D.; Ayed, Y.; Hfaiedh, M.; Bouaziz, C.; Mansour, H. Ben; Zourgui, L.; Bacha, H. Protective Effect of Cactus *Cladode* Extract against Cisplatin Induced Oxidative Stress, Genotoxicity and Apoptosis in Balb/c Mice: Combination with Phytochemical Composition. *BMC Complement. Altern. Med.* **2012**, *12*, 111. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-12-111>.
- (22) Rjeibi, I.; Feriani, A.; Saad, A. Ben; Sdayria, J.; Saidi, I.; Ncib, S.; Souid, S.; Allagui, M. S.; Hfaiedh, N. *Lycium Europaeum* Extract: A New Potential Antioxidant Source against Cisplatin-Induced Liver and Kidney Injuries in Mice. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2018**, *2018*, 1630751. <https://doi.org/10.1155/2018/1630751>.
- (23) Chengzhu W.U.; Gao M.; Shen L.; Bohan L.I.; Bai X.; Gui J.; Hongmei L.I.; Huo Q.; Tao M.A. Miconazole Triggers Various Forms of Cell Death in Human Breast Cancer MDA-MB-231 Cells. *Pharmazie* **2019**, *74* (5), 290–294. <https://doi.org/10.1691/ph.2019.8812>.

- (24) Lin, C. Y.; Chang, T. W.; Hsieh, W. H.; Hung, M. C.; Lin, I. H.; Lai, S. C.; Tzeng, Y. J. Simultaneous Induction of Apoptosis and Necroptosis by Tanshinone IIA in Human Hepatocellular Carcinoma HepG2 Cells. *Cell Death Discov.* **2016**, *2* (1), 16065. <https://doi.org/10.1038/cddiscovery.2016.65>.
- (25) Pietkiewicz, S.; Eils, R.; Krammer, P. H.; Giese, N.; Lavrik, I. N. Combinatorial Treatment of CD95L and Gemcitabine in Pancreatic Cancer Cells Induces Apoptotic and RIP1-Mediated Necroptotic Cell Death Network. *Exp. Cell Res.* **2015**, *339* (1), 1–9. <https://doi.org/10.1016/J.YEXCR.2015.10.005>.
- (26) Pietkiewicz, S.; Schmidt, J. H.; Lavrik, I. N. Quantification of Apoptosis and Necroptosis at the Single Cell Level by a Combination of Imaging Flow Cytometry with Classical Annexin V/Propidium Iodide Staining. *J. Immunol. Methods* **2015**, *423*, 99–103. <https://doi.org/10.1016/J.JIM.2015.04.025>.
- (27) Wang, X. Y.; Yang, H.; Wang, M. G.; Yang, D. B.; Wang, Z. Y.; Wang, L. Trehalose Protects against Cadmium-Induced Cytotoxicity in Primary Rat Proximal Tubular Cells via Inhibiting Apoptosis & Restoring Autophagic Flux. *Cell Death Dis.* **2017**, *8* (10), e3099. <https://doi.org/10.1038/cddis.2017.475>.
- (28) Shen, H.-M.; Codogno, P. Autophagy Is a Survival Force via Suppression of Necrotic Cell Death. *Exp. Cell Res.* **2012**, *318* (11), 1304–1308. <https://doi.org/10.1016/J.YEXCR.2012.02.006>.
- (29) Wang, F.; Cao, M.; Fan, M.; Wu, H.; Huang, W.; Zhang, Y.; Hu, Z.; Jin, X. AMPK-MTOR-ULK1 Axis Activation-Dependent Autophagy Promotes Hydroxycamptothecin-Induced Apoptosis in Human Bladder Cancer Cells. *J. Cell. Physiol.* **2019**, *235* (5), 4302–4315. <https://doi.org/10.1002/jcp.29307>.
- (30) Chen, X.; Yuan, L. Q.; Li, L. J.; Lv, Y.; Chen, P. F.; Pan, L. Suppression of Gastric Cancer by Extract from the Tuber of *Amorphophallus Konjac* via Induction of Apoptosis and Autophagy. *Oncol. Rep.* **2017**, *38* (2), 1051–1058. <https://doi.org/10.3892/or.2017.5747>.
- (31) Nozaki, R.; Kono, T.; Bochimoto, H.; Watanabe, T.; Oketani, K.; Sakamaki, Y.; Okubo, N.; Nakagawa, K.; Takeda, H. Zanthoxylum Fruit Extract from Japanese Pepper Promotes Autophagic Cell Death in Cancer Cells. *Oncotarget* **2016**, *7* (43), 70437–70446.
- (32) Hönscheid, P.; Datta, K.; Muders, M. H. Autophagy: Detection, Regulation and Its Role in Cancer and Therapy Response. *Int. J. Radiat. Biol.* **2014**, *90* (8), 628–635. <https://doi.org/10.3109/09553002.2014.907932>.
- (33) Sharma, P.; Kumar, S. Metformin Inhibits Human Breast Cancer Cell Growth by Promoting Apoptosis via a ROS-Independent Pathway Involving Mitochondrial Dysfunction: Pivotal Role of Superoxide Dismutase (SOD). *Cell. Oncol.* **2018**, *41* (6), 637–650. <https://doi.org/10.1007/s13402-018-0398-0>.
- (34) Tompkins, K. D.; Thorburn, A. Regulation of Apoptosis by Autophagy to Enhance Cancer Therapy. *Yale J. Biol. Med.* **2019**, *92* (4), 707–718.
- (35) Hao, C.; Liu, G.; Tian, G. Autophagy Inhibition of Cancer Stem Cells Promotes the Efficacy of Cisplatin against Non-Small Cell Lung Carcinoma. *Ther. Adv. Respir. Dis.* **2019**, *13*, 1753466619866097. <https://doi.org/10.1177/1753466619866097>.
- (36) Chen, J.; Zhang, L.; Zhou, H.; Wang, W.; Luo, Y.; Yang, H.; Yi, H. Inhibition of Autophagy Promotes Cisplatin-Induced Apoptotic Cell Death through Atg5 and Beclin 1 in A549 Human Lung Cancer Cells. *Mol. Med. Rep.* **2018**, *17* (5), 6859–6865.

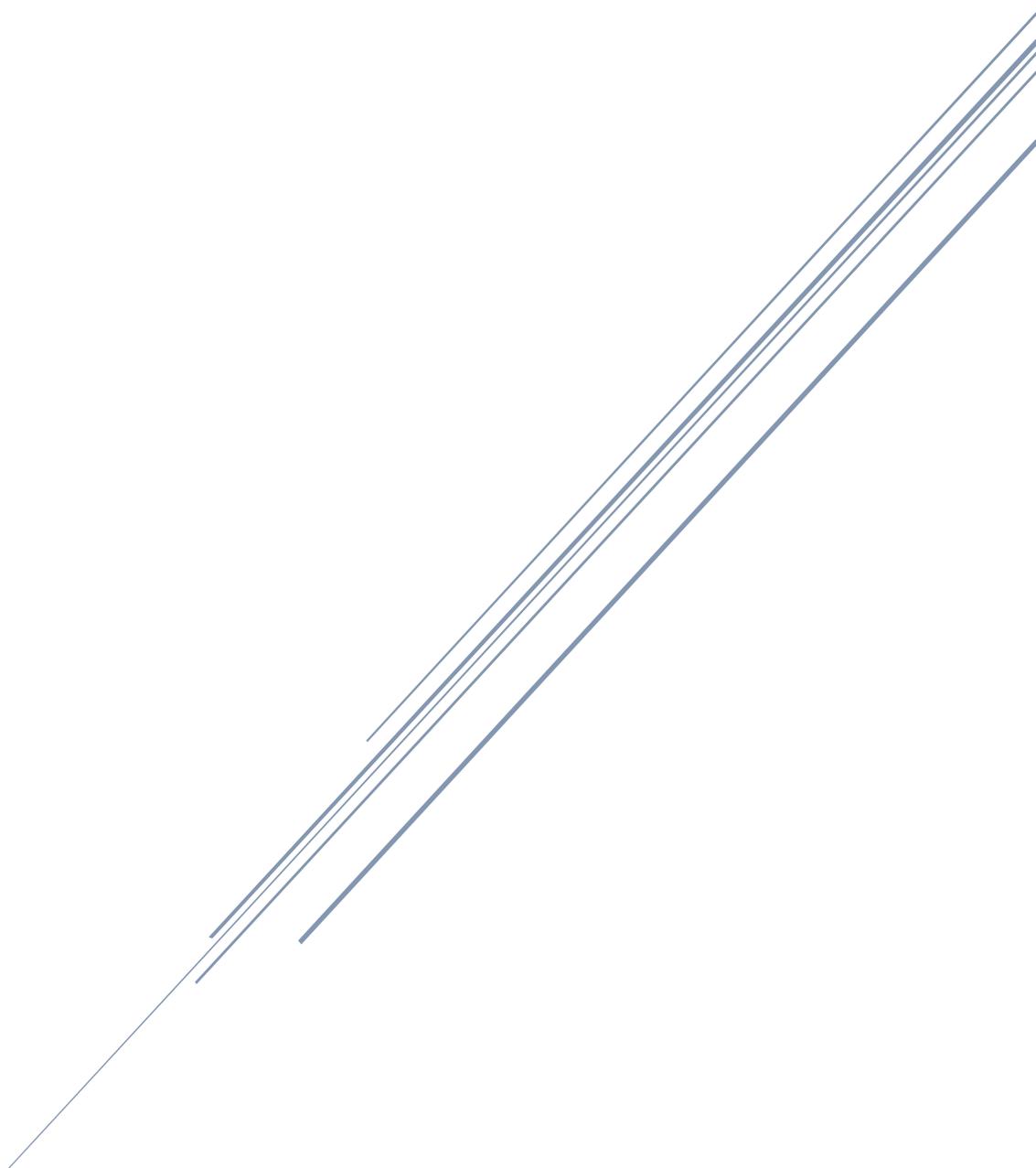
- <https://doi.org/10.3892/mmr.2018.8686>.
- (37) Mauthe, M.; Orhon, I.; Rocchi, C.; Zhou, X.; Luhr, M.; Hijlkema, K. J.; Coppes, R. P.; Engedal, N.; Mari, M.; Reggiori, F. Chloroquine Inhibits Autophagic Flux by Decreasing Autophagosome-Lysosome Fusion. *Autophagy* **2018**, *14* (8), 1435–1455. <https://doi.org/10.1080/15548627.2018.1474314>.
- (38) Sarkar, C.; Zhao, Z.; Aungst, S.; Sabirzhanov, B.; Faden, A. I.; Lipinski, M. M. Impaired Autophagy Flux Is Associated with Neuronal Cell Death after Traumatic Brain Injury. *Autophagy* **2014**, *10* (12), 2208–2222. <https://doi.org/10.4161/15548627.2014.981787>.
- (39) Moors, T. E.; Hoozemans, J. J. M.; Ingrassia, A.; Beccari, T.; Parnetti, L.; Chartier-Harlin, M. C.; Van De Berg, W. D. J. Therapeutic Potential of Autophagy-Enhancing Agents in Parkinson's Disease. *Mol. Neurodegener.* **2017**, *12* (1), 11. <https://doi.org/10.1186/s13024-017-0154-3>.
- (40) Baron, O.; Boudi, A.; Dias, C.; Schilling, M.; Nölle, A.; Vizcay-Barrena, G.; Rattray, I.; Jungbluth, H.; Scheper, W.; Fleck, R. A.; Bates, G. P.; Fanto, M. Stall in Canonical Autophagy-Lysosome Pathways Prompts Nucleophagy-Based Nuclear Breakdown in Neurodegeneration. *Curr. Biol.* **2017**, *27* (23), 3626–3642.e6. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.10.054>.
- (41) Zhou, X.-L.; Wan, X.-M.; Fu, X.-X.; Xie, C.-G. Puerarin Prevents Cadmium-Induced Hepatic Cell Damage by Suppressing Apoptosis and Restoring Autophagic Flux. *Biomed. Pharmacother.* **2019**, *115*, 108929. <https://doi.org/10.1016/J.BIOPHA.2019.108929>.
- (42) Pan, H.; Wang, Y.; Na, K.; Wang, Y.; Wang, L.; Li, Z.; Guo, C.; Guo, D.; Wang, X. Autophagic Flux Disruption Contributes to Ganoderma Lucidum Polysaccharide-Induced Apoptosis in Human Colorectal Cancer Cells via MAPK/ERK Activation. *Cell Death Dis.* **2019**, *10* (6). <https://doi.org/10.1038/s41419-019-1653-7>.
- (43) Yi, H.; Wang, K.; Du, B.; He, L.; Hiuting, H. O.; Qiu, M.; Zou, Y.; Li, Q.; Jin, J.; Zhan, Y.; Zhao, Z.; Liu, X. Aleuritic Acid Impaired Autophagic Flux and Induced Apoptosis in Hepatocellular Carcinoma HepG2 Cells. *Molecules* **2018**, *23* (6), 1338. <https://doi.org/10.3390/molecules23061338>.
- (44) Ladds, M. J. G. W.; Pastor-Fernández, A.; Popova, G.; van Leeuwen, I. M. M.; Eng, K. E.; Drummond, C. J.; Johansson, L.; Svensson, R.; Westwood, N. J.; McCarthy, A. R.; Tholander, F.; Popa, M.; Lane, D. P.; McCormack, E.; McInerney, G. M.; Bhatia, R.; Laín, S. Autophagic Flux Blockage by Accumulation of Weakly Basic Tenovins Leads to Elimination of B-Raf Mutant Tumour Cells That Survive Vemurafenib. *PLoS One* **2018**, *13* (4), e0195956. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0195956>.
- (45) He, R.; Shi, X.; Zhou, M.; Zhao, Y.; Pan, S.; Zhao, C.; Guo, X.; Wang, M.; Li, X.; Qin, R. Alantolactone Induces Apoptosis and Improves Chemosensitivity of Pancreatic Cancer Cells by Impairment of Autophagy-Lysosome Pathway via Targeting TFEB. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2018**, *356*, 159–171. <https://doi.org/10.1016/J.TAAP.2018.08.003>.
- (46) Jung, M.; Lee, J.; Seo, H. Y.; Lim, J. S.; Kim, E. K. Cathepsin Inhibition-Induced Lysosomal Dysfunction Enhances Pancreatic Beta-Cell Apoptosis in High Glucose. *PLoS One* **2015**, *10* (1), e0116972. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0116972>.
- (47) Cui, D.; Sun, D.; Wang, X.; Yi, L.; Kulikowicz, E.; Reyes, M.; Zhu, J.; Yang, Z. J.; Jiang, W.; Koehler, R. C. Impaired Autophagosome Clearance Contributes to Neuronal Death in a Piglet Model of Neonatal Hypoxic-Ischemic Encephalopathy. *Cell Death Dis.* **2017**, *8* (7), e2919. <https://doi.org/10.1038/cddis.2017.318>.

- (48) Stamelos, V. A.; Fisher, N.; Bamrah, H.; Voisey, C.; Price, J. C.; Farrell, W. E.; Redman, C. W.; Richardson, A. The BH3 Mimetic Obatoclox Accumulates in Lysosomes and Causes Their Alkalinization. *PLoS One* **2016**, *11* (3), e0150696. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0150696>.
- (49) Demers-Lamarche, J.; Guillebaud, G.; Tlili, M.; Todkar, K.; Bélanger, N.; Grondin, M.; P'Nguyen, A.; Michel, J.; Germain, M. Loss of Mitochondrial Function Impairs Lysosomes. *J. Biol. Chem.* **2016**, *291* (19), 10263–10276. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.695825>.
- (50) Jiménez-Moreno; Cimminelli; Volpe; Ansó; Esparza; Mármol; Rodríguez-Yoldi; Ancín-Azpilicueta. Phenolic Composition of Artichoke Waste and Its Antioxidant Capacity on Differentiated Caco-2 Cells. *Nutrients* **2019**, *11* (8), 1723. <https://doi.org/10.3390/nu11081723>.
- (51) Forester, S. C.; Lambert, J. D. The Role of Antioxidant versus Pro-Oxidant Effects of Green Tea Polyphenols in Cancer Prevention. *Mol. Nutr. Food Res.* **2011**, *55* (6), 844–854. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201000641>.
- (52) Pillion, C.; Ma, D.; Ruvinov, I.; Mansour, F.; Pignanelli, C.; Noel, M.; Saleem, A.; Arnason, J.; Rodrigues, M.; Singh, I.; Ropat, J.; Pandey, S. Cymbopogon Citratus and Camellia Sinensis Extracts Selectively Induce Apoptosis in Cancer Cells and Reduce Growth of Lymphoma Xenografts in Vivo. *Oncotarget* **2017**, *8* (67), 110756–110773.
- (53) Nguyen, C.; Baskaran, K.; Pupulin, A.; Ruvinov, I.; Zaitoon, O.; Grewal, S.; Scaria, B.; Mehadli, A.; Vegh, C.; Pandey, S. Hibiscus Flower Extract Selectively Induces Apoptosis in Breast Cancer Cells and Positively Interacts with Common Chemotherapeutics. *BMC Complement. Altern. Med.* **2019**, *19* (1), 98. <https://doi.org/10.1186/s12906-019-2505-9>.
- (54) Qin, G.; Wu, L.; Liu, H.; Pang, Y.; Zhao, C.; Wu, S.; Wang, X.; Chen, T. Artesunate Induces Apoptosis via a ROS-Independent and Bax-Mediated Intrinsic Pathway in HepG2 Cells. *Exp. Cell Res.* **2015**, *336* (2), 308–317. <https://doi.org/10.1016/J.YEXCR.2015.07.004>.
- (55) East, D. A.; Fagiani, F.; Crosby, J.; Georgakopoulos, N. D.; Bertrand, H.; Schaap, M.; Fowkes, A.; Wells, G.; Campanella, M. PMI: A  $\Delta\Psi_m$  Independent Pharmacological Regulator of Mitophagy. *Chem. Biol.* **2014**, *21* (11), 1585–1596. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMBIOL.2014.09.019>.
- (56) Jin, S. Autophagy Mitochondrial Quality Control and Oncogenesis. *Autophagy* **2006**, *2* (2), 80–84.
- (57) Azad, M. B.; Chen, Y.; Gibson, S. B. Regulation of Autophagy by Reactive Oxygen Species (ROS): Implications for Cancer Progression and Treatment. *Antioxid Redox Signal.* **2009**, *11* (4), 777–790. <https://doi.org/doi:10.1089/ars.2008.2270>.
- (58) Scherz-Shouval, R.; Elazar, Z. ROS, Mitochondria and the Regulation of Autophagy. *Trends Cell Biol.* **2007**, *17* (9), 422–427. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2007.07.009>.

# CAPITULO 3

## ALQUINIL COMPLEJOS DE ORO(I) DERIVADOS DE 3-HIDROXIFLAVONAS

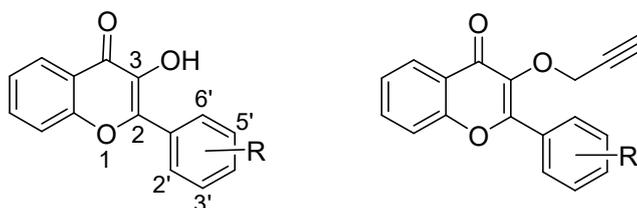
- *Eur. J. Med. Chem.* **2019**; 183:11161





Ya en el capítulo 1, se discutía acerca de la relevancia de los ligandos que acompañaban al metal sobre las propiedades finales del complejo metálico. En primer lugar, se ha hecho referencia a la influencia de las fosfinas solubles en agua sobre la solubilidad de los derivados, lo que modifica su capacidad de entrada en la célula y, por consiguiente, su acción biológica. Por otro lado, la composición del esqueleto alquino ha resultado ser de importancia en cuanto al mecanismo de acción a través del cual el complejo induce la muerte de la célula tumoral. En definitiva, los ligandos pueden inducir cambios de importancia sobre las propiedades físicas y químicas de los derivados metálicos, así como en su efecto antitumoral, lo que debe ser muy tenido en consideración no solo a la hora de diseñar los complejos sino también al planificar los posibles ensayos biológicos a realizar.

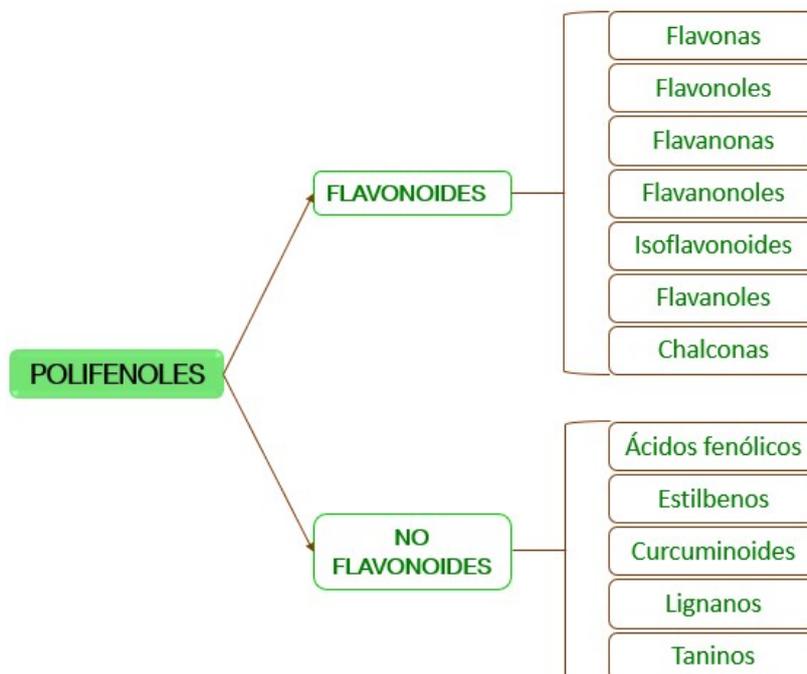
En vista de ello, se planteó como una opción interesante recurrir como ligandos de coordinación a moléculas que pudiesen tener un cierto potencial terapéutico por sí solas. Según lo que se adelantaba al final del capítulo 2, los polifenoles poseen un probado efecto antitumoral, aunque el uso de extractos vegetales con fines clínicos presenta ciertos inconvenientes. Aunque la tendencia actual consiste en diseñar nuevos sistemas de encapsulación o similares que permitan una mejor conservación de las propiedades farmacológicas del extracto y maximizar su biodisponibilidad, decidimos abordar esta cuestión desde un punto de vista diferente. Para ello, se sintetizó una nueva serie de complejos de oro(I) coordinados con un ligando derivado de moléculas del tipo **flavonoides**, que constituyen la subclase de polifenoles más abundante y variada del reino vegetal. Para favorecer la coordinación de esta clase de moléculas a un centro metálico, se eligió la unidad 3-hidroxi flavona (Figura 64), puesto que la presencia de un grupo -OH permite modificar su esqueleto, lo que facilita la coordinación metálica. La alquilación de este grupo hidroxilo con una unidad propargilo genera el correspondiente alquino derivado, que podrá coordinar centros de oro(I) con relativa facilidad.



**Figura 64.** Estructura del flavonoide 3-hidroxi flavona y su correspondiente alquino derivado.

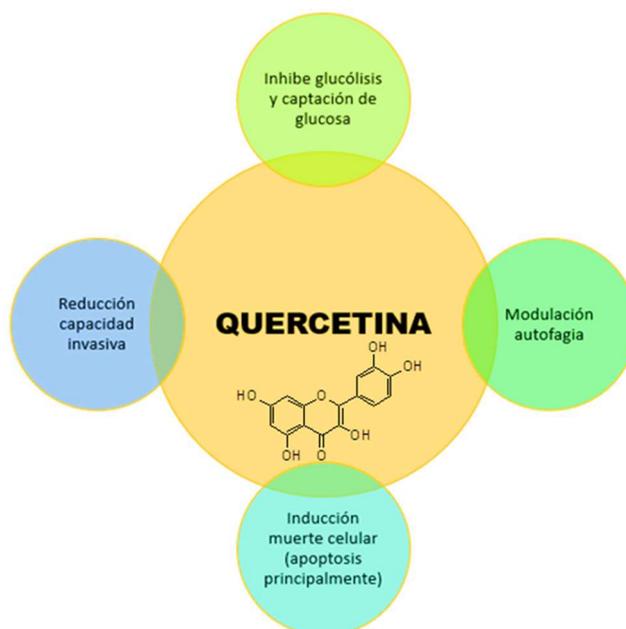
El papel de los polifenoles en la prevención y el tratamiento del cáncer colorrectal ha sido previamente mencionado en los apartados 1.1 (ver Figuras 4 y 5, págs. 29 y 30) y 1.4 (ver Figura 17, pág. 55), así como en el capítulo 2. Como su propio nombre indica, estos fitocomponentes se componen por varias unidades fenol. Es precisamente el número de anillos fenol que contiene cada molécula, así como los elementos estructurales que los unen entre sí, lo que permite realizar una clasificación de los

distintos compuestos fenólicos atendiendo a parámetros estructurales. Se distinguen así dos grandes grupos: flavonoides y no flavonoides<sup>1</sup> (Figura 65).



**Figura 65.** Clasificación de los polifenoles atendiendo a criterios estructurales.

Los flavonoides son metabolitos secundarios de las plantas que están compuestos por dos anillos de benceno unidos mediante tres átomos de carbono que componen un heterociclo oxigenado. Todos ellos derivan de la L-fenilalanina, que tras ser transformada a 4-coumaroil-CoA será el punto de partida de la síntesis de los distintos flavonoides, estando dicha síntesis mediada por enzimas isomerasas, reductasas, hidrolasas y dioxigenasas entre otras<sup>2,3</sup>. De todas las clases de flavonoides, los flavonoles o 3-hidroxi flavonas son los más abundantes en los alimentos de origen vegetal. Algunas de sus fuentes principales son la cebolla, el puerro, el brócoli o los arándanos<sup>4</sup>. Además de por su abundancia, los flavonoles son de gran interés por sus diferentes propiedades bioactivas. Uno de los flavonoles más estudiados es la quercetina, ya que posee un gran número de cualidades beneficiosas, entre las que destacan su efecto antiinflamatorio y antioxidante, que le permiten atenuar los signos clínicos de ciertos trastornos como aterosclerosis, trombosis o arritmia, además de su potencial antitumoral<sup>5-7</sup>. En cuanto a este último punto, la quercetina parece tratarse de un compuesto multidiana o “*multitarget*”, es decir, que es capaz de actuar frente a varias dianas tumorales. Las principales rutas metabólicas de la célula tumoral que parecen verse afectadas por el tratamiento con este flavonol se recogen en la Figura 66<sup>8-10</sup>. El efecto antiproliferativo de la quercetina puede ser de tipo directo, cuando inhibe enzimas clave interaccionando con las mismas<sup>11,12</sup> o bien indirecto al inducir cambios a nivel de expresión génica que modifican la actividad de proteínas concretas<sup>13,14</sup>.



**Figura 66.** Principales efectos de la quercetina sobre las células tumorales.

En el caso concreto del cáncer colorrectal, el uso de quercetina con fines quimioterapéuticos podría ser de gran interés especialmente sobre aquellos tumores que presentan mutaciones en el gen *KRAS*<sup>15</sup>. En cuanto a su mecanismo de acción sobre modelos de CRC, se ha observado que la quercetina parece inducir la muerte celular a través de la generación de ROS, lo que puede estar mediado, al menos en parte, por su capacidad de interactuar con la enzima ciclooxygenasa 2 (COX-2) en su subunidad peroxidasa<sup>16,17</sup>. Además, se ha observado que es capaz de reducir la capacidad migratoria de las células tumorales y reducir las metástasis pulmonares en modelos murinos de CRC<sup>18</sup>. En un interesante estudio realizado también sobre un modelo animal de cáncer colorrectal, se observó que la ingestión de este flavonol alternada con el consumo de  $\beta$ -glucano reducía la tasa de mortalidad de los animales, al inducir un descenso de la inflamación en la región tumoral junto con una restauración parcial de la disbiosis<sup>19</sup>.

Los efectos descritos en la Figura 66 no parecen ser exclusivos de la quercetina, sino que otros flavonoles han mostrado potencial anti-metastático y antiproliferativo, estando este último también relacionado con la inhibición de la enzima COX-2 de manera indirecta<sup>20</sup>. Por consiguiente, estos compuestos bioactivos parecen ser capaces de llevar a cabo una inhibición directa y/o indirecta de la COX-2<sup>21,22</sup>.

Llegados a este punto, es necesario introducir a la enzima **ciclooxygenasa**. Se han identificado tres isoformas de esta proteína, siendo la 1 y la 2 las mejor caracterizadas. Mientras que la isoforma 1 (**COX-1**) se expresa de manera constitutiva en todos los tejidos del organismo, la isoforma 2 (**COX-2**) solo se localiza en órganos concretos, entre los que se encuentran riñón, cerebro, testículo y útero, y posee la particularidad de que su expresión es inducible. En cualquier caso, ambas están implicadas en la síntesis de

prostaglandinas a partir de ácido araquidónico. La función de COX-1 está directamente relacionada con el correcto mantenimiento de la función corporal mediante la síntesis de prostaglandinas, siendo especialmente importante su papel en el mantenimiento de la mucosa gástrica. Por otro lado, la isoforma COX-2 se induce en respuesta a determinados factores, siendo uno de los más relevantes los niveles altos de citoquinas pro-inflamatorias<sup>23-25</sup>.

Precisamente por esto, la COX-2 es de interés a nivel farmacológico, ya que su inhibición puede reducir la inflamación y el dolor asociado a la misma. Es la diana principal de los anti-inflamatorios no esteroideos como la aspirina o el ibuprofeno, aunque al no actuar como inhibidores selectivos de la COX-2, su uso prolongado da lugar a efectos secundarios debido al bloqueo de la función normal de la COX-1. La región gastrointestinal suele ser la más perjudicada, dada la mencionada relevancia de la COX-1 en la integridad de la mucosa estomacal. Para minimizar el impacto negativo de estos fármacos, durante los últimos años se ha invertido un gran esfuerzo en el desarrollo de nuevos fármacos que actúen como inhibidores selectivos de la COX-2, siendo los más destacados el celecoxib y el rofecoxib<sup>24</sup>.

El interés de la ciclooxigenasa como diana terapéutica no se limita a esta situación, sino que, según se adelantaba previamente, puede tener un papel muy relevante en el tratamiento del cáncer. Se ha observado que la COX-2 se encuentra sobreexpresada en algunos tumores, y dado que esta enzima contribuye al escape de la vigilancia inmune, a la resistencia a la apoptosis y a la formación de metástasis, su nivel de expresión se correlaciona fuertemente con la prognosis del paciente<sup>24,26</sup>. De ahí que el uso de los inhibidores selectivos de la COX-2 como los ya mencionados, o compuestos naturales entre los que destaca la quercetina, puedan tener efectos positivos sobre la reducción de la masa tumoral. No solo la inhibición directa de la actividad de la proteína posee acción terapéutica, sino que la reducción de sus niveles de expresión cursa con el mismo efecto beneficioso<sup>27-29</sup>.

No obstante, a la hora de escoger una terapia selectiva frente a la COX-2, debe tenerse en cuenta que, en el caso concreto del CRC, se han encontrado datos aparentemente contradictorios acerca de la fase del desarrollo del tumor en la cual la expresión de esta enzima es mayor. Mientras que Negi *et al.*<sup>30</sup> observaron una sobreexpresión en las etapas más tempranas frente a los estadios de desarrollo más avanzados, Albasri *et al.*<sup>31</sup> notificaron que el nivel de expresión de esta isoforma se iba incrementado conforme progresaba la secuencia adenoma-carcinoma. Si bien estas discrepancias podrían estar causadas por metodologías de estudio diferentes, otra posible explicación reside en que la COX-2 podría tener un papel en el inicio o en la progresión de la enfermedad, pero no necesariamente en ambos en una misma masa tumoral. En cualquier caso, está aceptado por la comunidad científica que la sobreexpresión de COX-2 se correlaciona con tumores colorrectales de mayor

agresividad y peor pronóstico<sup>32</sup>, pero sería adecuado realizar un estudio de los niveles de expresión de esta enzima en un momento dado antes de plantearse el uso de sus bloqueantes como estrategia terapéutica, para poder estimar las posibilidades de éxito de la terapia con mayor fiabilidad.

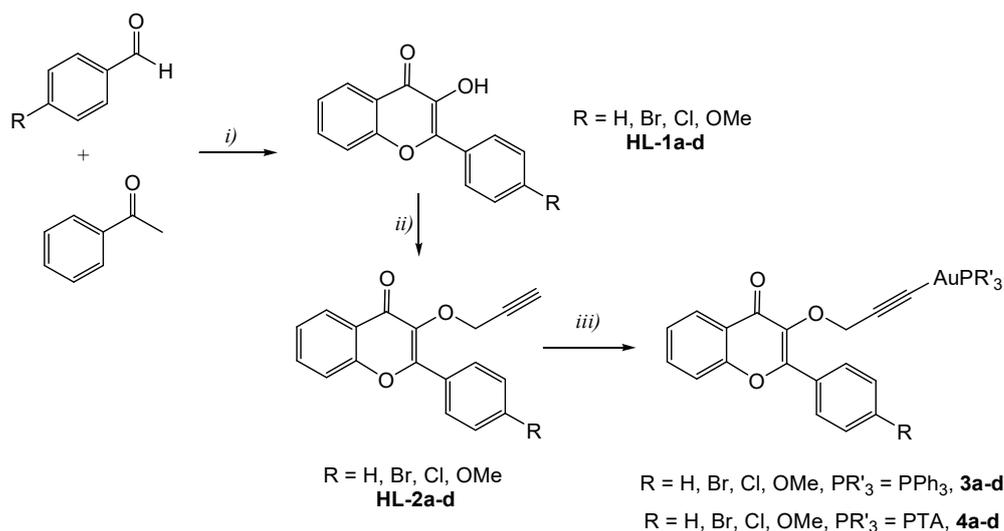
El uso de inhibidores selectivos de la COX-2 podría ser, por tanto, de gran utilidad frente a tumores que sobreexpresen dicha enzima, y se trataría de una estrategia terapéutica con escasos efectos secundarios a nivel gastrointestinal dado que no se vería afectada la actividad de la COX-1. No obstante, en algunas ocasiones puede resultar de interés bloquear también a esta isoforma, ya que en algunos tipos de cáncer también se ha encontrado en niveles anormalmente altos. Esto hace suponer que ambas pueden contribuir al mantenimiento de la inflamación en el microambiente tumoral, promoviendo así el desarrollo del cáncer<sup>33,34</sup>. Además, ensayos en modelos animales han sugerido que el uso *in vivo* de inhibidores de la COX-1 podría reducir la aparición de metástasis<sup>35</sup>. No obstante, en tumores colorrectales no parece estar tan clara la implicación de la sobreexpresión de la isoforma 1 en su agresividad y pronosis. En general, las muestras de CRC analizadas no presentan un patrón de expresión de COX-1 homogéneo que permita determinar su implicación en la aparición y/o el desarrollo de la enfermedad<sup>36</sup>, siendo incluso muy bajo en algunas de las muestras analizadas<sup>37</sup>, aunque su inhibición tanto directa como indirecta sí puede resultar beneficiosa a nivel terapéutico<sup>38-40</sup>. En definitiva, aunque los resultados obtenidos hasta el momento acerca del potencial de la COX-1 como diana terapéutica frente al CRC son prometedores, todavía es necesario esclarecer algunos puntos acerca de qué subtipos de tumor podrían verse más beneficiados del tratamiento con inhibidores de esta isoforma, entre otros interrogantes.

Dado el mencionado potencial anticancerígeno de los flavonoides, pero teniendo en cuenta los problemas asociados al uso de polifenoles con fines quimioterapéuticos previamente comentados, durante la última década se han diseñado análogos sintéticos de estos compuestos para mejorar sus propiedades bioactivas. Al modificar la estructura de la 3-hidroxiflavona, es posible aumentar su efecto terapéutico, ya que, entre otros efectos, se puede facilitar la interacción con la diana terapéutica<sup>41,42</sup>. Existen, además, evidencias previas acerca del potencial uso de la 3-hidroxiflavona como ligando de centros metálicos, concretamente de rutenio, para el desarrollo de nuevos complejos con propiedades anticancerígenas<sup>43-45</sup>. Además, Mirzadeh *et al.*<sup>46</sup> fueron los primeros en proponer el uso de fosfina complejos de oro(I) coordinados con un flavonoide funcionalizado en el grupo hidroxilo en posición C3 con una unidad propargilo.

En el presente capítulo se van a describir dos nuevas familias de alquinil complejos de oro(I) derivados de la 3-hidroxiflavona: coordinados con ligandos fosfina o coordinados con ligandos carbeno.

### 3.1. FOSFINO COMPLEJOS

Los complejos evaluados en este apartado fueron previamente sintetizados por miembros de nuestro grupo de investigación a partir de cuatro moléculas de 3-hidroxi flavona diferentes (**HL1a-d**, siendo **a**: R = H, **b**: R = Br, **c**: R = Cl y **d**: R = OMe, Esquema 1), preparadas en un solo paso mediante una condensación de Claisen-Schmidt entre 2-hidroxiacetofenona y el aldehído correspondiente<sup>47</sup>. A continuación, se hizo reaccionar a cada uno de estos derivados con bromuro de propargilo para obtener la serie **HL2a-d**, con un grupo alquino terminal. Tras la desprotonación del alquino, la posterior adición de [AuCl(PR'<sub>3</sub>)] (con PR'<sub>3</sub> = PPh<sub>3</sub> o PTA) condujo a la preparación de los correspondientes fosfino complejos de oro (I): la serie **3a-d** con PPh<sub>3</sub> y la serie **4a-d** con PTA. El interés de esta comparación reside en que la incorporación de grupos fenilo al átomo de fósforo puede inducir un aumento en la lipofilidad, que de acuerdo con lo anteriormente desarrollado podría ser el supuesto responsable de la mayor toxicidad de estos compuestos sobre tejido sano<sup>48,49</sup>.



*i)* NaOH y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, *ii)* K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> y bromuro de propargilo, *iii)* KOH/MeOH y [AuClPR'<sub>3</sub>]

**Esquema 1.** Síntesis de los ligandos derivados de 3-hidroxi flavona y sus respectivos fosfino complejos de oro(I).

Puesto que, de acuerdo con la literatura previa<sup>41,42</sup>, los ligandos 3-hidroxi flavona podrían tener actividad anticancerígena por sí solos, consideramos necesario comparar su efecto antiproliferativo respecto al complejo metálico. Se escogió como modelo la línea Caco-2 y se llevó a cabo la determinación del IC<sub>50</sub> de las 16 moléculas (los ligandos flavona libres y los complejos metálicos) tras 72h de exposición. En la Tabla 11 se muestran los valores obtenidos, pudiéndose comprobar que la coordinación del centro metálico tiene como consecuencia un incremento de la capacidad antiproliferativa de la hidroxi flavona.

**Tabla 11.** Valores de IC<sub>50</sub> de los ligandos hidroxiflavona (A) y sus complejos de oro(I) resultantes (B) obtenidos sobre células Caco-2 tras 72h de incubación (expresados como media ± desviación estándar).

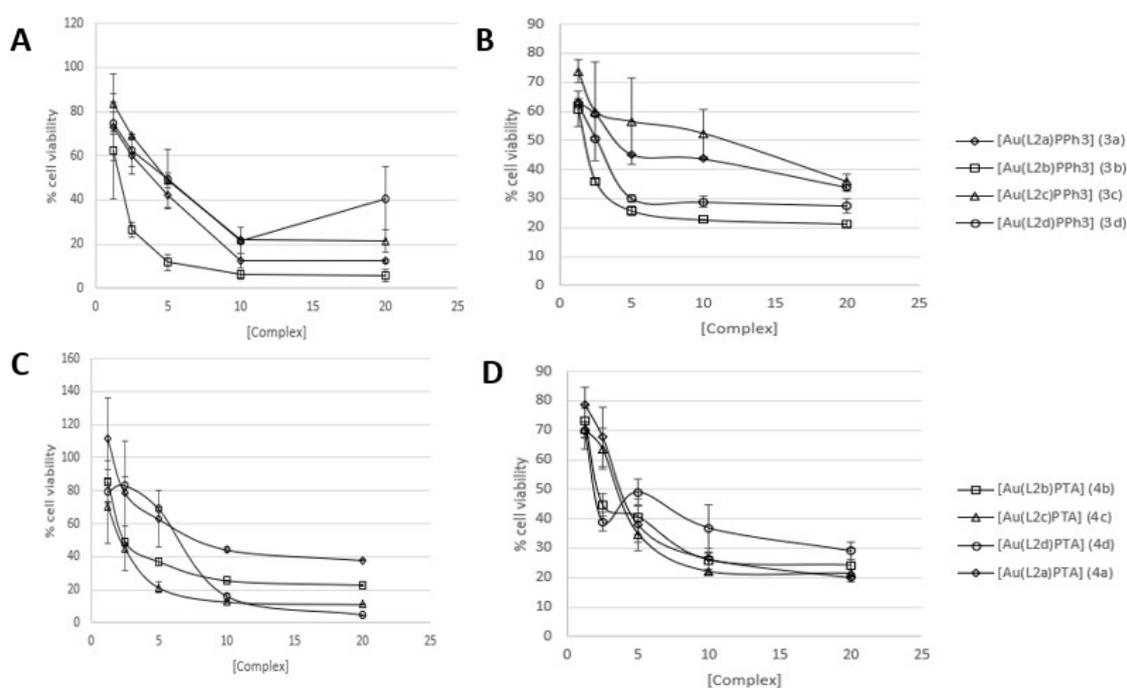
A			B		
Complejo	IC50 (μM)		Complejo	IC50 (μM)	
	MTT	SRB		MTT	SRB
HL-1a	89,10 ± 4,98	16,70 ± 8,28	3a	3,81 ± 1,18	7,05 ± 0,49
HL-1b	22,00 ± 0,25	10,40 ± 0,24	3b	1,52 ± 0,91	1,78 ± 0,48
HL-1c	16,50 ± 0,69	13,50 ± 0,33	3c	5,34 ± 0,05	10,28 ± 3,76
HL-1d	22,30 ± 2,51	14,80 ± 2,82	3d	4,78 ± 0,62	3,19 ± 0,75
HL-2a	63,56 ± 17,87	54,87 ± 2,05	4a	7,68 ± 1,74	5,08 ± 0,78
HL-2b	> 100	65,64 ± 38,92	4b	6,42 ± 0,35	4,37 ± 0,40
HL-2c	39,09 ± 30,98	27,19 ± 3,02	4c	2,33 ± 1,26	4,21 ± 0,91
HL-2d	64,14 ± 13,95	49,07 ± 3,84	4d	5,22 ± 0,43	6,85 ± 2,62

Además de evaluar el efecto antiproliferativo de los ligandos hidroxiflavona libres o coordinados al centro metálico, en la Tabla 11 se muestra la comparación del valor de los IC<sub>50</sub> obtenidos mediante dos métodos de ensayo diferentes. La razón de recurrir a dos técnicas distintas se basa en la capacidad de algunos compuestos fenólicos de reducir directamente el reactivo MTT a formazán, lo que da lugar a falsos positivos con esta técnica. También tenerse en cuenta que se han dado casos en los que los polifenoles pueden modificar la actividad de la enzima succinato deshidrogenasa, dando lugar de igual modo a una sobreestimación de la viabilidad del cultivo. Se ha propuesto como más adecuado el uso de ensayos basados en la cantidad de proteína del cultivo para analizar la viabilidad de células tratadas con extractos vegetales o componentes de origen vegetal aislados. De ahí que se escogiese la técnica SRB (ver apartado *Methods*), que ya se había usado previamente para las determinaciones de viabilidad llevadas a cabo durante el desarrollo del capítulo 2, frente al MTT utilizado tradicionalmente cuando se trata el cultivo con complejos de oro<sup>50</sup>. Efectivamente, con el ensayo MTT se obtienen valores de IC<sub>50</sub> entre 1,2 y 5 veces más altos que los equivalentes determinados por SRB, lo que confirma la poca fiabilidad de este método al trabajar con derivados de la 3-hidroxiflavona (Tabla 11A). No obstante, al coordinar el centro metálico a la hidroxiflavona los falsos positivos parecen desaparecer, puesto que no hay diferencias significativas entre los valores obtenidos por ambas técnicas (Tabla 11B).

Estudios realizados con el flavonol kaempferol mostraron que la concentración del compuesto estaba directamente relacionada con su capacidad de reducir el reactivo MTT a formazán, de modo que a mayor cantidad de kaempferol mayor reducción del

reactivo y más posibilidades de obtener falsos positivos<sup>51</sup>. Dado que los valores de IC<sub>50</sub> obtenidos al tratar las células con las flavonas coordinadas al centro metálico (Tabla 11B) son entre 2 y 7 veces más bajos que los equivalentes para las flavonas solas (Tabla 11A), una posible explicación reside en que, al ser necesaria una menor cantidad del complejo para obtener un efecto comparable, ocurre algo similar a lo descrito por Bruggisser *et al.*<sup>51</sup>, es decir, la cantidad de los derivados metálicos no es lo suficientemente alta como para reducir por sí solos el reactivo MTT sobrante.

Para comprobarlo, se realizaron curvas dosis-respuesta tras 72h de incubación con los complejos **3a-d** y **4a-d** utilizando ambas técnicas. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 67. Puede observarse que, siempre y cuando se trabaje a concentraciones inferiores a 20  $\mu\text{M}$ , no existen diferencias entre la estimación de la viabilidad celular llevada a cabo por MTT o SRB. Se concluyó, en consecuencia, que la técnica MTT resultaba apropiada para la determinación de la viabilidad del cultivo tras el tratamiento con los complejos de oro(I) derivados de 3-hidroxi flavonas y se utilizó en los ensayos posteriores.



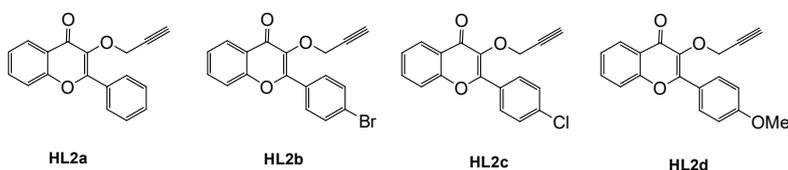
**Figura 67.** Influencia de la concentración (20, 10, 5, 2,5 y 1,25  $\mu\text{M}$ ) de los complejos de oro(I) coordinados con ligandos derivados de 3-hidroxi flavonas al ser analizado su efecto sobre la viabilidad de un cultivo de células Caco-2 tras 72h de incubación. Las figuras A y C corresponden a valores obtenidos mediante MTT; las figuras B y D, mediante SRB.

A continuación, se decidió analizar si los compuestos obtenidos podrían ser selectivos frente a CRC o si bien, por el contrario, podrían ser una potencial herramienta para el tratamiento de otras clases de tumores. Para ello, se calculó su efecto antiproliferativo, medido en términos de IC<sub>50</sub>, en la línea de hepatocarcinoma humano HepG2 y en un modelo de adenocarcinoma de mama, la línea MCF-7. Todos los resultados obtenidos

se recogen en la Tabla 12, en la que también se han incluido los datos ya mostrados en la Tabla 11B para facilitar la comparación.

**Tabla 12.** Valores de IC<sub>50</sub> (μM) obtenidos para los complejos de oro(I) con ligandos derivados de la 3-hidroxi flavona, así como de cisplatino y auranofin como controles positivos (fármacos de referencia), obtenidos tras 72h de incubación en células Caco-2, MCF-7 y HepG2. Los resultados se expresan como media ± desviación estándar.

Complejo	IC50 (μM)		
	Caco-2	MCF-7	HepG2
[Au(L2a)PPh <sub>3</sub> ] ( <b>3a</b> )	3,81 ± 1,18	2,08 ± 0,17	32,34 ± 4,27
[Au(L2b)PPh <sub>3</sub> ] ( <b>3b</b> )	1,52 ± 0,91	13,87 ± 0,78	3,38 ± 0,07
[Au(L2c)PPh <sub>3</sub> ] ( <b>3c</b> )	5,34 ± 0,05	8,99 ± 3,89	34,14 ± 5,88
[Au(L2d)PPh <sub>3</sub> ] ( <b>3d</b> )	4,78 ± 0,62	3,40 ± 0,85	47,97 ± 5,32
[Au(L2a)PTA] ( <b>4a</b> )	7,68 ± 1,74	18,49 ± 0,90	10,84 ± 0,67
[Au(L2b)PTA] ( <b>4b</b> )	6,42 ± 0,35	8,80 ± 3,14	11,25 ± 0,63
[Au(L2c)PTA] ( <b>4c</b> )	2,33 ± 1,26	7,57 ± 0,08	5,88 ± 0,04
[Au(L2d)PTA] ( <b>4d</b> )	5,22 ± 0,43	9,19 ± 2,89	10,70 ± 1,35
Cisplatin	37,24 ± 5,15	41,82 ± 0,07	49,85 ± 6,66
Auranofin	1,80 ± 0,10	0,77 ± 0,05	0,92 ± 0,08



Según puede observarse, aunque todos los complejos resultaron ser efectivos sobre los tres modelos tumorales estudiados, la línea Caco-2 fue la que mostró una mejor respuesta al tratamiento. Este dato preliminar podría sugerir que los complejos de oro(I) derivados de 3-hidroxi flavonas podrían ser más efectivos frente al CRC que frente a otros tipos de tumores. Por otro lado, tanto en células Caco-2 como MCF-7, todos los complejos dieron lugar a valores de IC<sub>50</sub> considerablemente más bajos que los del cisplatino, lo que sugiere un mayor efecto antitumoral que el de este fármaco estándar. Sin embargo, en la mayoría de los casos los complejos son menos efectivos que el auranofin en los tres modelos tumorales evaluados, con la única excepción de los complejos [Au(L2b)PPh<sub>3</sub>] (**3b**) y [Au(L2c)PTA] (**4c**), que en la línea Caco-2 dan lugar a valores comparables (1,52 ± 0,91 y 2,33 ± 1,26 μM respectivamente frente a 1,80 ± 0,10 μM).

En cuanto a los datos obtenidos sobre la línea HepG2, que es, en general, el modelo tumoral que peor responde al tratamiento, pueden observarse diferencias

considerables entre los complejos coordinados con PTA y sus equivalentes con PPh<sub>3</sub>. Mientras que los primeros muestran una toxicidad comparable a la observada sobre las líneas Caco-2 y MCF-7, los compuestos coordinados con PPh<sub>3</sub> poseen una eficacia mucho menor sobre el modelo de hepatocarcinoma, con la excepción de **3b**, cuyo IC<sub>50</sub> es 3,33 veces mayor que el de su homólogo de PTA. Curiosamente, este complejo mostró el efecto opuesto sobre la línea MCF-7. Estas diferencias volverán a ser discutidas más adelante. En cualquier caso, los datos obtenidos indican que no todos los tipos de tumor responderían del mismo modo al tratamiento con estos complejos, aunque parece que podrían ser candidatos a una posible terapia frente a CRC.

Para obtener una idea preliminar acerca de su posible selectividad, los complejos fueron incubados sobre la línea Caco-2 diferenciada durante 72h. Se calculó el valor del IC<sub>50</sub> y también el del índice de selectividad utilizando los datos obtenidos en la tabla anterior. De acuerdo con los valores reflejados en la Tabla 13, la serie de complejos con PPh<sub>3</sub> (complejos **3a-d**) mostró una selectividad considerablemente superior a la de sus homólogos con PTA (complejos **4a-d**) en las líneas Caco-2 y MCF-7, mientras que en la línea HepG2 se obtuvieron valores comparables para ambas series. No obstante, el complejo [Au(L2c)PTA] (**4c**) destacó por su selectividad en la línea Caco-2, al presentar un valor de índice de selectividad mucho más bajo que el de cisplatino y auranofin. Esto podría sugerir que se trata de un derivado más seguro que los dos anteriores y, por lo tanto, con un interesante potencial para ser aplicado en terapia.

**Tabla 13.** Estudio preliminar de la selectividad de los complejos de oro(I), cisplatino y auranofin mediante el cálculo del IC<sub>50</sub> tras 72h de exposición en células Caco-2 diferenciadas y la determinación del índice de selectividad a partir de los datos de IC<sub>50</sub> en células tumorales.

Complejo	IC <sub>50</sub> (μM) en Caco-2 diferenciadas	SI		
		Caco-2	MCF-7	HepG2
[Au(L2a)PPh <sub>3</sub> ] ( <b>3a</b> )	131,30 ± 38,54	34,46	63,13	4,06
[Au(L2b)PPh <sub>3</sub> ] ( <b>3b</b> )	43,89 ± 0,02	28,88	3,16	12,99
[Au(L2c)PPh <sub>3</sub> ] ( <b>3c</b> )	114,38 ± 9,24	21,42	12,72	3,35
[Au(L2d)PPh <sub>3</sub> ] ( <b>3d</b> )	75,45 ± 11,28	15,78	22,19	1,57
[Au(L2a)PTA] ( <b>4a</b> )	18,25 ± 1,34	2,38	0,99	1,68
[Au(L2b)PTA] ( <b>4b</b> )	24,39 ± 0,86	3,80	2,77	2,17
[Au(L2c)PTA] ( <b>4c</b> )	25,46 ± 0,66	10,93	3,36	4,33
[Au(L2d)PTA] ( <b>4d</b> )	25,29 ± 0,60	4,84	2,75	2,36
Cisplatino	151,13 ± 58,12	3,31	3,61	3,03
Auranofin	6,21 ± 0,44	3,45	8,06	6,75

Se decidió evaluar la lipofilicidad de los complejos en términos del coeficiente de reparto agua/n-octanol (*logP* a un pH de 7,4), obteniéndose valores en el rango 0,23-1,2

(Tabla 14), siendo más elevados los valores medidos en los complejos con  $\text{PPh}_3$  (**3a-d**), lo que estaría de acuerdo con una mayor lipofilidad en comparación con los complejos de PTA (**4a-d**). Al ser los flavonoides compuestos altamente lipofílicos, su administración por vía oral puede verse comprometida, por lo que se suele recurrir a estrategias alternativas de administración, entre las que se cuentan el empleo de nanocápsulas lipídicas, nanopartículas o micropartículas para vehiculizarlos<sup>52</sup>. En nuestro caso concreto, puede observarse que la funcionalización de las 3-hidroxiflavonas y la posterior coordinación del centro metálico han conducido a una disminución del carácter lipófilo, además de una cierta relación equilibrada entre lipofilidad e hidrofiliidad. Anteriormente, se mencionaba que la fosfina  $\text{PEt}_3$  podría ser la responsable de la toxicidad del auranofin sobre los tejidos sanos<sup>48,49</sup>. No obstante, los resultados obtenidos hasta el momento indican que podría ser posible revertir esta citotoxicidad mediante el diseño racional de fármacos, ya que al coordinar el centro metálico con el ligando derivado de la 3-hidroxiflavona las células no tumorales parecen ser menos sensibles al tratamiento que las células sanas. Por otra parte, la presencia de este ligando también podría correlacionarse con la menor toxicidad sobre los tejidos sanos por otras causas, puesto que el uso de flavonoides con fines terapéuticos rara vez da lugar a efectos secundarios. A modo de ejemplo, Andres *et al.*<sup>53</sup> realizaron una revisión acerca de los trabajos publicados en modelos animales y humanos a los que se administraban suplementos de quercetina y concluyeron que resultaban seguros salvo en aquellos individuos que identificaron como población de riesgo (por ejemplo, aquellos que tenían una pre-lesión a nivel renal), sobre los que se desaconsejaban tratamientos prolongados y concentraciones muy altas del flavonol.

Esta mayor tolerancia hacia los compuestos fenólicos que presentan los tejidos sanos en comparación con los tumores se debe a que el efecto de los polifenoles es distinto en cada caso. En el capítulo anterior se mencionaba que el tipo de célula, tumoral o no tumoral, puede ser uno de los responsables la dualidad antioxidante-pro-oxidante que muestran estos compuestos bioactivos<sup>54</sup>. Este no es el supuesto de interés que podemos encontrar en la literatura científica. También se ha investigado en detalle el potencial de los flavonoides como quelantes de metales; no solo se ha observado que pueden reducir el daño oxidativo sobre las biomoléculas causado por los metales, sino que además los complejos flavonoide-metal poseen una mayor capacidad antioxidante que los flavonoides libres<sup>55,56</sup>. Es decir, podría resultar plausible suponer que la presencia del ligando 3-hidroxiflavona puede revertir la toxicidad derivada de la fosfina  $\text{PPh}_3$  en células sanas de acuerdo con los dos casos descritos. Sin embargo, con los datos obtenidos hasta el momento no es posible afirmarlo con seguridad y deberían llevarse a cabo distintos ensayos para validar esta hipótesis.

Por otro lado, los datos recogidos en la Tabla 14 muestran que  $[\text{Au}(\text{L2c})\text{PTA}]$  (**4c**), previamente mencionado por poseer un índice de selectividad mayor que el de cisplatino y auranofin sobre la línea Caco-2 (Tabla 13), presenta un balance óptimo entre

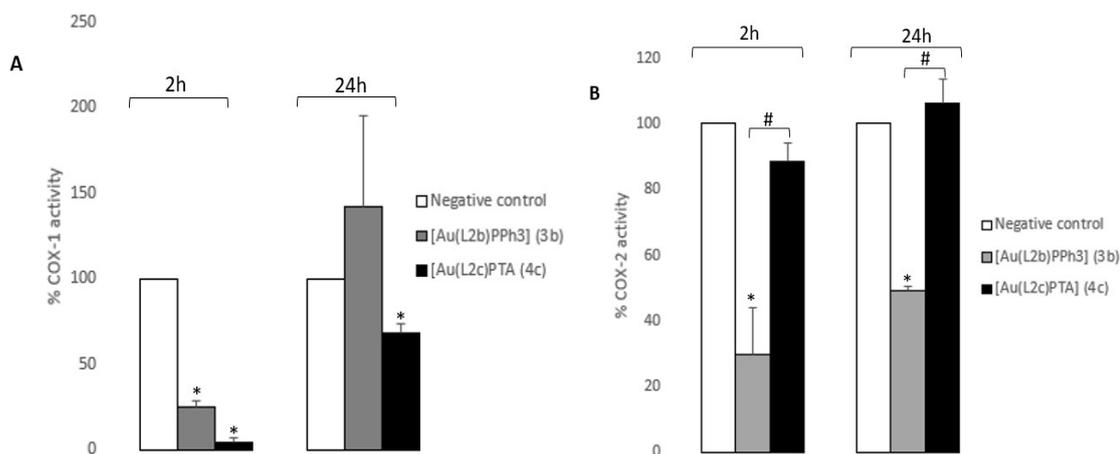
hidrofilicidad y lipofilicidad en comparación con el resto de los complejos. Este valor es muy próximo al calculado para el complejo [Au(PhC≡C)PTA] (**1a**) (ver Capítulo 1, pág. 121; Tabla 4), lo que podría implicar una mejor entrada en la célula de acuerdo con lo discutido anteriormente. Esta podría ser la explicación por la cual ejerce un mayor efecto antitumoral sobre los tres modelos celulares en comparación con el resto de complejos de la serie (Tabla 12).

**Tabla 14.** Valor del coeficiente de reparto agua/octanol en términos de logP de los complejos de oro(I) derivados de 3-hidroxiflavonas, así como de cisplatino y auranofin.

Complejo	LogP <sub>7,4</sub>
[Au(L2a)PPh <sub>3</sub> ] ( <b>3a</b> )	0,99
[Au(L2b)PPh <sub>3</sub> ] ( <b>3b</b> )	0,92
[Au(L2c)PPh <sub>3</sub> ] ( <b>3c</b> )	1,17
[Au(L2d)PPh <sub>3</sub> ] ( <b>3d</b> )	1,2
[Au(L2a)PTA] ( <b>4a</b> )	0,78
[Au(L2b)PTA] ( <b>4b</b> )	0,80
[Au(L2c)PTA] ( <b>4c</b> )	0,23
[Au(L2d)PTA] ( <b>4d</b> )	0,44
<b>Cisplatino</b>	-0,53
<b>Auranofin</b>	-2,53

De acuerdo con estos datos preliminares de citotoxicidad y selectividad, se escogió al complejo más prometedor de cada serie de derivados para realizar posteriores análisis acerca de su mecanismo de acción: los complejos [Au(L2b)PPh<sub>3</sub>] (**3b**) y [Au(L2c)PTA] (**4c**). En lo relativo a **3b**, además de por los parámetros ya mencionados, resultaba interesante por un tercer motivo: su aparente menor efecto citotóxico sobre la línea MCF-7. Estos datos parecían sugerir que era capaz de interactuar con una diana farmacológica presente en las líneas Caco-2 y HepG2, pero que no se encontraba en las células MCF-7, lo que explicaría por qué presentaba un valor de IC<sub>50</sub> más alto que el de sus homólogos sobre este modelo tumoral. De entre las numerosas diferencias a nivel molecular que existen entre estas tres líneas celulares, destacó la ausencia de expresión endógena de la isoforma 2 de la enzima ciclooxigenasa (COX-2) en la línea MCF-7, al contrario de lo que ocurre en las otras dos líneas tumorales<sup>57-59</sup>.

Por lo tanto, el primer ensayo que se planteó fue la determinación de la actividad de la COX-2 en la línea Caco-2 tras 2 y 24h de exposición a los complejos **3b** y **4c**. Además, se midió de igual manera la actividad de la isoforma 1 (COX-1) para que, en caso de que se encontrase inhibición de la COX-2, pudiese concretarse si esta inhibición era o no selectiva de esta isoforma, lo que podría ser de interés para predecir posibles efectos secundarios en caso de llevarse los complejos a la práctica clínica (Figura 68).



**Figura 68.** Medida de la actividad de la enzima COX. A) Determinación de la actividad de la enzima COX-1 en células Caco-2 tras 2 y 24h de incubación con **3b** y **4c** ( $IC_{50}$ ). \* $p < 0,05$  vs control negativo. B) Determinación de la actividad de la enzima COX-2 en células Caco-2 tras 2 y 24h de incubación con **3b** y **4c** ( $IC_{50}$ ). \* $p < 0,05$  vs control negativo. # $p < 0,05$  vs complejo de oro.

En cuanto al efecto del tratamiento sobre la isoforma 1, puede observarse que ambos complejos son capaces de inhibirla a tiempos cortos de incubación, si bien este efecto se pierde paulatinamente conforme aumentamos el periodo de exposición (Figura 68A). En el caso de **3b** (con PPh<sub>3</sub>), la pérdida de efecto inhibitorio es total, mientras que **4c** (con PTA) todavía es capaz de inhibir la actividad de la enzima de forma significativa ( $p < 0,05$ ), aunque este efecto no es tan acusado como el que se observa inicialmente. Por tanto, el complejo [Au(L2c)PTA] (**4c**) parece actuar a través de la inhibición de la enzima COX-1. Esto podría ser interesante de cara a utilizarlo para el tratamiento de tumores que no expresen COX-2, ya que tendrán una mayor dependencia de la isoforma 1 para mantener el estatus pro-inflamatorio, como por ejemplo algunos tumores de ovario<sup>60,61</sup>.

Por otro lado, el complejo **3b** es capaz de inhibir a la isoforma 2, siendo este efecto independiente del tiempo de exposición, mientras que, por su parte, el complejo **4c** no muestra signos de alterar la actividad de la COX-2 (Figura 68B). A la vista de los resultados obtenidos, no puede afirmarse que **3b** sea un inhibidor selectivo de la COX-2, ya que la aparente pérdida de efecto inhibitorio sobre la COX-1 a lo largo del tiempo podría ser consecuencia de un mecanismo de compensación celular que aumente la expresión y/o la actividad de esta enzima. Esta hipótesis se sustenta sobre la importancia de la actividad de la enzima ciclooxigenasa para la supervivencia de la célula

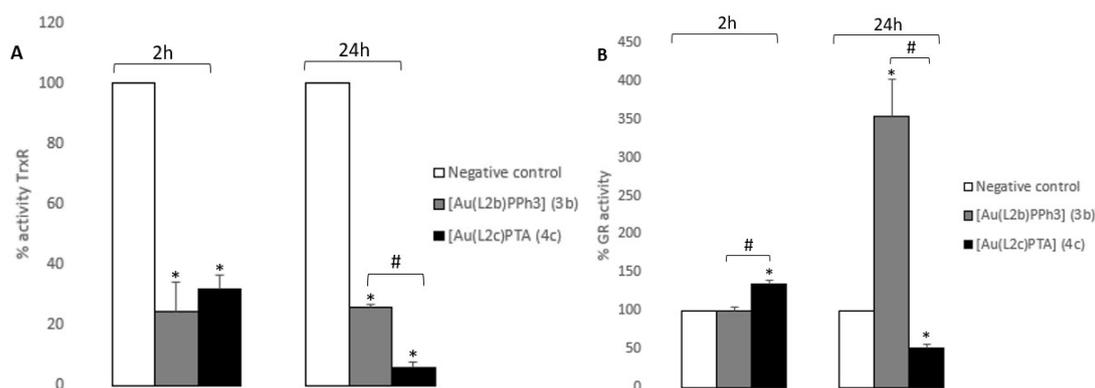
tumoral<sup>24,26,33,34</sup>. Si bien no se han encontrado datos que validen la idea de que el bloqueo de COX-2 tenga como consecuencia una sobreexpresión de COX-1, sí existen datos acerca del fenómeno a la inversa, esto es, una sobreexpresión de COX-2 en respuesta al bloqueo de la isoforma 1 en la mucosa gástrica, siendo este un mecanismo de compensación para evitar daños a nivel gastrointestinal<sup>62</sup>. Por tanto, con los datos de la literatura actual, no es posible confirmar ni descartar que esté teniendo lugar un mecanismo de compensación y son necesarios más estudios a este respecto. En conclusión, los datos mostrados en la Figura 68 permiten concluir que el complejo [Au(L2b)PPh<sub>3</sub>] (**3b**) inhibe a la enzima COX-2, aunque de acuerdo con el ensayo realizado a tiempo corto de incubación (2h) no puede afirmarse que esta inhibición sea selectiva, ya que también parece ser capaz de inhibir en cierto grado a la isoforma 1. Por otra parte, no se ha determinado si esta inhibición es de tipo directo o indirecto, de modo que un planteamiento interesante podría pasar por estudiar el efecto del tratamiento con ambos complejos sobre los niveles de expresión de la enzima.

La posibilidad de que los complejos de oro sean capaces de interaccionar con la enzima ciclooxigenasa ha sido poco explorada hasta el momento. Se han encontrado en la literatura existente dos trabajos previos en los que se recogen evidencias claras acerca de que un compuesto de oro, el auranofin en ambos casos, ha sido capaz de reducir la actividad de esta enzima. Ott *et al.*<sup>63</sup> observaron que el auranofin podía inhibir a la COX-1 de forma directa, si bien los autores trabajaron con concentraciones muy altas del compuesto (10 y 100  $\mu\text{M}$ ), lo que de acuerdo con nuestros datos resultaría muy tóxico para los tejidos sanos (se ha estimado un  $\text{IC}_{50}$  de  $6,2 \pm 0,44 \mu\text{M}$  sobre el modelo no tumoral; Tabla 13). Por otra parte, un interesante estudio realizado sobre un modelo monocítico de ratón (línea RAW264.7) reveló que la incubación durante 1h con dos concentraciones de auranofin (5 y 10  $\mu\text{M}$ ) podía disminuir los niveles de expresión de COX-2 en respuesta a una inducción de inflamación con lipopolisacárido, siendo este efecto dependiente de la concentración<sup>64</sup>. Si bien este ensayo no se ha replicado en un modelo tumoral, y por tanto sería arriesgado asumir que las células cancerosas podrían comportarse de manera equivalente, no deja de ser un resultado muy interesante en cuanto a que se trata de un dato preliminar acerca de la potencial capacidad de los complejos de oro(I) de inhibir de forma indirecta a la COX-2. No debe perderse de vista, sin embargo, que las concentraciones de auranofin utilizadas en este trabajo también se encuentran por encima del valor de  $\text{IC}_{50}$  hallado en nuestro modelo no tumoral (Tabla 13), y que existe un potencial riesgo de toxicidad sobre los tejidos sanos en caso de aplicarlas en pacientes humanos. En cualquier caso, los dos ejemplos aquí presentados parecen indicar que los complejos de oro(I) no muestran una gran afinidad por la ciclooxigenasa, por lo que podemos suponer que los resultados obtenidos son debidos, en parte, a la presencia del ligando derivado de la molécula de 3-hidroxiflavona. Por otra parte, las dos evidencias encontradas relativas a la capacidad del auranofin de inhibir a esta enzima sugieren que este derivado podría bloquear su acción tanto de un modo directo como indirecto, lo cual refuerza nuestra tesis anterior en relación al interés de

estudiar el efecto de los complejos **3b** y **4c** sobre la expresión génica de ambas isoformas de la enzima ciclooxigenasa.

A diferencia de lo que ocurre con los complejos de oro(I), sí existen numerosas evidencias acerca de la capacidad de las flavonas de inhibir de forma directa la actividad de la enzima COX, según se ha mencionado anteriormente<sup>16,17</sup>. Por ello, es posible que la afinidad natural entre el ligando y la enzima sea la responsable de dirigir al compuesto metálico hacia la proteína, favoreciendo así una interacción y permitiendo su bloqueo a concentraciones más bajas que las encontradas en la literatura anterior. En este sentido, la elección de un ligando que dirija al fármaco hacia una diana en concreto puede ser la responsable directa de su eficacia antitumoral. Dos ejemplos que ilustran bien esta situación son la coordinación de un centro de rutenio(II) a un derivado del valecoxib<sup>65</sup> y la coordinación de un centro de cobalto a un derivado del ácido acetilsalicílico<sup>66</sup>. En ambos casos, los autores lograron inhibir eficazmente a la ciclooxigenasa e inducir la muerte de las células tumorales. De acuerdo con esta hipótesis, coordinar el centro metálico con un ligando que siente afinidad natural por la enzima ciclooxigenasa podría aumentar la limitada capacidad que parecen presentar los complejos de oro(I) por la misma, de acuerdo con los resultados de Ott *et al.*<sup>63</sup>, y permitir así un bloqueo de la actividad enzimática utilizando concentraciones de los derivados metálicos mucho más bajas. Por consiguiente, con el diseño racional de fármacos y variando los ligandos de coordinación parece posible aumentar el rango de dianas terapéuticas de los complejos de oro(I), con lo que se amplían las posibilidades a la hora de tratar diferentes subtipos tumorales.

Volviendo a los datos mostrados en la Tabla 12, el hecho de que el complejo [Au(L2b)PPh<sub>3</sub>] (**3b**), pero no **4c** ([Au(L2c)PTA]), sea capaz de inhibir a la isoforma 2 de la ciclooxigenasa podría explicar por qué tiene menos efecto sobre la línea MCF-7 que el equivalente coordinado con PTA, ya que, según se mencionaba previamente, este modelo tumoral no expresa COX-2<sup>57</sup>. Por otra parte, esto sugiere que existe al menos otra diana para **3b**, puesto que en caso de que solamente actuase a través de la inhibición de la COX-2 su IC<sub>50</sub> en la línea MCF-7 sería mucho mayor, incluso llegando a no mostrar ningún efecto citotóxico. Dado que una de las dianas más típicas de los complejos de oro es la enzima redox tiorredoxina reductasa (TrxR), se midió su actividad tras 2 y 24h de incubación con ambos complejos. Además, se analizó el efecto de los mismos tiempos de incubación sobre la enzima glutatión reductasa (GR), puesto que, de acuerdo con lo desarrollado en apartados anteriores, la afinidad que sienten por ella los complejos de oro es prácticamente nula al no tratarse de una selenoproteína (Figura 69).



**Figura 69.** Análisis de la actividad de enzimas redox. A) Medida de la actividad de la enzima TrxR de células Caco-2 tras 2 y 24h de incubación con **3b** y **4c** ( $IC_{50}$ ). \* $p < 0,05$  vs control negativo. # $p < 0,05$  vs complejo de oro. B) Medida de la actividad de la enzima GR de células Caco-2 tras 2 y 24h de incubación con **3b** y **4c** ( $IC_{50}$ ). \* $p < 0,05$  vs control negativo. # $p < 0,05$  vs complejo de oro.

En la Figura 69A puede observarse que ambos complejos son capaces de inhibir a la tiorredoxina reductasa, aunque se observa un comportamiento diferente en cada caso. El efecto del complejo **3b** es independiente del tiempo de incubación, al contrario que el del complejo **4c** que aumenta conforme se incrementa el periodo de exposición al derivado. En cualquier caso, estos datos ponen de manifiesto, una vez más, la capacidad de interacción entre los complejos de oro(I) y esta enzima redox; no obstante, en este supuesto concreto es posible que la presencia del ligando derivado de la 3-hidroxi flavona favorezca la interacción complejo-TrxR, al menos en parte. Si anteriormente mencionábamos que las flavonas son capaces de inhibir de manera directa a la enzima COX, se han encontrado resultados similares con la TrxR en estudios llevados a cabo con quercetina y otros polifenoles<sup>67</sup>. Tomando estos datos en consideración, se podría establecer una hipótesis similar a la previamente desarrollada en el caso de la interacción complejo-COX, de acuerdo con la cual la unidad 3-hidroxi flavona contribuye a un acercamiento físico entre el derivado metálico y la tiorredoxina reductasa que facilita una inhibición directa de la actividad enzimática. Por tanto, estos resultados también podrían apoyar nuestra hipótesis inicial acerca de los beneficios de utilizar ligandos con una cierta capacidad antitumoral para maximizar los efectos terapéuticos de los complejos de oro(I).

Por otro lado, también se ha observado una alteración en la actividad normal de la glutatión reductasa en respuesta al tratamiento con **3b** y **4c**, siendo los resultados obtenidos muy diferentes de acuerdo con el complejo utilizado (Figura 69B). A tiempos cortos de incubación, el tratamiento con [Au(L2b)PPh<sub>3</sub>] (**3b**) no tiene ningún efecto sobre la GR, aunque pasadas 24h se observa un aumento significativo ( $p < 0,05$ ) en su actividad. Según se ha mencionado anteriormente, esto podría tratarse de un mecanismo compensatorio de la célula debido al bloqueo de la TrxR, ya que el sistema glutatión es capaz de reducir a la tiorredoxina en casos similares (ver apartado 1.5; Figura 20)<sup>68,69</sup>. Este comportamiento es similar al mostrado por el complejo

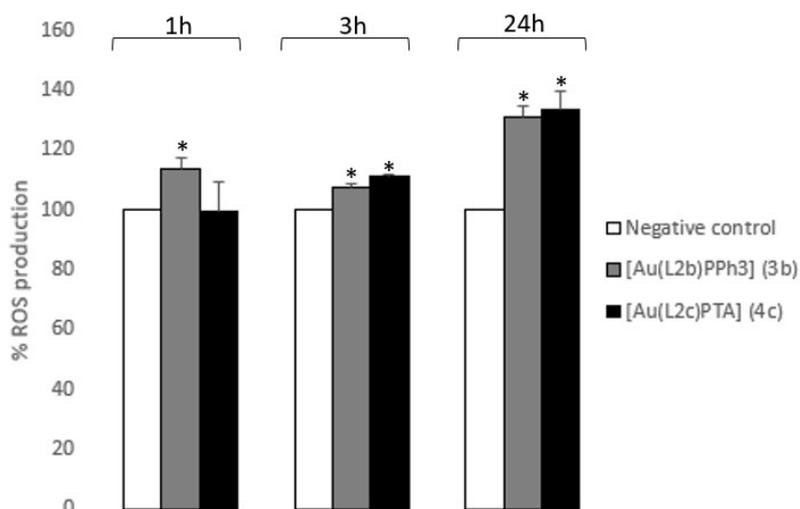
[Au(C≡CPh)(PTA)] (**1a**) (ver Capítulo 1, pág. 139; Tabla 8); es decir, podríamos considerar que **3b** es un inhibidor selectivo de la TrxR frente a otras enzimas redox que no sean selenoproteínas.

Los resultados obtenidos tras la incubación con el análogo con PTA (**4c**) son, sin embargo, completamente diferentes. Inicialmente (tiempo de incubación: 2h), se observa un incremento significativo de la actividad de la glutatión reductasa, pero conforme aumenta el tiempo de exposición este efecto se revierte, de modo que tras 24h se aprecia una inhibición significativa de la función normal de la enzima. Este comportamiento es poco frecuente en un complejo de oro(I), aunque existen algunos ejemplos de inhibición de la GR por parte de esta clase de derivados. Tabrizi *et al.*<sup>71</sup> diseñaron dos complejos multinucleares de paladio y oro capaces de inhibir a la GR, aunque no es posible determinar si su afinidad por la enzima se debe a la presencia del oro o a la del paladio; no obstante, en un estudio independiente publicado el mismo año por Parrilha *et al.*<sup>70</sup> los autores evaluaron la capacidad de una serie de complejos de paladio(II) de inhibir a la GR, encontrando que los derivados no eran capaces de modificar su actividad de ningún modo. Por tanto, el efecto observado por Tabrizi *et al.*<sup>71</sup> podría ser debido a la presencia del átomo de oro, aunque debe tenerse en cuenta que sus ensayos fueron realizados con enzimas puras, por lo que no puede suponerse que los resultados obtenidos se repliquen sobre un modelo tumoral. Posteriormente, Deponte *et al.* obtuvieron unos resultados más prometedores en cuanto a la capacidad de inhibir a la glutatión reductasa con un complejo de oro con un ligando de tipo fosfol (fosfaciclopentadieno), aunque de nuevo los ensayos se realizaron utilizando proteínas recombinantes y no en el medio intracelular<sup>72</sup>. Es decir, podríamos encontrarnos ante el primer caso de un complejo de oro(I) que es capaz de inhibir a la enzima GR en el medio intracelular. La inusual afinidad por esta proteína podría estar mediada, de nuevo, por la presencia del ligando derivado de la 3-hidroxiflavona, ya que de acuerdo con estudios *in vitro* los flavonoides son capaces de inhibir a la GR, aunque en el proceso pueden influir la concentración del compuesto bioactivo, el tiempo de exposición, parámetros estructurales, el estatus redox de la enzima o la presencia de radicales libres en el medio de reacción, entre otros parámetros<sup>73,74</sup>. No obstante, los resultados obtenidos en ensayos con enzimas puras no siempre se reproducen en el medio intracelular, puesto que Rodgers *et al.* observaron que al incubar células MCF-7 con quercetina se producía un aumento de la actividad de la GR<sup>75</sup>. Nuestros datos parecen sugerir que el uso de la unidad 3-hidroxiflavona en lugar del flavonoide completo podría dotar al complejo metálico de la afinidad por la enzima que posee el polifenol, pero no influye sobre la respuesta celular que promueve un mecanismo compensatorio de acuerdo con el cual se incrementa la actividad de la glutatión reductasa. Por supuesto, este efecto parece depender de otras de las características del complejo resultante, ya que el complejo coordinado con PPh<sub>3</sub> (**3b**) no posee la capacidad inhibitoria del derivado con PTA (**4c**). Todas estas consideraciones deben ser tenidas en cuenta a la hora de sintetizar nuevos agentes quimioterapéuticos capaces de inhibir a la glutatión reductasa.

A nivel clínico, la doble inhibición de GR y TrxR que lleva a cabo el complejo **4c** podría tener un gran potencial terapéutico, puesto que se está privando a la célula no solo de su principal sistema redox sino también de su sistema de emergencia<sup>76</sup>. Además, los niveles de expresión de la GR, de forma similar a los que ocurre con los de la TrxR, pueden estar relacionados con la resistencia a la quimioterapia<sup>77</sup>. Por consiguiente, el complejo [Au(L2c)PTA] (**4c**) podría ser de gran interés para tratar tumores agresivos, como aquellos que reaparecen tras una remisión inicial.

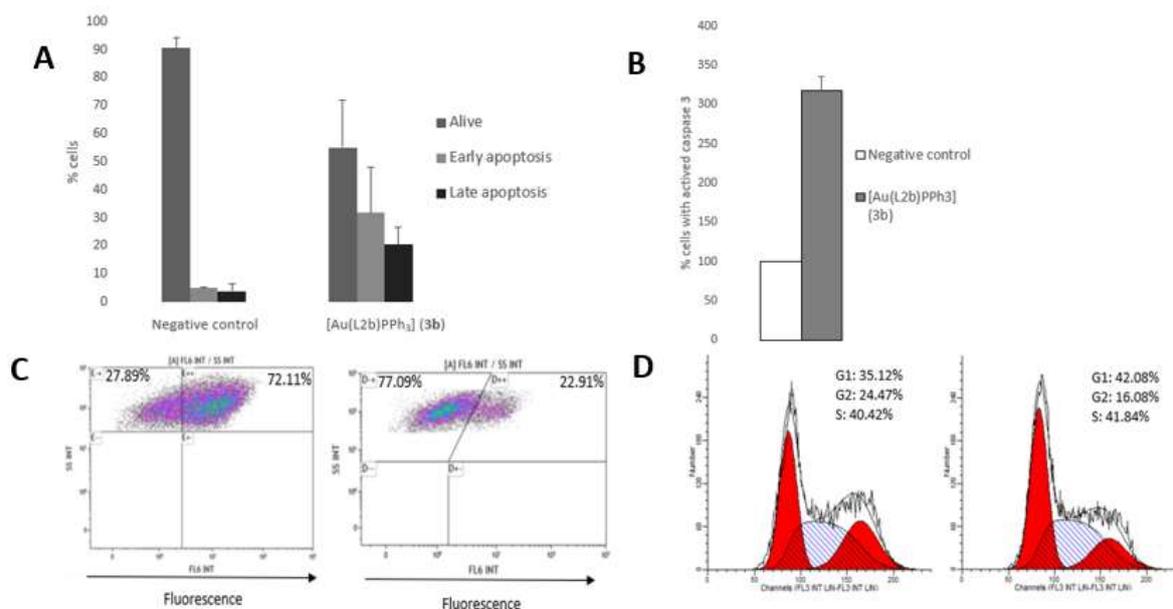
Además de la hipótesis ya desarrollada, según la cual **4c** podría inhibir de manera directa a la enzima GR, existe una posible explicación alternativa al descenso de la actividad enzimática mostrado en la Figura 69B. Villegas *et al.*<sup>78</sup> observaron que la inhibición de la COX-1 podría tener como consecuencia una disminución en los niveles de actividad de la GR. Debe tenerse en cuenta que este estudio no se ha realizado sobre un modelo tumoral sino sobre el estómago de ratas tras ser sometidas a estrés oxidativo, por lo que no puede asegurarse que la línea Caco-2 responda de igual modo. Sin embargo, no debe descartarse esta posibilidad con los datos de los que disponemos hasta el momento y serían necesarios experimentos adicionales. En cualquier caso, esta posibilidad no invalida el hecho de que, al inhibir tanto a la TrxR como a la GR, el complejo **4c** posee un interesante potencial frente a tumores que desarrollan resistencia a la quimioterapia de primera elección.

Al estar tan comprometida la defensa antioxidante tras el tratamiento con ambos complejos, era de esperar que se produjese un desequilibrio redox considerable. Por ello, se estudiaron los niveles de ROS a diferentes tiempos de incubación (1, 3 y 24h) con ambos complejos (Figura 70). Aunque los dos derivados estudiados inducen un incremento significativo en la producción de ROS pasadas 24h de incubación, el complejo **3b** muestra un efecto pro-oxidante más rápido que el **4c**, puesto que tras 1h de incubación ya se aprecian cambios significativos ( $p < 0,05$ ), mientras que el compuesto con PTA (**4c**) requiere hasta 3h de exposición. Esto podría ser consecuencia del incremento en la actividad GR que se produce tras 2h de incubación con **4c** (Figura 69B). Por otra parte, debe tenerse en cuenta que la inhibición de la COX-2 también puede dar lugar a un aumento de los niveles de ROS, por lo que la contribución a la acción pro-oxidante del complejo **3b** podría estar mediada por tres factores: inhibición de COX-2, inhibición de TrxR y ausencia de aumento en la actividad GR a tiempos cortos de exposición. El hecho de que este incremento en los niveles de ROS causado por el complejo [Au(L2b)PPh<sub>3</sub>] (**3b**) se mantenga a las 24h a pesar del considerable aumento de la actividad GR podría ser explicado, a su vez, por la doble inhibición COX-2/TrxR. De acuerdo con esta hipótesis, la GR no podría compensar el desequilibrio redox causado por la inhibición conjunta de ambas enzimas.



**Figura 70.** Medida de los niveles de ROS en células Caco-2 tras 1, 3 y 24h de incubación con **3b** y **4c** ( $IC_{50}$ ). \* $p < 0,05$  vs control negativo.

Finalmente, se estudió el tipo de muerte producida por ambos compuestos tras 24h de incubación. En lo que respecta al complejo  $[Au(L2b)PPh_3]$  (**3b**), al ser administrado al cultivo de células Caco-2 indujo un aumento de 5,9 veces en la población de células en apoptosis tardía. Se observó asimismo un incremento en el número de células en apoptosis temprana, si bien no resultó significativo respecto al control negativo (Figura 71A). El tratamiento con el derivado metálico también produjo un aumento en la activación de la caspasa ejecutora 3, lo que sugiere que se induce apoptosis dependiente de caspasas. Por otra parte, al no encontrarse cambios en la población necrótica, se descartó que el complejo indujese necrosis (Figura 71B). En este caso, no se estudió en profundidad la vía según la cual se llevaba a cabo la apoptosis, aunque sí se analizó la integridad mitocondrial como estudio preliminar. Se encontró un aumento en el número de células cuyo  $\Delta\psi$  había disminuido (Figura 71C), lo que podría considerarse como indicativo de que se ha activado la vía intrínseca en respuesta al tratamiento<sup>79,80</sup>. No obstante, este dato no excluye la posibilidad de que el tratamiento haya inducido la vía extrínseca de la apoptosis y esto haya tenido como consecuencia la despolarización de la mitocondria<sup>81</sup> (ver apartado 1.2; Figura 7). El último marcador de daño celular que se estudió fue la progresión en el ciclo celular. El tratamiento con **3b** causó un aumento en la población celular en la fase  $G_1$  del ciclo celular concomitante con un descenso en el número de células en la fase  $G_2$  (Figura 71D). Según se ha desarrollado anteriormente, la apoptosis y la progresión en el ciclo poseen una estrecha conexión, puesto que al existir daños considerables en el ADN se bloquea el ciclo celular en los puntos de control y se inicia la apoptosis<sup>82-84</sup>. En este caso, el cese en el ciclo se produce en el primero de los puntos de control, por lo que los daños causados al ADN podrían ser mínimos, lo que es de interés ya que podría implicar una baja toxicidad sobre los tejidos sanos<sup>84</sup>. Los datos obtenidos hasta el momento sugieren que **3b** es capaz de inducir la muerte de las células Caco-2 por apoptosis tras 24h de incubación.



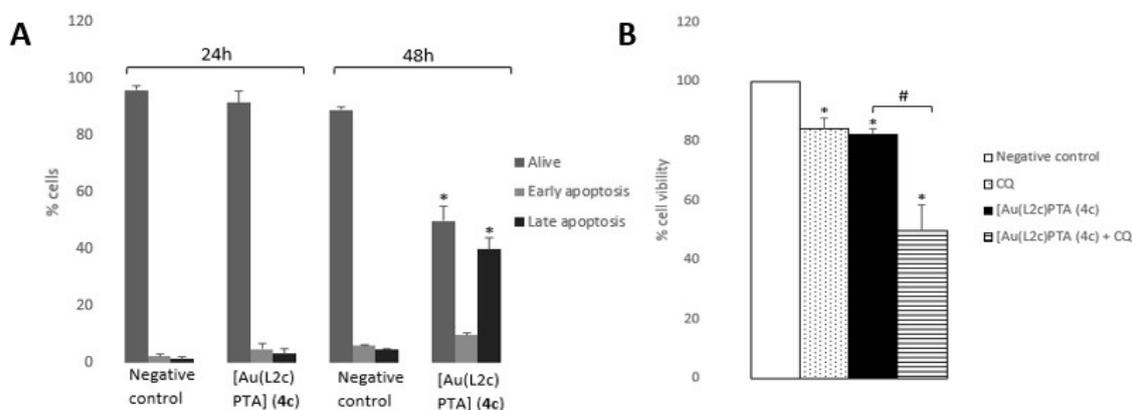
**Figura 71.** Análisis del tipo de muerte celular inducido por el complejo [Au(L2b)PPh<sub>3</sub>] (**3b**) ( $IC_{50}$ ) tras 24h de tratamiento sobre la línea Caco-2. A) Porcentaje de células vivas, en apoptosis tardía y en apoptosis temprana. \* $p < 0,05$  vs control negativo. B) Porcentaje de células con caspasa 3 activada. \* $p < 0,05$  vs control negativo. C) Análisis de la integridad del potencial de membrana mitocondrial en términos de pérdida de fluorescencia. Los porcentajes de cada tipo de población celular (con el potencial alterado o sin alterado) se indican en cada recuadro. D) Análisis del ciclo celular; los porcentajes de células en cada fase del ciclo se indican en el histograma.

Por otro lado, para analizar el tipo de muerte inducida por el complejo [Au(L2c)PTA] (**4c**), fue necesario incrementar el tiempo de exposición de 24 a 48h, puesto que hasta ese momento no se observaba un aumento significativo ( $p < 0,05$ ) en el número de células en apoptosis tardía, que daba lugar a su vez a un descenso en la población de células vivas (Figura 72A). Esta diferencia podría guardar relación con los datos previamente mostrados en la Figura 70, ya que **3c** necesita un tiempo de incubación menor que **4c** para causar una ruptura del equilibrio redox, lo que podría estar a su vez relacionado con su capacidad de inducir apoptosis debido al papel clave que suele tener una producción excesiva de ROS en la muerte de las células tumorales<sup>85</sup>. De acuerdo con esta hipótesis, el efecto prooxidante de los complejos estaría directamente relacionado con su capacidad de causar la muerte a la célula tumoral.

No obstante, en el apartado 1.2 se ha mencionado que la activación de la autofagia como mecanismo de supervivencia puede ser la responsable de la falta de eficacia de la quimioterapia<sup>86,87</sup>. Siendo el complejo **4c**, al igual que **3b**, un compuesto capaz de interactuar con varias dianas (**multitarget**), resulta una hipótesis poco plausible que el hecho de necesitar dos horas más para causar un aumento significativo en los niveles de ROS fuese el único responsable de que fuesen necesarias 24h más de incubación con **4c** para inducirse la apoptosis. Es decir, los datos obtenidos hasta el momento parecen

sugerir que existe algún mecanismo que bloquea la apoptosis durante las primeras 24h de incubación.

Por ello, se decidió analizar la viabilidad del cultivo tras 24h de incubación con el complejo **4c** en presencia del inhibidor de autofagia cloroquina (CQ). Se encontró un descenso significativo ( $p < 0,05$ ) de la viabilidad celular en comparación con las células que no fueron pre-tratadas con CQ (Figura 72B). Estos datos sugieren que el tratamiento con **4c** tiene como consecuencia la puesta en marcha de la autofagia como mecanismo de supervivencia, por lo que en caso de ser utilizado en la práctica clínica podría beneficiarse de ser incluido en un cóctel de fármacos que incluyese a un bloqueante de esta ruta metabólica<sup>88-90</sup>. Los datos obtenidos sugieren que, por el contrario, el complejo **3b** no se enfrenta a este problema, puesto que a las 24h se encuentra una activación considerable de la apoptosis. Retomando los datos relativos al coeficiente de reparto de los complejos (Tabla 14), la mayor tendencia lipófila de este compuesto podría estar tras este fenómeno. Se ha descrito que los complejos preeminente lipófilos tienen una alta tendencia a acumularse en el interior del lisosoma y causar deficiencias en su funcionamiento, lo que deriva en una autofagia incompleta y en la muerte de la célula. Si bien estos fármacos lisosomotrópicos suelen poseer coeficientes de reparto con un valor superior a 2<sup>91,92</sup>, no puede descartarse que **3b** presente una tendencia a acumularse en este orgánulo y a alterar su función normal en cierto grado, ya que esto podría explicar por qué no se observa un impedimento a la inducción de apoptosis tras 24h de incubación.



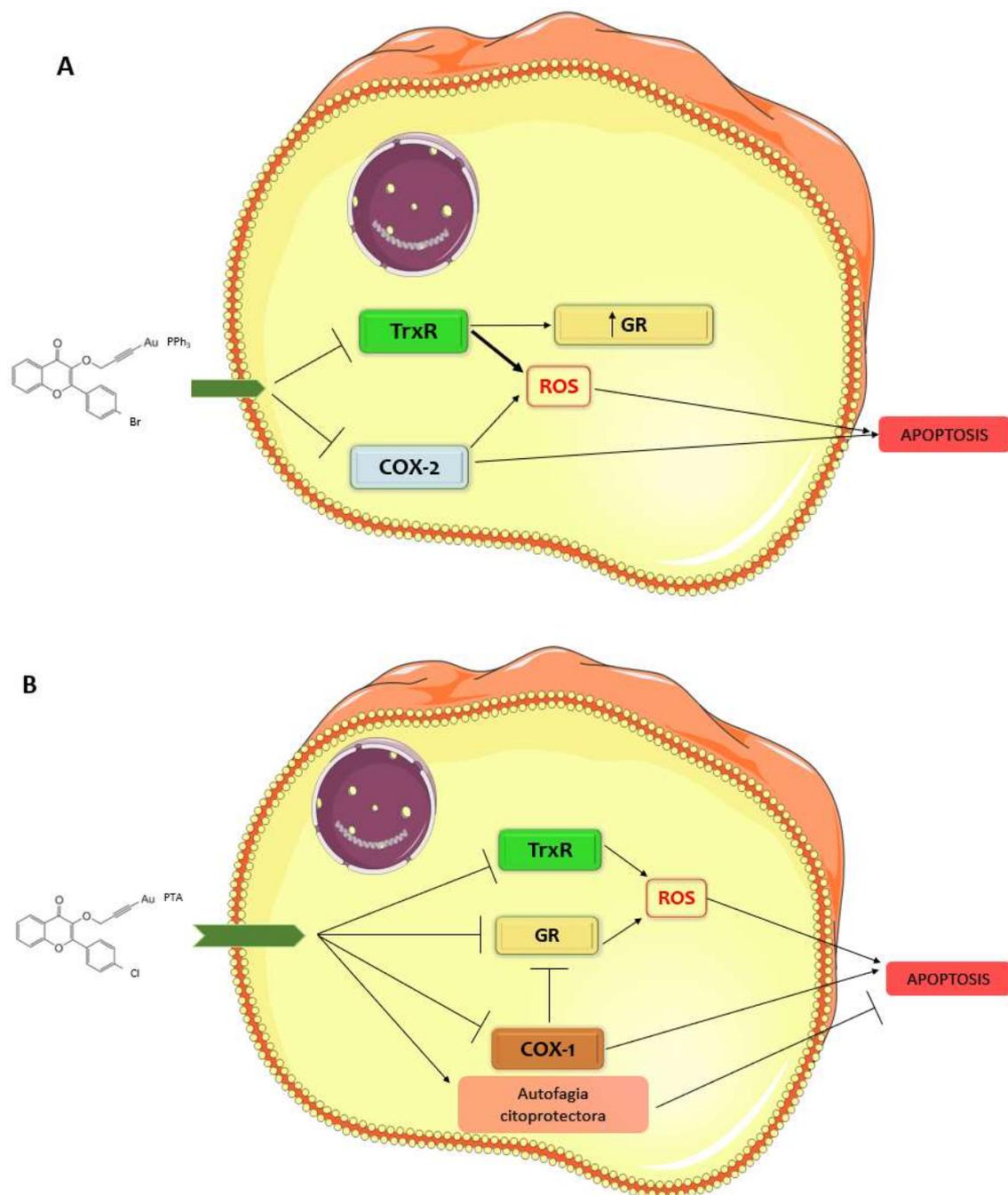
**Figura 72.** Estudio de la inducción de muerte celular causada por complejo [Au(L2c)PTA] (**4c**) ( $IC_{50}$ ). A) Porcentaje de células vivas, en apoptosis tardía y en apoptosis temprana tras 24 y 48h. \* $p < 0,05$  vs control negativo. B) Determinación de la viabilidad celular tras 24h de incubación en presencia o no de CQ (10  $\mu$ M, 1h). \* $p < 0,05$  vs control negativo. # $p < 0,05$  vs ausencia de CQ.

En conclusión, se ha observado que el uso de ligandos que ya tienen una cierta actividad anticancerígena por sí solos, en este caso, la unidad 3-hidroxiflavona, puede contribuir considerablemente al efecto biológico de los complejos de oro(I). El uso de este ligando podría ser el responsable del potencial *multitarget* observado, dado que parece favorecer la interacción del complejo de oro(I) con la enzima ciclooxigenasa, una

diana poco habitual para esta clase de derivados metálicos. De la misma forma, puede influir sobre la interacción con la enzima redox glutatión reductasa, otra proteína por la que esta clase de derivados metálicos no suele sentir afinidad. Los complejos estudiados en este trabajo causan una ruptura del equilibrio redox que puede influir sobre la inducción de la muerte de la célula tumoral, ya que el centro metálico es capaz, asimismo, de interferir con la acción normal de la enzima tiorredoxina reductasa. Por otra parte, la elección del segundo ligando también ha resultado ser de gran importancia, puesto que la coordinación de la fosfina  $\text{PPh}_3$  conduce a un ligero aumento del carácter lipófilo del complejo resultante en comparación con el derivado con la fosfina hidrosoluble PTA, lo que parece ser una ventaja, ya que podría ser el responsable de la ausencia de activación de autofagia. En cualquier caso, los dos complejos estudiados en detalle resultan de interés como nuevos fármacos para quimioterapia y podrían tener un gran potencial en la práctica clínica.

Por un lado, el complejo  $[\text{Au}(\text{L2b})\text{PPh}_3]$  (**3b**) actúa a través de la inhibición de la enzima redox tiorredoxina reductasa y la isoforma 2 de la enzima ciclooxigenasa. Al estar ambas sobreexpresadas, por lo general, en los tumores colorrectales, este derivado se postula como una interesante alternativa a las actuales terapias frente a esta clase de cáncer. No obstante, los datos obtenidos sugieren que podría ser menos eficaz en tumores que no expresan COX-2, como es el caso de algunos adenocarcinomas de mama. Por tanto, este caso muestra una vez más la importancia de combinar investigación básica y medicina personalizada para dar con el fármaco más apropiado para un tumor concreto. Por otro lado, parece que a largo plazo no afecta la actividad de COX-1, por lo que sus efectos secundarios a nivel gastrointestinal podrían ser mínimos. Su mecanismo de acción se muestra de manera esquemática en la Figura 73A.

Por otro lado, el complejo  $[\text{Au}(\text{L2c})\text{PTA}]$  (**4c**) inhibe tanto a las enzimas redox tiorredoxina reductasa como glutatión reductasa, así como a la isoforma 1 de la ciclooxigenasa. Respecto a esta última diana, el uso terapéutico de este derivado podría implicar ciertos efectos secundarios debido a la relevancia de COX-1 en el mantenimiento de la mucosa gastrointestinal; no obstante, esto también le hace capaz de hacer frente a tumores que no expresan COX-2 y que tienen una mayor dependencia de la isoforma 1. En cuanto a su efecto sobre la actividad de la glutatión reductasa, esta es una de las pocas evidencias acerca de que los derivados de oro(I) pueden ser inhibidores no selectivos de las proteínas, y además una doble inhibición TrxR-GR podría resultar más eficaz frente a tumores recurrentes. En la Figura 73B se muestra una representación esquemática de su mecanismo de acción.

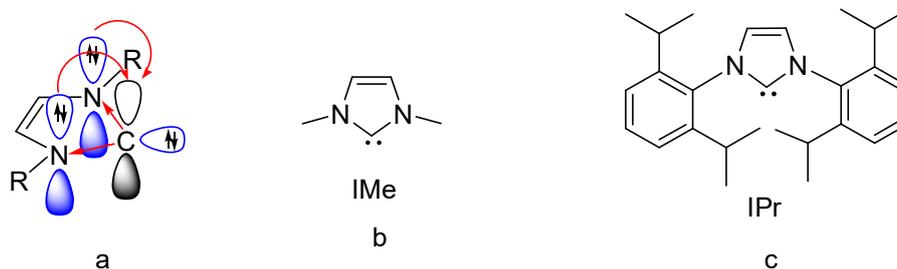


**Figura 73.** Mecanismo de acción de los complejos [Au(L2b)PPh<sub>3</sub>] (**3b**) (A) y [Au(L2c)PTA] (**4c**) (B) sobre células Caco-2.

### 3.2. CARBENO COMPLEJOS

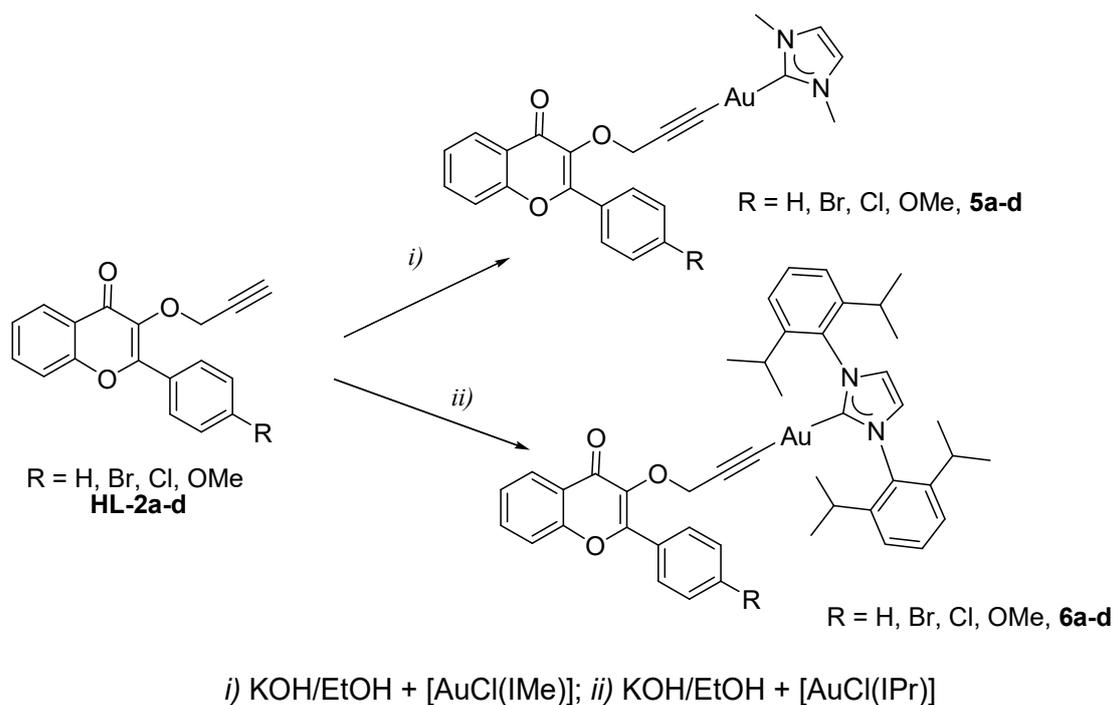
Los ligandos carbeno N-heterocíclicos son especies neutras con un carbono situado entre dos átomos de nitrógeno, con un par de electrones libres capaces de coordinarse a una gran diversidad de metales. En su estado fundamental, el carbeno N-heterocíclico tiene una hibridación  $sp^2$  y un orbital p-vacio. Esta estructura es estabilizada mediante la retirada de densidad electrónica por los átomos de nitrógeno y la retrodonación de estos mismos al orbital p-vacio del átomo de carbono adyacente (Figura 74a). De esta forma, se comportan como ligandos fuertemente dadores, por lo que a menudo se les ha comparado con las fosfinas<sup>93,94</sup>, aunque generalmente dan lugar a compuestos más estables en el medio fisiológico y resistentes frente al calor, estreses mecánicos y compuestos reductores y/o de carácter nucleofílico<sup>95,96</sup>. Las moléculas resultantes presentan por lo general carácter lipófilo, por lo que su acumulación en la mitocondria se postula como uno de sus principales mecanismos de acción<sup>97</sup>. No obstante, se han descrito además otras vías a través de las cuales los compuestos de oro(I) coordinados con carbenos inducen la muerte a las células tumorales, entre las que destaca la inhibición de la tiorredoxina reductasa<sup>98,99</sup>. Otra ventaja que poseen estos ligandos es que resulta relativamente sencillo funcionalizarlos a través de los átomos de nitrógeno, para incrementar su efecto biológico. Se ha documentado un amplio número de complejos metálicos con ligandos de este tipo cuyas propiedades biológicas son de gran interés, entre los que destacan los complejos de oro<sup>95,100-106</sup>.

En este apartado se ha incluido una familia de carbeno complejos derivados de la 3-hidroxi flavona, similares a los complejos descritos en el apartado 3.1. En lugar de las fosfinas  $PPh_3$  y PTA, se han utilizado dos ligandos carbeno N-heterocíclicos: 1,3-dimetilimidazol-2-ilideno (abreviado como IMe) (Figura 74b) y 1,3-bis(2,6-di-*i*-propilfenil)imidazol-2-ilideno (abreviado como IPr) (Figura 74c), cuya principal diferencia reside en el tamaño y requerimiento espacial del segundo.



**Figura 74.** Ligandos carbeno N-heterocíclicos empleados.

Los complejos de oro estudiados en este apartado se sintetizaron a partir de los mismos derivados alquino **HL2a-d**, (a: R = H, b: R = Br, c: R = Cl y d: R = OMe) mostrados en el apartado anterior. La desprotonación de los mismos y posterior reacción con  $[AuCl(IMe)]$  o  $[AuCl(IPr)]$  condujo a los nuevos alquinil carbeno complejos **5a-d** y **6a-d** (Esquema 2).

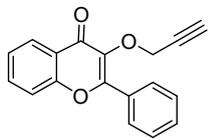
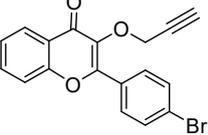
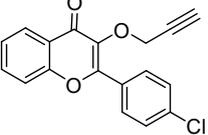
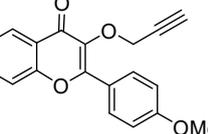


**Esquema 2.** Síntesis de los alquinil carbeno complejos de oro(I) derivados de las 3-hidroxi flavonas.

Se procedió, igual que en el apartado anterior, a determinar la citotoxicidad de los complejos sobre la línea Caco-2 tras 72h de exposición (Tabla 15). Sin embargo, los valores de  $IC_{50}$  obtenidos resultaron inesperadamente altos en comparación con sus homólogos coordinados con el ligando fosfina (Tabla 12).

Pasando a un análisis más pormenorizado de los resultados obtenidos, el efecto antiproliferativo de la serie **5a-d** con el ligando 1,3-dimetilimidazol-2-ilideno (IME) es aproximadamente el doble que el de sus homólogos de la serie **6a-d** con 1,3-bis(2,6-di-*i*-propilfenil)imidazol-2-ilideno (IPr), con la notable excepción de los complejos [Au(L2a)(IME)] (**5a**) y [Au(L2a)(IPr)] (**6a**); en este caso, se da una inversión en la tendencia observada hasta el momento y el complejo con el carbeno IPr (**6a**) resulta ser mucho más activo que el complejo con IME (**5a**). De igual manera, resulta llamativo que el complejo de partida [AuCl(IMe)] (**5**) carezca de efecto antiproliferativo. Este hecho podría explicarse por una posible menor estabilidad del mismo en el medio fisiológico, teniendo en cuenta que el ligando cloruro se puede desplazar fácilmente y el escaso tamaño de los sustituyentes del átomo de N en el carbeno IME facilitaría su descomposición en dicho medio, afectando negativamente a sus propiedades biológicas.

**Tabla 15.** Valores de IC<sub>50</sub> (μM) obtenidos para los carbeno complejos de oro(I) con ligandos flavona, así como de cisplatino y auranofin como controles positivos, obtenidos tras 72h de incubación en células Caco-2. Los resultados se expresan como media ± desviación estándar.

Complejo	IC <sub>50</sub> (μM)	
[AuCl(I $\text{Me}$ )] ( <b>5</b> )	>100	
[Au(L2a)(I $\text{Me}$ )] ( <b>5a</b> )	43,34 ± 5,06	
[Au(L2b) (I $\text{Me}$ )] ( <b>5b</b> )	23,01 ± 2,42	
[Au(L2c) (I $\text{Me}$ )] ( <b>5c</b> )	15,05 ± 3,04	
[Au(L2d) (I $\text{Me}$ )] ( <b>5d</b> )	16,33 ± 1,04	
[AuCl(I $\text{Pr}$ )] ( <b>6</b> )	9,09 ± 3,22	
[Au(L2a)(I $\text{Pr}$ )] ( <b>6a</b> )	16,34 ± 2,04	
[Au(L2b) (I $\text{Pr}$ )] ( <b>6b</b> )	53,85 ± 22,72	
[Au(L2c) (I $\text{Pr}$ )] ( <b>6c</b> )	46,15 ± 22,54	
[Au(L2d) (I $\text{Pr}$ )] ( <b>6d</b> )	48,22 ± 14,56	
Cisplatin	37,24 ± 5,15	
Auranofin	1,80 ± 0,10	

Con la serie **6a-d** con el ligando IPr, no obstante, se observa el efecto contrario. El complejo de partida [AuCl(I $\text{Pr}$ )] (**6**) sí muestra un cierto efecto antiproliferativo por sí solo, si bien posee un valor de IC<sub>50</sub> alto en comparación con los derivados anteriormente descritos en la presente tesis doctoral. Curiosamente, la coordinación del ligando alquino derivado de la 3-hidroxi flavona al centro metálico disminuye el efecto biológico entre 5 y 6 veces; la única excepción es el complejo [Au(L2a)(I $\text{Pr}$ )] (**6a**), cuyo IC<sub>50</sub> es aproximadamente la mitad que el del precursor **6**. En algunos casos, se ha observado que complejos de carácter lipófilo pueden tener problemas de biodisponibilidad debido a su baja solubilidad en el medio de cultivo y, por ende, en el medio fisiológico<sup>107,108</sup>. Por lo tanto, se evaluó el carácter lipofílico de los complejos mediante el estudio del coeficiente de reparto agua-octanol, en términos de LogP, para esta serie de derivados (Tabla 14).

**Tabla 16.** Valor del coeficiente de reparto (LogP) de los complejos de oro(I) derivados de 3-hidroxiflavonas coordinados con ligandos de tipo carbeno, así como de cisplatino y auranofin.

Complejo	LogP
[Au(L2a)(IMe)] ( <b>5a</b> )	0,34
[Au(L2b)(IMe)] ( <b>5b</b> )	1,32
[Au(L2c)(IMe)] ( <b>5c</b> )	1,96
[Au(L2d)(IMe)] ( <b>5d</b> )	0,22
[Au(L2a)(IPr)] ( <b>6a</b> )	0,42
[Au(L2b)(IPr)] ( <b>6b</b> )	1,47
[Au(L2c)(IPr)] ( <b>6c</b> )	1,11
[Au(L2d)(IPr)] ( <b>6d</b> )	3,40
[Au(L2a)(IMe)] ( <b>5a</b> )	2,90
[Au(L2b)(IMe)] ( <b>5b</b> )	1,13
<b>Cisplatin</b>	-0,53
<b>Auranofin</b>	-2,53

Mientras que los complejos **6b-d** tienen un carácter marcadamente lipófilo, [Au(L2a)(IPr)] (**6a**) destaca por presentar una naturaleza dual hidrófila-lipófila, siendo su valor del coeficiente de reparto comparable al de los derivados discutidos en el apartado anterior (Tabla 14). Esta discrepancia con el resto de compuestos de su serie podría explicar por qué su IC<sub>50</sub> es más bajo que el de los otros, ya que presumiblemente sería más soluble en el medio fisiológico y su efecto biológico se vería favorecido. Sin embargo, su efecto antiproliferativo sigue siendo reducido en comparación con el de otros derivados analizados en la presente Tesis Doctoral y que muestran valores de su coeficiente de reparto en el mismo rango. Esto podría indicar que, aunque **6a** vea favorecida su entrada en la célula podría tener problemas a la hora de interactuar con su diana terapéutica.

Por otra parte, el reducido efecto de los complejos [Au(L2b)(IMe)](**5b**) y [Au(L2c)(IMe)] (**5c**) no puede explicarse por completo con los datos mostrados en la Tabla 16, dado que, aunque poseen coeficientes de reparto con un valor superior a 1 y son considerados lipófilos, este valor no es tan diferente del obtenido para los complejos [Au(L2c)PPh<sub>3</sub>] (**3c**) y [Au(L2d)PPh<sub>3</sub>] (**3d**) en el apartado anterior (1,17 y 1,20 respectivamente; Tabla 14), los cuales poseen un IC<sub>50</sub> de en torno a 5 µM (Tabla 12). Es decir, en el caso de la serie **5a-d** no puede achacarse su escaso efecto antiproliferativo al carácter lipófilo. Schmidt *et al.* observaron que la biodisponibilidad de una serie de carbeno complejos de oro(I) se vio comprometida por la presencia de proteínas del suero en el medio de cultivo, que inducían cambios estructurales en los derivados que

afectaban negativamente a su efecto biológico<sup>109</sup>. Si bien la administración de nuestros complejos se realizó en medio libre de suero fetal bovino para evitar esta clase de alteraciones, no puede descartarse que los derivados reaccionen con alguno de los componentes restantes del medio de cultivo y se den modificaciones en su estructura.

Dados los atípicos resultados obtenidos hasta el momento, se optó por no continuar con el estudio de ambas series de complejos como potenciales agentes quimioterapéuticos, ya que un hipotético futuro uso en este campo parecía poco probable. No obstante, antes de descartar por completo su empleo en la práctica clínica, se planteó la posibilidad de que resultasen de utilidad frente a otras patologías. Esta decisión fue motivada por la filosofía del **drug repurposing**, de la que el auranofin ha sido uno de los mejores exponentes. Según se ha adelantado en apartados previos de la presente memoria, el *drug repurposing* o reutilización de fármacos consiste en dar un nuevo uso terapéutico a compuestos que, tradicionalmente, se habían utilizado para tratar una patología en concreto<sup>112</sup>. Si bien el ejemplo más ilustrativo de *drug repurposing* en el caso concreto del auranofin es su paso de fármaco para la artritis reumatoide a quimioterapéutico, no es el único. Se ha observado también que este fármaco podría ser de utilidad en el tratamiento de algunas enfermedades neurodegenerativas debido a su efecto antiinflamatorio, una similitud que comparte con su papel como fármaco para la artritis reumatoide<sup>113,114</sup>. Pero donde mayor interés ha despertado este complejo, al margen de en oncología, es en el campo de la microbiología.

El auranofin ha resultado ser un poderoso aliado en la lucha contra el SIDA, puesto que se ha observado que el tratamiento con este fármaco puede reducir los reservorios del VIH en el organismo. Esta acción está mediada por su efecto pro-oxidante. Las células T CD4<sup>+</sup>, que sirven de refugio al virus, se caracterizan por poseer un sistema de defensa antioxidante débil, lo que las hace especialmente vulnerables a la muerte inducida por el estrés oxidativo<sup>115,116</sup>. También es de gran relevancia su potencial frente a las infecciones parasitarias, entre las que destacan enfermedades como la giardiosis o la malaria. En ambos casos, se cree que la capacidad de este derivado de inhibir a la tiorredoxina reductasa podría estar detrás de su eficacia terapéutica. En lo que respecta la infección por *Giardia* y a otras enfermedades causadas por parásitos intestinales, se ha observado que el tratamiento con auranofin induce un bloqueo de la TrxR (o de la proteína tiorredoxina-glutación reductasa que poseen algunos parásitos) y que su uso clínico a tiempos cortos es seguro<sup>117-119</sup>. En cuanto a su potencial empleo como antimálarico, este efecto también parece estar mediado por su capacidad de alterar el equilibrio redox. En este caso, el auranofin inhibe a la tiorredoxina reductasa del plasmodio causante de la enfermedad, que es altamente sensible al estrés oxidativo<sup>114,120</sup>. Finalmente, es pertinente para el propósito del capítulo actual detallar el potencial uso como antibacteriano de este compuesto, ya que existen numerosas

evidencias acerca de su capacidad de inhibir el crecimiento bacteriano, así como de algunos de sus análogos<sup>121-123</sup>.

Ya en el apartado 1.5, se adelantaban las propiedades bacteriostáticas del complejo de oro(III)  $K[Au(CN)_2]$ <sup>48,124</sup>. Años más tarde, se haría extensible este efecto a otros complejos de oro, al descubrirse la capacidad del auranofin de inhibir a la tiorredoxina reductasa bacteriana, encontrándose diversos ejemplos de derivados de este metal con actividad bactericida<sup>125-130</sup>. De forma similar a lo que ocurre en células animales, el sistema tiorredoxina está implicado en el mantenimiento de la homeostasis redox, aunque la dependencia de la bacteria a este sistema es variable. Algunas bacterias Gram positivas, entre las que destacan patógenos humanos como *Helicobacter pylori* o *Mycobacter tuberculosis*, solamente cuentan con el sistema TrxR como mecanismo de defensa antioxidante, de modo que son altamente sensibles a su inhibición<sup>131</sup>. Se cree que esta es la principal razón por la cual el auranofin y otros complejos de oro han mostrado un interesante efecto antibacteriano *in vitro* frente a bacterias Gram positivas<sup>132-134</sup>. Por su parte, las bacterias Gram negativas cuentan con otros sistemas de defensa antioxidante, como el sistema glutatión o la enzima catalasa, lo que las hace, en general, menos sensibles a la acción de los inhibidores de la TrxR, y por extensión a los complejos de oro<sup>131</sup>. No obstante, se han descrito casos en los que un complejo de oro muestra efecto bactericida sobre bacterias Gram negativas. En estos casos, los compuestos no interaccionan preferentemente con la TrxR sino que poseen otras dianas, como el glutatión<sup>127</sup>. Por otra parte, los complejos de oro parecen tener más dificultades a la hora de entrar en las bacterias Gram negativas que en las Gram positivas debido a la presencia de la pared celular en las primeras. En este sentido, se ha observado que la administración conjunta de auranofin y un agente permeabilizador de la pared celular potencia el efecto antibacteriano del complejo de oro<sup>123</sup>. Por consiguiente, los complejos de oro son de gran interés en microbiología y la elección de los ligandos podría condicionar su efecto antibacteriano, permitiendo diseñar así nuevos antibióticos de amplio espectro.

En el marco de una estancia de investigación en el Instituto Politécnico de Viana do Castelo, Portugal, se midió la actividad antibacteriana de las series **5a-b** y **6a-b** sobre un panel de bacterias Gram positivas y Gram negativas que se recoge en la Tabla 17. Las bacterias fueron escogidas por tratarse de patógenos o comensales humanos.

**Tabla 17.** Selección de bacterias patógenas o comensales humanas para probar el efecto antibacteriano de las series **5a-b** y **6a-b**.

Clasificación Gram	Cepa	Serotipo	Referencia ATCC
Negativo	Escherichia coli	-	25922
			8739
			13216 (NCTC)
	Pseudomonas aeruginosa	-	27853
	Salmonella enterica	serovar Enteritidis	25928
Serovar Typhimurium		14028	
Positivo	Enterococcus faecalis	-	29212
	Listeria monocytogenes	serovar 4b	13932
	Staphylococcus epidermidis	-	14990
	Staphylococcus aureus	-	2593
			13565

Se optó por realizar un ensayo de difusión en disco, utilizando DMSO como control negativo y fenol como control positivo. Las bacterias fueron incubadas durante 24h con los discos impregnados en los compuestos y se midió el halo de inhibición resultante. Tres de los compuestos ensayados ([Au(L2a)(IMe)] (**5a**), [Au(L2c)(IMe)] (**5c**) y [Au(L2d)(IPr)] (**6d**) no fueron capaces de inhibir el crecimiento de ninguna de las cepas estudiadas. De igual manera, no se pudo ensayar el complejo [Au(L2a)(IPr)] (**6a**) por perderse la muestra durante el desplazamiento. Los resultados obtenidos para el resto de complejos se muestran en la Tabla 18.

Los complejos [Au(L2d)(IMe)] (**5d**) y [Au(L2c)(IPr)] (**6c**) siguen el comportamiento más típico de los complejos de oro con efecto antibacteriano, esto es, solamente son capaces de inhibir el crecimiento de las bacterias Gram positivas. Esto permite suponer que su diana molecular será la tiorredoxina reductasa. El complejo [Au(L2b)(IPr)] (**6b**) también es capaz de alterar el crecimiento de las Gram positivas, pero se diferencia de los dos anteriores en que es capaz, además, de impedir moderadamente el crecimiento de dos de las cepas de *E. coli* ensayadas, siendo este efecto 2,5 veces menor que el del control positivo. Estos datos sugieren que el complejo **6b** podría sentir una cierta afinidad por una diana molecular diferente a la TrxR.

**Tabla 18.** Evaluación preliminar de la actividad antibacteriana de los compuestos [Au(L2b)(IMe)] (**5b**), [Au(L2d)(IMe)] (**5d**), [Au(L2b)(IPr)] (**6b**) y [Au(L2c)(IPr)] (**6c**) (5 µg) tras 24h de incubación. Se usa fenol (5,35 mg) como control positivo. <sup>a</sup>Diámetro de la zona de inhibición, incluyendo el diámetro del disco (6 mm). -: ausencia de halo de inhibición.

Cepa	Zona de inhibición (mm) <sup>a</sup>				Fenol
	[Au(L2b)(IMe)] ( <b>5b</b> )	[Au(L2d)(IMe)] ( <b>5d</b> )	[Au(L2b)(IPr)] ( <b>6b</b> )	[Au(L2c)(IPr)] <b>6c</b>	
<i>E. coli</i> 25922	9,04 ± 2,17	-	-	-	23,39 ± 1,26
<i>E. coli</i> 8739	11,10 ± 0,08	-	8,97 ± 0,49	-	22,71 ± 1,37
<i>E. coli</i> 13216	10,95 ± 0,64	-	8,10 ± 0,60	-	20,70 ± 2,97
<i>P. aeruginosa</i>	-	-	-	-	30,48 ± 1,45
<i>S. enterica</i> 25928	8,90 ± 1,56	-	-	-	19,20 ± 0,42
<i>S. enterica</i> 14028	9,39 ± 1,26	-	-	-	27,79 ± 1,11
<i>E. faecalis</i>	12,50 ± 1,41	9,47 ± 1,67	12,1 ± 0,99	10,25 ± 1,41	13,5 ± 2,12
<i>L. monocytogenes</i>	18,50 ± 1,41	14,25 ± 1,06	17,17 ± 0,24	15,33 ± 0,47	16,58 ± 0,12
<i>S. epidermidis</i>	25,05 ± 1,48	17,23 ± 0,87	20,95 ± 0,91	18,06 ± 2,04	22,67 ± 4,49
<i>S. aureus</i> 2593	13,76 ± 0,54	9,70 ± 0,02	12,79 ± 1,11	10,49 ± 1,13	12,05 ± 0,73
<i>S. aureus</i> 13565	16,58 ± 1,63	11,86 ± 0,20	14,03 ± 0,17	12,19 ± 0,88	17,25 ± 3,38

Más interesante es el caso de su homólogo [Au(L2b)(IMe)] (**5b**), el único compuesto capaz de alterar de forma moderada el crecimiento de todas las bacterias ensayadas, con la notable excepción de la *Pseudomonas aeruginosa* que no responde al tratamiento. La ausencia de efecto sobre *P. aeruginosa* era, sin embargo, esperable. Al margen del hecho de que se trate de una bacteria Gram negativa, sobre las que los complejos de oro suelen tener una menor actividad por poseer otros sistemas de defensa antioxidante además del sistema tiorredoxina<sup>131</sup>, la *Pseudomonas aeruginosa* es una bacteria especialmente resistente a los antibióticos, destacando entre sus múltiples mecanismos de resistencia su capacidad de formar biofilms<sup>135</sup>. Si bien en nuestro caso concreto no se ha conseguido inhibir el crecimiento de esta bacteria, existen algunos estudios con mayor éxito que demuestran que sí es posible atacarla con complejos de oro. La elección de los ligandos podría ser clave en el diseño de derivados de oro(I) que afecten específicamente a la *P. aeruginosa*, ya que coordinar el centro metálico con ligandos de tipo sulfonamidas, agentes bacteriostáticos de amplio espectro<sup>136</sup>, dio lugar a complejos metálicos capaces incluso de inhibir el biofilm formado por dichas bacterias<sup>137</sup>. Volviendo a nuestros compuestos, las flavonas parecen tener una escasa capacidad de inhibir el crecimiento de la *Pseudomonas aeruginosa* y/o su capacidad de formar biofilms<sup>138</sup>. En consecuencia, el diseño de las series **5a-d** y **6a-d** no parece ser el más indicado para causar efecto antibacteriano sobre esta bacteria en concreto.

Dejando a un lado la ausencia de efecto de **5b** sobre la *P. aeruginosa*, el hecho de que sea capaz de inhibir el crecimiento de Gram positivas y negativas, y su acción biológica sea mayor que la de su análogo [Au(L2b)(IPr)] (**6b**), parece indicar que el ligando carbeno tiene un gran peso en su acción antimicrobiana. Un caso similar a este fue descrito por Roymahapatra *et al*<sup>139</sup>. Los autores sintetizaron una serie de complejos biscalcarbeno de oro(I) a partir de 2,6-bis-[1-metilimidazol-2il]pirazina, de entre los cuales destacaron dos por su potencial antibacteriano sobre Gram positivas y Gram negativas. En el caso de las Gram negativas se observó que los complejos causaban daños en la pared celular que aumentaban su permeabilidad, lo que consideraron la principal razón de su toxicidad. El efecto antibacteriano de estos complejos puede estar mediado en parte por la pirazina, puesto que su efecto antimicrobiano ha sido bien documentado<sup>140,141</sup>. En este sentido, podría establecerse un paralelismo entre las propiedades antibacterianas mostradas por los derivados de pirazina y los derivados de 3-hidroxi flavonas analizados en el presente estudio, dado que las flavonas también son capaces de inhibir el crecimiento bacteriano de cepas Gram positivas y Gram negativas<sup>142,143</sup>. El efecto antibacteriano de las flavonas parece estar mediado por su carácter lipófilo, que les permite alterar la permeabilidad de la membrana bacteriana y, por lo tanto, inhibir su crecimiento<sup>143</sup>. De acuerdo con estos datos, es razonable suponer que el ligando derivado de la 3-hidroxi flavona actúe, hasta cierto punto, como un agente permeabilizador de la membrana<sup>123</sup>. Dado que el uso de auranofin y otros derivados de oro(I) junto con esta clase de compuestos contribuye a aumentar el efecto antimicrobiano de los complejos de oro, puede suponerse que el efecto del complejo **5b** en las bacterias Gram negativas está mediado, al menos en parte, por su ligando derivado de la 3-hidroxi flavona. La presencia del grupo hidroxilo en posición C3 contribuye, además, a aumentar el efecto sobre las bacterias Gram negativas<sup>142-144</sup>. De acuerdo con estos datos, es posible que la presencia del ligando 3-hidroxi flavona sea clave para la acción antibacteriana de **5b**, ya que podría contribuir a alterar la permeabilidad de la pared celular y aumentar así el efecto del centro metálico sobre la enzima redox tiorredoxina reductasa.

Por otra parte, no puede descartarse que el complejo **5b**, y en menor medida el **6b**, sea capaz de interactuar con otra diana molecular al margen de la tiorredoxina reductasa. Esta hipotética diana molecular alternativa sería clave para el funcionamiento de las Gram negativas, de modo que su bloqueo conllevaría la inhibición de su crecimiento. Los datos previos obtenidos acerca de la acción *multitarget* de complejos de oro(I) derivados de 3-hidroxi flavonas nos animaron a plantearnos la posibilidad de que esta serie de complejos pudiesen mostrar un comportamiento similar. Por ello, se realizó una búsqueda de esta potencial diana alternativa y se escogió a la enzima dihidrofolato reductasa (DHFR) como candidata.

La DHFR está implicada en la síntesis *de novo* de nucleótidos de purina y timidina, lo que la sitúa en un puesto privilegiado para el desarrollo de nuevos antibióticos dada su relevancia para el desarrollo bacteriano<sup>145</sup>. De entre las distintas moléculas capaces de

inhibir la acción de esta enzima, destacan los estudios realizados por Galassi *et al.*<sup>146</sup> relativos a la capacidad de una serie de complejos de oro(I) de inhibir a la DHFR de *E. coli in vitro*. En un trabajo posterior, los investigadores concluyeron que los complejos de oro(I) podrían ser capaces de inhibir a aquellas enzimas no selenoproteínas estableciendo interacciones no covalentes con su centro activo<sup>147</sup>. Tomando en consideración esta hipótesis y nuestros datos acerca del comportamiento *multitarget* de la serie de alquinil complejos de oro(I) derivados de 3-hidroxi flavonas, podemos asumir que la elección del ligando tiene un papel clave a la hora de dirigir a los compuestos de oro hacia las proteínas por las que en condiciones normales no siente atracción, favoreciendo así la formación de interacciones no covalentes con su centro activo. No obstante, son necesarios estudios posteriores para confirmar o desmentir esta hipótesis.

En definitiva, los datos obtenidos hasta el momento son una evidencia más acerca del potencial de los complejos de oro(I) como potenciales antibacterianos. Una vez más, se demuestra que la elección de los ligandos de coordinación es clave para el efecto biológico de los derivados, siendo el ejemplo más destacado el diferente efecto de los complejos [Au(L2b)(IMe)] (**5b**) y [Au(L2b)(IPr)] (**6b**) frente a bacterias Gram negativas. Por otra parte, ha quedado patente la importancia de la reutilización de fármacos para dar una segunda oportunidad a aquellos compuestos que inicialmente se consideran inútiles o poco eficaces frente a un trastorno concreto, pero que pueden ser de gran ayuda para frenar el avance de otra.

## Referencias

---

1. Quero, J., Mármol, I., Cerrada, E. & Rodríguez-Yoldi, M. J. Insight into the potential application of polyphenol-rich dietary intervention in degenerative disease management. *Food Funct.* **11**, 2805–2825 (2020).
2. Saito, K.; Yonekura-Sakakibara, K.; Nakabayashi, R.; Higashi, Y.; Yamazaki, M.; Tohge, T.; Fernie, A. R. The Flavonoid Biosynthetic Pathway in Arabidopsis: Structural and Genetic Diversity. *Plant Physiol. Biochem.* **2013**, *72*, 21–34. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2013.02.001>.
3. Jaganath, I. B. & Crozier, A. Flavonoid Biosynthesis. in *Plant Metabolism and Biotechnology* (eds. Ashihara, H., Crozier, A. & Komamine, A.) 293–320 (John Wiley & Sons, 2011).
4. Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C. & Jiménez, L. Polyphenols: food sources and bioavailability 1,2. *Am J Clin Nutr* **79**, 727–774 (2004).
5. Almeida, A. F.; Borge, G. I. A.; Piskula, M.; Tudose, A.; Tudoreanu, L.; Valentová, K.; Williamson, G.; Santos, C. N. Bioavailability of Quercetin in Humans with a Focus on Interindividual Variation. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2018**, *17* (3), 714–731. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12342>.
6. Nijveldt, R. J.; van Nood, E.; van Hoorn, D. E.; Boelens, P. G.; van Norren, K.; van Leeuwen, P. A. Flavonoids: A Review of Probable Mechanisms of Action and Potential Applications. *Am J Clin Nutr* **2001**, *74* (4), 418–425. <https://doi.org/10.1093/ajcn/74.4.418>.
7. Patel, R. V.; Mistry, B. M.; Shinde, S. K.; Syed, R.; Singh, V.; Shin, H.-S. Therapeutic Potential of Quercetin as a Cardiovascular Agent. *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, *155*, 889–904. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.06.053>.
8. Chirumbolo, S. Quercetin in cancer prevention and therapy. *Integr. Cancer Ther.* **12**, 97–102 (2013).
9. Reyes-Farias, M. & Carrasco-Pozo, C. The anti-cancer effect of quercetin: Molecular implications in cancer metabolism. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, 3177 (2019).
10. Ashrafizadeh, M., Ahmadi, Z., Farkhondeh, T. & Samarghandian, S. Autophagy as a molecular target of quercetin underlying its protective effects in human diseases. *Arch. Physiol. Biochem.* 1–9 (2019) doi:10.1080/13813455.2019.1671458.
11. Dahiya, R.; Mohammad, T.; Roy, S.; Anwar, S.; Gupta, P.; Haque, A.; Khan, P.; Kazim, S. N.; Islam, A.; Ahmad, F.; Hassan, M. I. Investigation of Inhibitory Potential of Quercetin to the Pyruvate Dehydrogenase Kinase 3: Towards Implications in Anticancer Therapy. *Int. J. Biol. Macromol.* **2019**, *136*, 1076–1085. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2019.06.158>.
12. Primikyri, A.; Chatziathanasiadou, M. V.; Karali, E.; Kostaras, E.; Mantzaris, M. D.; Hatzimichael, E.; Shin, J. S.; Chi, S. W.; Briasoulis, E.; Kolettas, E.; Gerothanassis, I. P.; Tzakos, A. G. Direct Binding of Bcl-2 Family Proteins by Quercetin Triggers Its pro-Apoptotic Activity. *ACS Chem. Biol.* **2014**, *9* (12), 2737–2741. <https://doi.org/10.1021/cb500259e>.

13. Wu, H.; Pan, L.; Gao, C.; Xu, H.; Li, Y.; Zhang, L.; Ma, L.; Meng, L.; Sun, X.; Qin, H. Quercetin Inhibits the Proliferation of Glycolysis-Addicted HCC Cells by Reducing Hexokinase 2 and Akt-MTOR Pathway. *Molecules* **2019**, *24* (10). <https://doi.org/10.3390/molecules24101993>.
14. Ding, Y.; Chen, X.; Wang, B.; Yu, B.; Ge, J.; Shi, X. Quercetin Suppresses the Chymotrypsin-like Activity of Proteasome via Inhibition of MEK1/ERK1/2 Signaling Pathway in Hepatocellular Carcinoma HepG2 Cells. *Can. J. Physiol. Pharmacol* **2018**, *96* (5), 521–526. <https://doi.org/doi: 10.1139/cjpp-2017-0655>.
15. Yang, Y.; Wang, T.; Chen, D.; Ma, Q.; Zheng, Y.; Liao, S.; Wang, Y.; Zhang, J. Quercetin Preferentially Induces Apoptosis in KRAS-Mutant Colorectal Cancer Cells via JNK Signaling Pathways. *Cell Biol. Int.* **2019**, *43* (2), 117–124. <https://doi.org/10.1002/cbin.11055>.
16. Zhang, Y.; Guo, Y.; Wang, M.; Dong, H.; Zhang, J.; Zhang, L. Quercetin from *Toona sinensis* Leaves Induces Cell Cycle Arrest and Apoptosis via Enhancement of Oxidative Stress in Human Colorectal Cancer SW620 Cells. *Oncol. Rep.* **2017**, *38* (6), 3319–3326. <https://doi.org/10.3892/or.2017.6042>.
17. Raja, S. B.; Rajendiran, V.; Kasinathan, N. K.; P, A.; Venkatabalasubramanian, S.; Murali, M. R.; Devaraj, H.; Devaraj, S. N. Differential Cytotoxic Activity of Quercetin on Colonic Cancer Cells Depends on ROS Generation through COX-2 Expression. *Food Chem. Toxicol.* **2017**, *106*, 92–106. <https://doi.org/10.1016/J.FCT.2017.05.006>.
18. Kee, J.-Y.; Han, Y.-H.; Kim, D.-S.; Mun, J.-G.; Park, J.; Jeong, M.-Y.; Um, J.-Y.; Hong, S.-H. Inhibitory Effect of Quercetin on Colorectal Lung Metastasis through Inducing Apoptosis, and Suppression of Metastatic Ability. *Phytomedicine* **2016**, *23* (13), 1680–1690. <https://doi.org/10.1016/J.PHYMED.2016.09.011>.
19. Qi, J.; Yu, J.; Li, Y.; Luo, J.; Zhang, C.; Ou, S.; Zhang, G.; Yang, X.; Peng, X. Alternating Consumption of  $\beta$ -Glucan and Quercetin Reduces Mortality in Mice with Colorectal Cancer. *Food Sci. Nutr.* **2019**, *7* (10), 3273–3285. <https://doi.org/10.1002/fsn3.1187>.
20. Owczarek, K.; Hrabec, E.; Fichna, J.; Sosnowska, D.; Koziółkiewicz, M.; Szymański, J.; Lewandowska, U. Inhibition of Nuclear Factor-KappaB, Cyclooxygenase-2, and Metalloproteinase-9 Expression by Flavanols from Evening Primrose (*Oenothera paradoxa*) in Human Colon Cancer SW-480 Cells. *J. Funct. Foods* **2017**, *37*, 553–563. <https://doi.org/10.1016/J.JFF.2017.08.029>.
21. Vidyalakshmi K, Kamalakannan P, Viswanathan S & Ramaswamy S. Anti-inflammatory effect of certain dihydroxy flavones and the mechanisms involved. *Antiinflamm Antiallergy Agents Med Chem* **11**, 253–61 (2012).
22. Meshram, R. J.; Bagul, K. T.; Pawnikar, S. P.; Barage, S. H.; Kolte, B. S.; Gacche, R. N. Known Compounds and New Lessons: Structural and Electronic Basis of Flavonoid-Based Bioactivities. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **2019**, *38* (4), 1168–1184. <https://doi.org/10.1080/07391102.2019.1597770>.
23. Iezzi, A., Ferri, C., Mezzetti, A. & Cipollone, F. COX-2: Friend or Foe? *Curr. Pharm. Des.* **13**, 1715–1721 (2007).
24. Rao, P. & Knaus, E. Evolution of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs (NSAIDs): Cyclooxygenase (COX) Inhibition and Beyond. *J Pharm Pharm. Sci* **11**, 81–110 (2008).

25. Crofford LJ. COX-1 and COX-2 tissue expression: implications and predictions. *J Rheumatol Suppl.* **49**, 15–9 (1997).
26. Liu, B., Qu, L. & Yan, S. Cyclooxygenase-2 promotes tumor growth and suppresses tumor immunity. *Cancer Cell Int.* **15**, 106 (2015).
27. Xiao, X.; Shi, D.; Liu, L.; Wang, J.; Xie, X.; Kang, T.; Deng, W. Quercetin Suppresses Cyclooxygenase-2 Expression and Angiogenesis through Inactivation of P300 Signaling. *PLoS One* **2011**, *6* (8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022934>.
28. Kilic, U.; Sahin, K.; Tuzcu, M.; Basak, N.; Orhan, C.; Elibol-Can, B.; Kilic, E.; Sahin, F.; Kucuk, O. Enhancement of Cisplatin Sensitivity in Human Cervical Cancer: Epigallocatechin-3-Gallate. *Front. Nutr.* **2015**, *1*. <https://doi.org/10.3389/fnut.2014.00028>.
29. Zhao, M., Tang, S.-N., Marsh, J. L., Shankar, S. & Srivastava, R. K. Ellagic acid inhibits human pancreatic cancer growth in Balb c nude mice. *Cancer Lett.* **337**, 210–217 (2013).
30. Negi, R. R.; Rana, S. V.; Gupta, V.; Gupta, R.; Chadha, V. D.; Prasad, K. K.; Dhawan, D. K. Over-Expression of Cyclooxygenase-2 in Colorectal Cancer Patients. *Asian Pacific J. Cancer Prev.* **2019**, *20* (6), 1675–1681. <https://doi.org/10.31557/APJCP.2019.20.6.1675>.
31. Albasri, A. M., Elkablawy, M. A., Hussainy, A. S., Yousif, H. M. & Alhujaily, A. S. Impact of cyclooxygenase-2 over-expression on the prognosis of colorectal cancer patients an experience from western Saudi Arabia. *Saudi Med. J.* **39**, 773–780 (2018).
32. Roelofs, H. M., te Morsche, R. H., van Heumen, B. W., Nagengast, F. M. & Peters, W. H. Over-expression of COX-2 mRNA in colorectal cancer. *BMC Gastroenterol.* **14**, 1 (2014).
33. Perrone, M. G., Scilimati, A., Simone, L. & Vitale, P. Selective COX-1 Inhibition: A Therapeutic Target to be Reconsidered. *Curr. Med. Chem.* **17**, 3769–3805 (2010).
34. Cai, F.; Li, J.; Liu, Y.; Zhang, Z.; Hettiarachchi, D. S.; Li, D. Effect of Ximenynic Acid on Cell Cycle Arrest and Apoptosis and COX-1 in HepG2 Cells. *Mol. Med. Rep.* **2016**, *14* (6), 5667–5676. <https://doi.org/10.3892/mmr.2016.5920>.
35. Guillem-Llobat, P.; Dovizio, M.; Bruno, A.; Ricciotti, E.; Cufino, V.; Sacco, A.; Grande, R.; Alberti, S.; Arena, V.; Cirillo, M.; Patrono, C.; Fitzgerald, G. A.; Steinhilber, D.; Sgambato, A.; Patrignani, P. Aspirin Prevents Colorectal Cancer Metastasis in Mice by Splitting the Crosstalk between Platelets and Tumor Cells. *Oncotarget* **2016**, *7* (22), 32462–32477.
36. Sankhasard, S., Lertprasertsuk, N., Vinitketkumnuen, U. & Cressey, R. Expression of Cyclooxygenase-1 and-2 and Clinicopathologic Features of Colorectal Cancer in Northern Thailand. *Asian Pacific J. Cancer Prev.* **5**, 44–49 (2004).
37. Sano, H.; Kawahito, Y.; Wilder, R. L.; Hashiramoto, A.; Mukai, S.; Asai, K.; Kimura, S.; Kato, H.; Kondo, M.; Hla, T. Expression of Cyclooxygenase - 1 and 2 - in Human Colorectal Cancer. *Cancer Res* **1995**, *55*, 3785–3789.
38. Li, H.; Zhu, F.; Chen, H.; Cheng, K. W.; Zykova, T.; Oi, N.; Lubet, R. A.; Bode, A. M.; Wang, M.; Dong, Z. 6-C-(E-Phenylethenyl)-Naringenin Suppresses Colorectal Cancer Growth by Inhibiting Cyclooxygenase-1. *Cancer Res.* **2014**, *74* (1), 243–252. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-2245>.
39. Bottone, F. G., Martinez, J. M., Alston-Mills, B. & Eling, T. E. Gene modulation by Cox-1 and Cox-2 specific inhibitors in human colorectal carcinoma cancer cells. *Carcinogenesis*

- 25, 349–357 (2004).
40. Wu, W. K. K.; Sung, J. J. Y.; Wu, Y. C.; Li, H. T.; Yu, L.; Li, Z. J.; Cho, C. H. Inhibition of Cyclooxygenase-1 Lowers Proliferation and Induces Macroautophagy in Colon Cancer Cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2009**, *382* (1), 79–84. <https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2009.02.140>.
  41. Golub, A. G.; Bdzholá, V. G.; Ostrynska, O. V.; Kyszenia, I. V.; Sapelkin, V. M.; Prykhod'ko, A. O.; Kukharenko, O. P.; Yarmoluk, S. M. Discovery and Characterization of Synthetic 4'-Hydroxyflavones—New CK2 Inhibitors from Flavone Family. *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21* (21), 6681–6689. <https://doi.org/10.1016/J.BMC.2013.08.013>.
  42. Stompor, M., Świtalska, M. & Wietrzyk, J. Synthesis and biological evaluation of acyl derivatives of hydroxyflavones as potent antiproliferative agents against drug resistance cell lines. *Zeitschrift fur Naturforsch. - Sect. C J. Biosci.* **73**, 87–93 (2018).
  43. Kurzwernhart, A.; Kandioller, W.; Bächler, S.; Bartel, C.; Martic, S.; Buczkowska, M.; Mühlgassner, G.; Jakupec, M. A.; Kraatz, H. B.; Bednarski, P. J.; Arion, V. B.; Marko, D.; Keppler, B. K.; Hartinger, C. G. Structure-Activity Relationships of Targeted Ru(II) (6- P - Cymene) Anticancer Complexes with Flavonol-Derived Ligands. *J. Med. Chem.* **2012**, *55* (23), 10512–10522. <https://doi.org/10.1021/jm301376a>.
  44. Kurzwernhart, A.; Mokesch, S.; Klapproth, E.; Adib-Ravazi, M. S.; Jakupec, M. A.; Hartinger, C. G.; Kandioller, W.; Keppler, B. K. Flavonoid-Based Organometallics with Different Metal Centers - Investigations of the Effects on Reactivity and Cytotoxicity. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2016**, *2016* (2), 240–246. <https://doi.org/10.1002/ejic.201501020>.
  45. Gaur, R. & Mishra, L. Bi-nuclear Ru(II) complexes of bis-chalcone and bis-flavonol: Synthesis, characterization, photo cleavage of DNA and Topoisomerase I inhibition. *RSC Adv.* **3**, 12210–12219 (2013).
  46. Mirzadeh, N.; Privér, S. H.; Abraham, A.; Shukla, R.; Bansal, V.; Bhargava, S. K. Linking Flavonoids to Gold - A New Family of Gold Compounds for Potential Therapeutic Applications. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2015**, *2015* (25), 4275–4279. <https://doi.org/10.1002/ejic.201500514>. Gunduz, S., Goren, A. C. & Ozturk, T. Facile Syntheses of 3-Hydroxyflavones. *Org. Lett.* **14**, 1576–1579 (2012).
  48. Fricker, S. P. Medical Uses of Gold Compounds: Past, Present and Future. *Gold Bull.* **29**, 53–60 (1996).
  49. Alessio, E. Gold-Based Therapeutic Agents A New Perspective. in *Bioinorganic Medicinal Chemistry* (ed. John Wiley & Sons) 118–136 (2011).
  50. Wang, P., Henning, S. M. & Heber, D. Limitations of MTT and MTS-based assays for measurement of antiproliferative activity of green tea polyphenols. *PLoS One* **5**, (2010).
  51. Bruggisser, R., von Daeniken, K., Jundt, G., Schaffner, W. & Tullberg-Reinert, H. Interference of Plant Extracts, Phytoestrogens and Antioxidants with the MTT Tetrazolium Assay. *Planta Med.* **68**, 445–448 (2002).
  52. Mena, F., Mena, A. & Mena, B. Polyphenols Nano-Formulations for Topical Delivery and Skin Tissue Engineering. in *Polyphenols in Human Health and Disease* (eds. Watson, R. R., Preedy, V. R. & Zibadi, S.) 839–848 (Academic Press, 2014).
  53. Andres, S.; Pevny, S.; Ziegenhagen, R.; Bakhiya, N.; Schäfer, B.; Hirsch-Ernst, K. I.; Lampen,

- A. Safety Aspects of the Use of Quercetin as a Dietary Supplement. *Mol. Nutr. Food Res.* **2018**, 62 (1). <https://doi.org/10.1002/mnfr.201700447>.
54. Forester, S. C. & Lambert, J. D. The role of antioxidant versus pro-oxidant effects of green tea polyphenols in cancer prevention. *Mol. Nutr. Food Res.* **55**, 844–854 (2011).
55. Symonowicz, M. & Kolanek, M. Biotechnology and Food Sciences Flavonoids and their properties to form chelate complexes. *Biotechnol Food Sci* **2012**, 35–41 (2012).
56. Mira L; Fernandez MT; Santos M; Rocha R; Florêncio MH; Jennings KR. Interactions of Flavonoids with Iron and Copper Ions: A Mechanism for Their Antioxidant Activity. *Free Radic Res.* **2002**, 36 (11), 1199-208.
57. Liu XH & Rose DP. Differential expression and regulation of cyclooxygenase-1 and -2 in two human breast cancer cell lines. *Cancer Res.* **56**, 5125–7. (1996).
58. Bae, S. H.; Jung, E. S.; Park, Y. M.; Kim, B. S.; Kim, K.; Kim, D. G.; Ryu, W. S.; Surgery, G. Expression of Cyclooxygenase-2 (COX-2) in Hepatocellular Carcinoma and Growth Inhibition of Hepatoma Cell Lines by a COX-2 Inhibitor, NS-398 1. *Clin Cancer Res.* **2001**, 7 (5), 1410–1418.
59. Kamitani, H., Geller, M. & Eling, T. Expression of 15-Lipoxygenase by Human Colorectal Carcinoma Caco-2 Cells during Apoptosis and Cell Differentiation. *J Biol Chem* **273**, 21569–77 (1998).
60. Vitale, P., Perrone, M. G., Malerba, P., Lavecchia, A. & Scilimati, A. Selective COX-1 inhibition as a target of theranostic novel diarylisoxazoles. *Eur. J. Med. Chem.* **74**, 606–618 (2014).
61. Scilimati, A.; Ferorelli, S.; Iaselli, M. C.; Miciaccia, M.; Pati, M. L.; Fortuna, C. G.; Aleem, A. M.; Marnett, L. J.; Perrone, M. G. Targeting COX-1 by Mofezolac-Based Fluorescent Probes for Ovarian Cancer Detection. *Eur. J. Med. Chem.* **2019**, 179, 16–25. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.06.039>.
62. Davies, N. M., Sharkey, K. A., Asfaha, S., Macnaughton, W. K. & Wallace, J. L. Aspirin causes rapid up-regulation of cyclo-oxygenase-2 expression in the stomach of rats. *Aliment Pharmacol Ther.* **11**, 1101–8 (1997).
63. Ott, I.; Koch, T.; Shorafa, H.; Bai, Z.; Poeckel, D.; Steinhilber, D.; Gust, R. Synthesis, Cytotoxicity, Cellular Uptake and Influence on Eicosanoid Metabolism of Cobalt-Alkyne Modified Fructoses in Comparison to Auranofin and the Cytotoxic COX Inhibitor Co-ASS. *Org. Biomol. Chem.* **2005**, 3 (12), 2282–2286. <https://doi.org/10.1039/b504294c>.
64. Youn, H. S., Lee, J. Y., Saitoh, S. I., Miyake, K. & Hwang, D. H. Auranofin, as an anti-rheumatic gold compound, suppresses LPS-induced homodimerization of TLR4. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **350**, 866–71 (2006).
65. Roscales, S.; Bechmann, N.; Holger Weiss, D.; Köckerling, M.; Pietzsch, J.; Kniess, T. Novel Valdecoxib Derivatives by Ruthenium(II)-Promoted 1, 3-Dipolar Cycloaddition of Nitrile Oxides with Alkynes - Synthesis and COX-2 Inhibition Activity. *Medchemcomm* **2018**, 9 (3), 534–544. <https://doi.org/10.1039/c7md00575j>.
66. Rubner, G.; Bendsdorf, K.; Wellner, A.; Kircher, B.; Bergemann, S.; Ott, I.; Gust, R. Synthesis and Biological Activities of Transition Metal Complexes Based on Acetylsalicylic Acid as Neo-Anticancer Agents. *J. Med. Chem.* **2010**, 53 (19), 6889–6898.

<https://doi.org/10.1021/jm101019j>.

67. Lu, J.; Papp, L. V.; Fang, J.; Rodriguez-Nieto, S.; Zhivotovsky, B.; Holmgren, A. Inhibition of Mammalian Thioredoxin Reductase by Some Flavonoids: Implications for Myricetin and Quercetin Anticancer Activity. *Cancer Res.* **2006**, *66* (8), 4410–4418. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-3310>.
68. Du, Y., Zhang, H., Lu, J. & Holmgren, A. Glutathione and glutaredoxin act as a backup of human thioredoxin reductase 1 to reduce thioredoxin 1 preventing cell death by aurothioglucose. *J. Biol. Chem.* **287**, 38210–38219 (2012).
69. Branco, V. & Carvalho, C. The thioredoxin system as a target for mercury compounds. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **1863**, 129255 (2019).
70. Parrilha, G. L.; Ferraz, K. S. O.; Lessa, J. A.; De Oliveira, K. N.; Rodrigues, B. L.; Ramos, J. P.; Souza-Fagundes, E. M.; Ott, I.; Beraldo, H. Metal Complexes with 2-Acetylpyridine-N(4)-Orthochlorophenylthiosemicarbazone: Cytotoxicity and Effect on the Enzymatic Activity of Thioredoxin Reductase and Glutathione Reductase. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, *84*, 537–544. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.07.055>.
71. Tabrizi, L. & Chiniforoshan, H. The cytotoxicity and mechanism of action of new multinuclear Scaffold AuIII, PdII pincer complexes containing a bis(diphenylphosphino) ferrocene/non-ferrocene ligand. *Dalt. Trans.* **46**, 14164–14173 (2017).
72. Deponte, M.; Urig, S.; Arscott, L. D.; Fritz-Wolf, K.; Réau, R.; Herold-Mende, C.; Koncarevic, S.; Meyer, M.; Davioud-Charvet, E.; Ballou, D. P.; Williams, C. H.; Becker, K. Mechanistic Studies on a Novel, Highly Potent Gold-Phosphole Inhibitor of Human Glutathione Reductase. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280* (21), 20628–20637. <https://doi.org/10.1074/jbc.M412519200>.
73. Zhang, K., Yang, E. Bin, Tang, W. Y., Wong, K. P. & Mack, P. Inhibition of glutathione reductase by plant polyphenols. *Biochem. Pharmacol.* **54**, 1047–53 (1997).
74. Elliott, A. J., Scheiber, S. A., Thomas, C. & Pardini, R. S. Inhibition of glutathione reductase by flavonoids: A structure-activity study. *Biochem. Pharmacol.* **44**, 1603–1608 (1992).
75. Rodgers, E. H. & Grant, M. H. The effect of the flavonoids, quercetin, myricetin and epicatechin on the growth and enzyme activities of MCF7 human breast cancer cells. *Chem. Biol. Interact.* **116**, 213–228 (1998).
76. Li, S.; Zhang, J.; Li, J.; Chen, D.; Matteucci, M.; Curd, J.; Duan, J. X. Inhibition of Both Thioredoxin Reductase and Glutathione Reductase May Contribute to the Anticancer Mechanism of TH-302. *Biol. Trace Elem. Res.* **2010**, *136* (3), 294–301. <https://doi.org/10.1007/s12011-009-8544-1>.
77. Zhu, Z.; Du, S.; Du, Y.; Ren, J.; Ying, G.; Yan, Z. Glutathione Reductase Mediates Drug Resistance in Glioblastoma Cells by Regulating Redox Homeostasis. *J. Neurochem.* **2018**, *144* (1), 93–104. <https://doi.org/10.1111/jnc.14250>.
78. Villegas, I., Martín, M. J., La Casa, C., Motilva, V. & Alarcón De La Lastra, C. Effects of oxican inhibitors of cyclooxygenase on oxidative stress generation in rat gastric mucosa. A comparative study. *Free Radic. Res.* **36**, 769–777 (2002).
79. Shoji, K. F. & Debure, L. Fluorometric methods for detection of mitochondrial membrane depolarization induced by CD95 activation. in *Methods in Molecular Biology* vol. 1557

- 49–62 (Humana Press Inc., 2017).
80. Gottlieb, E., Armour, S. M., Harris, M. H. & Thompson, C. B. Mitochondrial membrane potential regulates matrix configuration and cytochrome c release during apoptosis. *Cell Death Differ.* **10**, 709–717 (2003).
  81. Tummers, B. & Green, D. R. Caspase-8: regulating life and death. *Immunol. Rev.* **277**, 76–89 (2017).
  82. Chen, J. The cell-cycle arrest and apoptotic functions of p53 in tumor initiation and progression. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **6**, a026104 (2016).
  83. Aubrey, B. J., Kelly, G. L., Janic, A., Herold, M. J. & Strasser, A. How does p53 induce apoptosis and how does this relate to p53-mediated tumour suppression? *Cell Death Differ.* **25**, 104–113 (2018).
  84. Dipaola, R. S. To Arrest or Not To G 2-M Cell-Cycle Arrest Commentary re: A. K. Tyagi et al., Silibinin Strongly Synergizes Human Prostate Carcinoma DU145 Cells to Doxorubicin-induced Growth Inhibition, G 2-M Arrest. *Clin. Cancer Res* **8**, 3512–3519 (2002).
  85. Moloney, J. N. & Cotter, T. G. ROS signalling in the biology of cancer. *Semin. Cell Dev. Biol.* **80**, 50–64 (2018).
  86. Lin, J. F.; Lin, Y. C.; Tsai, T. F.; Chen, H. E.; Chou, K. Y.; Hwang, T. I. S. Cisplatin Induces Protective Autophagy through Activation of BECN1 in Human Bladder Cancer Cells. *Drug Des. Devel. Ther.* **2017**, *11*, 1517–1533. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S126464>.
  87. Zhang, X.-Y.; Zhang, M.; Cong, Q.; Zhang, M.-X.; Zhang, M.-Y.; Lu, Y.-Y.; Xu, C.-J. Hexokinase 2 Confers Resistance to Cisplatin in Ovarian Cancer Cells by Enhancing Cisplatin-Induced Autophagy. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2018**, *95*, 9–16. <https://doi.org/10.1016/J.BIOCEL.2017.12.010>.
  88. Hall, T. M., Tétreault, M. P., Hamilton, K. E. & Whelan, K. A. Autophagy as a cytoprotective mechanism in esophageal squamous cell carcinoma. *Curr. Opin. Pharmacol.* **41**, 12–19 (2018).
  89. Das, C. K.; Linder, B.; Bonn, F.; Rothweiler, F.; Dikic, I.; Michaelis, M.; Cinatl, J.; Mandal, M.; Kögel, D. BAG3 Overexpression and Cytoprotective Autophagy Mediate Apoptosis Resistance in Chemoresistant Breast Cancer Cells. *Neoplasia* **2018**, *20* (3), 263–279.
  90. Liu, L. *et al.* Hydroxychloroquine potentiates the anti-cancer effect of bevacizumab on glioblastoma via the inhibition of autophagy. *Biomed. Pharmacother.* **118**, 109339 (2019).
  91. Nadanaciva, S.; Lu, S.; Gebhard, D. F.; Jessen, B. A.; Pennie, W. D.; Will, Y. A High Content Screening Assay for Identifying Lysosomotropic Compounds. *Toxicol. Vitr.* **2011**, *25* (3), 715–723. <https://doi.org/10.1016/J.TIV.2010.12.010>.
  92. Ashoor, R., Yafawi, R., Jessen, B. & Lu, S. The contribution of lysosomotropism to autophagy perturbation. *PLoS One* **8**, (2013).
  93. Crabtree, R. H. NHC ligands versus cyclopentadienyls and phosphines as spectator ligands in organometallic catalysis. *J. Organomet. Chem.* **690**, 5451–5457 (2005).
  94. Hopkinson, M. N., Richter, C., Schedler, M. & Glorius, F. An overview of N-heterocyclic

- carbenes. *Nature* **510**, 485–496 (2014).
95. Zou, T.; Lok, C. N.; Wan, P. K.; Zhang, Z. F.; Fung, S. K.; Che, C. M. Anticancer Metal-N-Heterocyclic Carbene Complexes of Gold, Platinum and Palladium. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2018**, *43*, 30–36. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2017.10.014>.
  96. Sathyanarayana, A.; Nakamura, S. ya; Hisano, K.; Tsutsumi, O.; Srinivas, K.; Prabusankar, G. Controlling the Solid-State Luminescence of Gold(I) N-Heterocyclic Carbene Complexes through Changes in the Structure of Molecular Aggregates. *Sci. China Chem.* **2018**, *61* (8), 957–965. <https://doi.org/10.1007/s11426-018-9318-9>.
  97. Magherini, F.; Fiaschi, T.; Valocchia, E.; Becatti, M.; Pratesi, A.; Marzo, T.; Massai, L.; Gabbiani, C.; Landini, I.; Nobili, S.; Mini, E.; Messori, L.; Modesti, A.; Gamberi, T. Antiproliferative Effects of Two Gold(I)-N-Heterocyclic Carbene Complexes in A2780 Human Ovarian Cancer Cells: A Comparative Proteomic Study. *Oncotarget* **2018**, *9* (46), 28042–28068.
  98. Hickey JL; Ruhayel RA; Barnard PJ; Baker MV; Berners-Price SJ; Filipovska A. Mitochondria-Targeted Chemotherapeutics: The Rational Design of Gold(I) N-Heterocyclic Carbene Complexes That Are Selectively Toxic to Cancer Cells and Target Protein Selenols in Preference to Thiols. *J Am Chem Soc.* **2008**, *130* (38), 12570–12571.
  99. Curado N; Giménez N; Miachin K; Aliaga-Lavrijsen M; Cornejo MA; Jarzecki AA; Contel M. Preparation of Titanocene-Gold Compounds Based on Highly Active Gold(I)-N-Heterocyclic Carbene Anticancer Agents: Preliminary in Vitro Studies in Renal and Prostate Cancer Cell Lines. *ChemMedChem* **2019**, *14* (11), 1086-1095.
  100. Hussaini, S. Y., Haque, R. A. & Razali, M. R. Recent progress in silver(I)-, gold(I)/(III)- and palladium(II)-N-heterocyclic carbene complexes: A review towards biological perspectives. *J. Organomet. Chem.* **882**, 96–111 (2019).
  101. Mora, M., Gimeno, M. C. & Visbal, R. Recent advances in gold-NHC complexes with biological properties. *Chem. Soc. Rev.* **48**, 447–462 (2019).
  102. 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*, 709–746. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.01.065>.
  103. Liu, W. & Gust, R. Update on metal N-heterocyclic carbene complexes as potential anti-tumor metallodrugs. *Coord. Chem. Rev.* **329**, 191–213 (2016).
  104. Gautier, A. & Cisnetti, F. Advances in metal-carbene complexes as potent anti-cancer agents. *Metallomics* **4**, 23–32 (2012).
  105. Ray, S.; Mohan, R.; Singh, J. K.; Samantaray, M. K.; Shaikh, M. M.; Panda, D.; Ghosh, P. Anticancer and Antimicrobial Metallopharmaceutical Agents Based on Palladium, Gold, and Silver N-Heterocyclic Carbene Complexes. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129* (48), 15042–15053. <https://doi.org/10.1021/ja075889z>.
  106. Hindi, K. M., Panzner, M. J., Tessier, C. A., Cannon, C. L. & Youngs, W. J. The medicinal applications of imidazolium carbene-metal complexes. *Chem. Rev.* **109**, 3859–3884 (2009).
  107. Esposito E, Drechsler M, Puglia C & Cortesi R. New Strategies for the Delivery of Some Natural Anti-oxidants with Therapeutic Properties. *Mini Rev Med Chem* **19**, 1030–1039

- (2019).
108. Choudhury, H.; Gorain, B.; Tekade, R. K.; Pandey, M.; Karmakar, S.; Pal, T. K. Safety against Nephrotoxicity in Paclitaxel Treatment: Oral Nanocarrier as an Effective Tool in Preclinical Evaluation with Marked in Vivo Antitumor Activity. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **2017**, *91*, 179–189. <https://doi.org/10.1016/J.YRTPH.2017.10.023>
  109. Schmidt C; Karge B; Misgeld R; Prokop A; Franke R; Brönstrup M; Ott I. Gold(I) NHC Complexes: Antiproliferative Activity, Cellular Uptake, Inhibition of Mammalian and Bacterial Thioredoxin Reductases, and Gram-Positive Directed Antibacterial Effects. *Chemistry (Easton)*. **2017**, *23* (8), 1869–1880. <https://doi.org/doi:10.1002/chem.201604512>.
  110. Pearson, S., Scarano, W. & Stenzel, M. H. Micelles based on gold-glycopolymer complexes as new chemotherapy drug delivery agents. *Chem. Commun.* **48**, 4695–4697 (2012).
  111. Cunniff, B., Snider, G. W., Fredette, N., Hondal, R. J. & Heintz, N. H. A direct and continuous assay for the determination of thioredoxin reductase activity in cell lysates. *Anal. Biochem.* **443**, 34–40 (2013).
  112. Pushpakom, S.; Iorio, F.; Eyers, P. A.; Escott, K. J.; Hopper, S.; Wells, A.; Doig, A.; Williams, T.; Latimer, J.; McNamee, C.; Norris, A.; Sanseau, P.; Cavalla, D.; Pirmohamed, M. Drug Repurposing: Progress, Challenges and Recommendations. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2018**, *18* (1), 41–58. <https://doi.org/10.1038/nrd.2018.168>.
  113. Madeira, J. M., Bajwa, E., Stuart, M. J., Hashioka, S. & Klegeris, A. Gold drug auranofin could reduce neuroinflammation by inhibiting microglia cytotoxic secretions and primed respiratory burst. *J. Neuroimmunol.* **276**, 71–9 (2014).
  114. Roder, C. & Thomson, M. J. Auranofin: Repurposing an Old Drug for a Golden New Age. *Drugs R D* **15**, 13–20 (2015).
  115. Chirullo, B.; Sgarbanti, R.; Limongi, D.; Shytaj, I. L.; Alvarez, D.; Das, B.; Boe, A.; DaFonseca, S.; Chomont, N.; Liotta, L.; Petricoin, E.; Norelli, S.; Pelosi, E.; Garaci, E.; Savarino, A.; Palamara, A. T. A Candidate Anti-HIV Reservoir Compound, Auranofin, Exerts a Selective “anti-Memory” Effect by Exploiting the Baseline Oxidative Status of Lymphocytes. *Cell Death Dis.* **2013**, *4* (12). <https://doi.org/10.1038/cddis.2013.473>.
  116. Diaz, R. S.; Shytaj, I. L.; Giron, L. B.; Obermaier, B.; della Libera, E.; Galinskas, J.; Dias, D.; Hunter, J.; Janini, M.; Gosuen, G.; Ferreira, P. A.; Sucupira, M. C.; Maricato, J.; Fackler, O.; Lusic, M.; Savarino, A. Potential Impact of the Antirheumatic Agent Auranofin on Proviral HIV-1 DNA in Individuals under Intensified Antiretroviral Therapy: Results from a Randomised Clinical Trial. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2019**, *54* (5), 592–600. <https://doi.org/10.1016/J.IJANTIMICAG.2019.08.001>.
  117. Miyamoto, Y. & Eckmann, L. Drug development against the major diarrhea-causing parasites of the small intestine, *Cryptosporidium* and *Giardia*. *Front. Microbiol.* **6**, 208 (2015).
  118. Debnath, A.; Parsonage, D.; Andrade, R. M.; He, C.; Cobo, E. R.; Hirata, K.; Chen, S.; García-Rivera, G.; Orozco, E.; Martínez, M. B.; Gunatilleke, S. S.; Barrios, A. M.; Arkin, M. R.; Poole, L. B.; McKerrow, J. H.; Reed, S. L. A High-Throughput Drug Screen for *Entamoeba histolytica* Identifies a New Lead and Target. *Nat. Med.* **2012**, *18* (6), 956–960. <https://doi.org/10.1038/nm.2758>.

119. Capparelli, E. V., Bricker-Ford, R., Rogers, M. J., McKerrow, J. H. & Reed, S. L. Phase I clinical trial results of auranofin, a novel antiparasitic agent. *Antimicrob. Agents Chemother.* **61**, (2017).
120. Sannella, A. R.; Casini, A.; Gabbiani, C.; Messori, L.; Bilia, A. R.; Vincieri, F. F.; Majori, G.; Severini, C. New Uses for Old Drugs. Auranofin, a Clinically Established Antiarthritic Metallodrug, Exhibits Potent Antimalarial Effects in Vitro: Mechanistic and Pharmacological Implications. *FEBS Lett.* **2008**, *582* (6), 844–847. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2008.02.028>.
121. Cassetta, M. I., Marzo, T., Fallani, S., Novelli, A. & Messori, L. Drug repositioning: Auranofin as a prospective antimicrobial agent for the treatment of severe staphylococcal infections. *BioMetals* **27**, 787–791 (2014).
122. Thangamani, S.; Mohammad, H.; Abushahba, M. F. N.; Sobreira, T. J. P.; Hedrick, V. E.; Paul, L. N.; Seleem, M. N. Antibacterial Activity and Mechanism of Action of Auranofin against Multi-Drug Resistant Bacterial Pathogens. *Sci. Rep.* **2016**, *6*. <https://doi.org/10.1038/srep22571>.
123. Marzo, T.; Cirri D; Pollini S; Prato M; Fallani S; Cassetta MI; Novelli A; Rossolini GM; Messori L. Auranofin and Its Analogues Show Potent Antimicrobial Activity against Multidrug-Resistant Pathogens: Structure-Activity Relationships. *ChemMedChem* **2018**, *13* (22), 2448–2454. <https://doi.org/doi: 10.1002/cmdc.201800498>.
124. Higby, G. J. Gold in medicine: a review of its use before 1900. *Gold Bull* **15**, 130–140 (1982).
125. Sousa, S. A.; Leitão, J. H.; Silva, R. A. L.; Belo, D.; Santos, I. C.; Guerreiro, J. F.; Martins, M.; Fontinha, D.; Prudêncio, M.; Almeida, M.; Lorcey, D.; Marques, F. On the Path to Gold: Monoanionic Au Bisdithiolate Complexes with Antimicrobial and Antitumor Activities. *J. Inorg. Biochem.* **2020**, *202*. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2019.110904>
126. Nomiya, K.; Morozumi, S.; Yanagawa, Y.; Hasegawa, M.; Kurose, K.; Taguchi, K.; Sakamoto, R.; Mihara, K.; Kasuga, N. C. Syntheses, Structures, and Antimicrobial Activities of Gold(I)- and Copper(I)- N-Heterocyclic Carbene (NHC) Complexes Derived from Basket-Shaped Dinuclear Ag(I)-NHC Complex. *Inorg. Chem.* **2018**, *57* (18), 11322–11332. <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.8b00011>.
127. Stenger-Smith, J., Chakraborty, I. & Mascharak, P. K. Cationic Au(I) complexes with aryl-benzothiazoles and their antibacterial activity. *J. Inorg. Biochem.* **185**, 80–85 (2018).
128. Dominelli, B., Correia, J. D. G. & Kühn, F. E. Medicinal Applications of Gold(I/III)-Based Complexes Bearing N-Heterocyclic Carbene and Phosphine Ligands. *J. Organomet. Chem.* **866**, 153–164 (2018).
129. de Almeida, A. M.; de Oliveira, B. A.; de Castro, P. P.; de Mendonça, C. C.; Furtado, R. A.; Nicolella, H. D.; da Silva, V. L.; Diniz, C. G.; Tavares, D. C.; Silva, H.; de Almeida, M. V. Lipophilic Gold(I) Complexes with 1,3,4-Oxadiazol-2-Thione or 1,3-Thiazolidine-2-Thione Moieties: Synthesis and Their Cytotoxic and Antimicrobial Activities. *BioMetals* **2017**, *30* (6), 841–857. <https://doi.org/10.1007/s10534-017-0046-6>.
130. Schmidt, C.; Karge, B.; Misgeld, R.; Prokop, A.; Brönstrup, M.; Ott, I. Biscarbene Gold(i) Complexes: Structure-Activity-Relationships Regarding Antibacterial Effects, Cytotoxicity, TrxR Inhibition and Cellular Bioavailability. *Medchemcomm* **2017**, *8* (8),

- 1681–1689. <https://doi.org/10.1039/c7md00269f>.
131. Lu, J. & Holmgren, A. The thioredoxin antioxidant system. *Free Radic. Biol. Med.* **66**, 75–87 (2014).
132. Owings, J. P.; McNair, N. N.; Mui, Y. F.; Gustafsson, T. N.; Holmgren, A.; Contel, M.; Goldberg, J. B.; Mead, J. R. Auranofin and N-Heterocyclic Carbene Gold-Analogs Are Potent Inhibitors of the Bacteria *Helicobacter Pylori*. *FEMS Microbiol. Lett.* **2016**, *363* (14). <https://doi.org/10.1093/femsle/fnw148>.
133. Harbut, M. B.; Vilchèze, C.; Luo, X.; Hensler, M. E.; Guo, H.; Yang, B.; Chatterjee, A. K.; Nizet, V.; Jacobs, W. R.; Schultz, P. G.; Wang, F. Auranofin Exerts Broad-Spectrum Bactericidal Activities by Targeting Thiol-Redox Homeostasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2015**, *112* (14), 4453–4458. <https://doi.org/10.1073/pnas.1504022112>.
134. Tharmalingam N; Ribeiro NQ; da Silva DL; Naik MT; Cruz LI; Kim W; Shen S; Dos Santos JD; Ezikovich K; D'Agata EM; Mylonakis E; Fuchs BB. Auranofin Is an Effective Agent against Clinical Isolates of *Staphylococcus Aureus*. *Futur. Med Chem.* **2019**, *11* (12), 1417–1425. <https://doi.org/doi:10.4155/fmc-2018-0544>.
135. Pang, Z., Raudonis, R., Glick, B. R., Lin, T.-J. & Cheng, Z. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. *Biotechnol. Adv.* **37**, 177–192 (2019).
136. Bruguera, M. C. & García, M. M. Antibacterianos de acción sistémica. Parte III: Sulfonamidas y tetraciclinas. *Rev. Cuba. Med. Gen. Integr.* **15**, 156–67 (1999).
137. Mizdal, C. R.; Stefanello, S. T.; Nogara, P. A.; Antunes Soares, F. A.; de Lourenço Marques, L.; de Campos, M. M. A. Molecular Docking, and Anti-Biofilm Activity of Gold-Complexed Sulfonamides on *Pseudomonas Aeruginosa*. *Microb. Pathog.* **2018**, *125*, 393–400. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.10.004>.
138. Hariri, B. M.; McMahon, D. B.; Chen, B.; Adappa, N. D.; Palmer, J. N.; Kennedy, D. W.; Lee, R. J. Plant Flavones Enhance Antimicrobial Activity of Respiratory Epithelial Cell Secretions against *Pseudomonas Aeruginosa*. *PLoS One* **2017**, *12* (9), e0185203. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185203>.
139. Roymahapatra, G.; Mandal, S. M.; Porto, W. F.; Samanta, T.; Giri, S.; Dinda, J.; Franco, O. L.; Chattaraj, P. K. Pyrazine Functionalized Ag(I) and Au(I)-NHC Complexes Are Potential Antibacterial Agents. *Curr. Med. Chem.* **2012**, *19*, 4184–4193.
140. Foks, H., Balewski, L., Gobis, K., Dabrowska-Szponar, M. & Wisniewska, K. Studies on pyrazine derivatives LII: Antibacterial and antifungal activity of nitrogen heterocyclic compounds obtained by pyrazinamidrazone usage. *Heteroat. Chem.* **23**, 49–58 (2012).
141. Jandourek, O.; Dolezal, M.; Kunes, J.; Kubicek, V.; Paterova, P.; Pesko, M.; Buchta, V.; Kralova, K.; Zitko, J. New Potentially Active Pyrazinamide Derivatives Synthesized under Microwave Conditions. *Molecules* **2014**, *19* (7), 9318–9338. <https://doi.org/10.3390/molecules19079318>.
142. Naik KK, Thangavel S, Alam A & Kumar S. Flavone Analogues as Antimicrobial Agents. *Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov.* **11**, 53–63 (2017).
143. Montenegro, C. D. A.; Gonçalves, G. F.; De Oliveira Filho, A. A.; Lira, A. B.; Cassiano, T. T. M.; De Lima, N. T. R.; Barbosa-Filho, J. M.; Diniz, M. D. F. F. M.; Pessôa, H. L. F. In *Silico*

- Study and Bioprospection of the Antibacterial and Antioxidant Effects of Flavone and Its Hydroxylated Derivatives. *Molecules* **2017**, *22* (6). <https://doi.org/10.3390/molecules22060869>.
144. Middha, S. K., Usha, T., Basistha, B. C. & Goyal, A. K. Amelioration of antioxidant potential, toxicity, and antihyperglycemic activity of Hippophae salicifolia D. Don leaf extracts in alloxan-induced diabetic rats. *3 Biotech* **9**, (2019).
  145. Srinivasan, B., Tondast-Navaei, S., Roy, A., Zhou, H. & Skolnick, J. Chemical space of Escherichia coli dihydrofolate reductase inhibitors: New approaches for discovering novel drugs for old bugs. *Med. Res. Rev.* **39**, 684–705 (2019).
  146. Galassi, R.; Oumarou, C. S.; Burini, A.; Dolmella, A.; Micozzi, D.; Vincenzetti, S.; Pucciarelli, S. A Study on the Inhibition of Dihydrofolate Reductase (DHFR) from Escherichia Coli by Gold(I) Phosphane Compounds. X-Ray Crystal Structures of (4,5-Dichloro-1H-Imidazole-1-yl)-Triphenylphosphane-Gold(I) and (4,5-Dicyano-1H-Imidazole-1-yl)-Triphenylphosphane-Gold(I). *Dalt. Trans.* **2015**, *44* (7), 3043–3056. <https://doi.org/10.1039/c4dt01542h>.
  147. Pucciarelli, S.; Vincenzetti, S.; Ricciutelli, M.; Simon, O. C.; Ramadori, A. T.; Luciani, L.; Galassi, R. Studies on the Interaction between Poly-Phosphane Gold(I) Complexes and Dihydrofolate Reductase: An Interplay with Nicotinamide Adenine Dinucleotide Cofactor. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20* (7). <https://doi.org/10.3390/ijms20071802>.



# CAPITULO 4

## COMPLEJOS DE ORO(I) Y PLATA(I) DERIVADOS DE 2- ANILINOPYRIDINA

- *Gold(I) and Silver(I) Complexes with 2-Anilino-Pyridine Based Heterocycles as Multitarget Drugs against Colon Cancer. Enviado a Eur. J. Med. Chem. (Agosto 2020)*



Aunque, hasta el momento, la presente memoria se ha centrado en el prometedor uso del oro con fines quimioterapéuticos, debido a las exhaustivas investigaciones de las que ha sido objeto durante la última década, lo cierto es que desde el descubrimiento de las propiedades antitumorales del cisplatino han sido varios los metales que han sido estudiados para sintetizar alternativas seguras y eficaces. Existe una amplia gama de opciones a las que recurrir: rutenio, cobre, cobalto, níquel, zinc o paladio son algunas de las opciones más comunes<sup>1-5</sup>. Y la lista se amplía a cada momento, puesto que, al no haber encontrado todavía a ese sustituto definitivo del cisplatino, la búsqueda continúa.

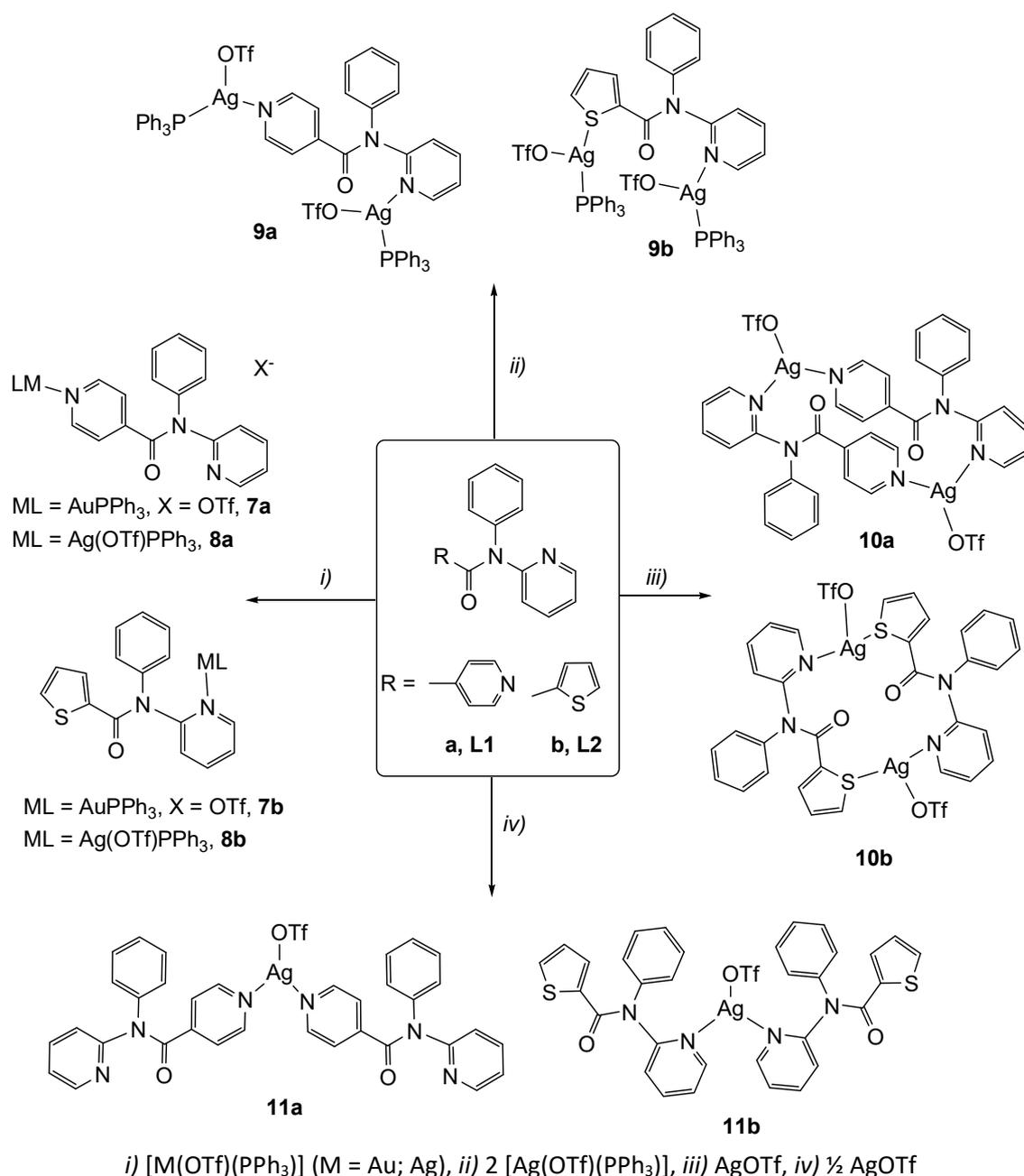
Recientemente, se ha comenzado a prestar atención al potencial antitumoral de la plata. Al igual que ocurre con el oro, la plata ha tenido una fuerte presencia en la historia de la medicina a lo largo de los años. Este metal ha destacado especialmente por sus propiedades antibacterianas, siendo uno de sus usos principales en pomadas destinadas a la cicatrización de heridas para reducir el riesgo de infección. El nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ ) es el ejemplo más conocido de complejo de plata que se ha usado en el tratamiento de heridas y quemaduras solares<sup>6</sup>, junto con el complejo sulfadiazina de plata (introducido en 1968<sup>7</sup> como una de las sustancias más efectivas contra las quemaduras, gracias a sus propiedades bactericidas<sup>8</sup>). No obstante, las sales de plata, forma en la que preferentemente se administraban, presentaban serias limitaciones por su escasa estabilidad y sus efectos tóxicos, en su mayoría de tipo dermatológico<sup>4,9</sup>. Uno de los principales problemas derivados del uso del nitrato de plata era la alta solubilidad de estas sales en el plasma sanguíneo, lo que causaba su disociación y la formación de complejos insolubles. Por ello, dadas las interesantes propiedades medicinales de este metal, durante los últimos años se ha priorizado el coordinar el centro metálico a ligandos que se unan a él con fuerza para evitar la disociación, con lo que se reducirían sus efectos secundarios manteniendo sus propiedades terapéuticas<sup>4</sup>. Al mismo tiempo que se sintetizaban nuevos complejos de plata, el concepto de *drug repositioning* y la necesidad de encontrar alternativas al cisplatino hizo que se comenzasen a investigar las propiedades antitumorales de esta clase de derivados metálicos. Se han encontrado una serie de compuestos de interesante acción antitumoral frente a diversos modelos cancerígenos, si bien estos estudios son en su mayoría muy preliminares y no se han identificado con certeza sus principales dianas moleculares. En cualquier caso, se cree que la entrada de los iones  $\text{Ag}^+$  al interior celular atravesando la membrana plasmática es un paso necesario para alterar la función normal de la célula tumoral y causar así su muerte. Es por ello que la elección de los ligandos de coordinación para la síntesis de los derivados de plata debe ser especialmente cuidadosa, ya que deben evitarse aquellos que establezcan uniones demasiado fuertes con el centro metálico, puesto que podrían impedir su liberación y, por tanto, su efecto biológico<sup>10</sup>. No obstante, según se mencionaba anteriormente, debe evitarse llegar al extremo contrario y recurrir a ligandos que liberen demasiado rápido los iones  $\text{Ag}^+$ , puesto que esto podría dar lugar a efectos secundarios indeseables<sup>4,10</sup>.

Es por ello que, durante los últimos años, se ha sintetizado una amplia gama de compuestos de plata(I) coordinados con diversos ligandos para mejorar sus propiedades biológicas, especialmente las relacionadas con su potencial antitumoral. De entre todos estos compuestos, destacan por ser los más abundantes los compuestos de plata coordinados con carbenos N-heterocíclicos, ya que esta clase de ligandos establecen uniones fuertes con el centro metálico, lo que da lugar a compuestos con una alta estabilidad<sup>11-14</sup>. Otros ligandos que también se han utilizado para el diseño de nuevos derivados de plata con propiedades farmacológicas incluyen ligandos de tipo ácido carboxílico<sup>15</sup>, fosfinas<sup>16,17</sup>, aminoácidos<sup>18</sup>, N-donores<sup>19</sup> y S-donores<sup>20</sup>, así como ligandos mixtos, como por ejemplo N,O-<sup>21</sup>, N,S-<sup>22</sup> y P,O-donores<sup>23</sup>.

Dado que algunos complejos de plata son activos frente a líneas celulares que son naturalmente resistentes al cisplatino, se ha podido descartar que compartan su mecanismo de acción<sup>24,25</sup>. Esta es la primera evidencia que sugiere que los derivados de plata podrían ser de interés para el tratamiento de aquellos tumores que no responden bien a la terapia con cisplatino, como ocurre con el cáncer colorrectal, o bien con aquellos que desarrollan resistencia a este fármaco, lo que pone de manifiesto la necesidad de continuar con las investigaciones en este campo. Posteriores trabajos han apuntado a la tiorredoxina reductasa<sup>26</sup>, el ADN<sup>27,28</sup>, las topoisomerasas<sup>25</sup> o la enzima lipooxigenasa<sup>28</sup> como potenciales dianas; también se ha observado que la despolarización mitocondrial es una respuesta frecuente al tratamiento<sup>29</sup>. No obstante, debe tenerse en cuenta que la mayor parte de estos ensayos se realizaron con proteínas recombinantes<sup>25,30</sup>. De acuerdo con datos previamente obtenidos en nuestro grupo de investigación<sup>31</sup>, no debe concluirse que el efecto antitumoral de un derivado metálico está mediado por la inhibición de una proteína concreta si estos estudios no se han validado en un modelo celular, ya que los resultados obtenidos con proteínas recombinantes no son extrapolables al medio intracelular. Este sistema puede ser adecuado, no obstante, para realizar un *screening* primario en caso de que se busque sintetizar un complejo que actúe como inhibidor selectivo de una enzima específica, aunque los datos siempre deberán ser validados en un cultivo celular.

Hasta la fecha, los resultados más prometedores acerca de la diana terapéutica de los complejos de plata son los obtenidos por Chen *et al.*<sup>32</sup>, dado que han sido obtenidos en un modelo celular y no utilizando enzimas recombinantes, a diferencia de la mayoría de las investigaciones llevadas a cabo hasta el momento. Los autores evaluaron el efecto antitumoral de un complejo de plata con el ligando ditiocarbamato de etilo  $[Ag(S_2CN(C_2H_5)_2)]_6$  sobre la línea celular NSCLC, un modelo de cáncer de pulmón de células no pequeñas, y observaron que se impedía la actividad del proteasoma mediante el bloqueo de las deubiquitinases proteasomales, postulándose por consiguiente como la principal diana potencial del mencionado complejo de plata. La incubación con los complejos causó, además, un incremento en los niveles de ROS y la muerte vía apoptosis<sup>32</sup>.

Debido al interés creciente por las propiedades antitumorales de la plata, y los puntos cruciales que quedan por resolver acerca de su mecanismo de acción, se decidió avanzar respecto a los capítulos anteriores, centrados en el estudio del efecto anticancerígeno de derivados de oro(I), para comparar no solo el efecto de los ligandos libres sobre las propiedades biológicas de la molécula, sino también la influencia del propio centro metálico. Así, fueron sintetizados por miembros de nuestro grupo de investigación dos nuevas series de complejos metálicos coordinados con dos ligandos amida derivados de la 2-anilino piridina (**L1** y **L2** respectivamente; Esquema 3), obtenidos a partir de la reacción de la anilina con los cloruros de acilo correspondientes (RCOCl; R = 4-piridina, **L1**, 2-tiofeno, **L2**). A partir de ambos ligandos se sintetizaron los correspondientes complejos mononucleares de oro con PPh<sub>3</sub> [Au(L1)(PPh<sub>3</sub>)](TfO) (TfO = CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>) (**7a**) y [Au(L2)(PPh<sub>3</sub>)](TfO) (**7b**) y sus homólogos de plata [Ag(TfO)(L1)(PPh<sub>3</sub>)] (**8a**) y [Ag(TfO)(L2)(PPh<sub>3</sub>)] (**8b**), así como los correspondientes complejos dinucleares de plata [Ag<sub>2</sub>(TfO)<sub>2</sub>(L1)(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>] (**9a**) y [Ag<sub>2</sub>(TfO)<sub>2</sub>(L2)(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>] (**9b**), además de los derivados dinucleares de plata con dos unidades de ligando **L1** o **L2** [Ag(TfO)(L1)]<sub>2</sub> (**10a**) y [Ag(TfO)(L2)]<sub>2</sub> (**10b**) y los complejos mononucleares de plata con dos ligandos [Ag(TfO)(L1)]<sub>2</sub> (**11a**) y [Ag(TfO)(L2)]<sub>2</sub> (**11b**) (Esquema 3).



**Esquema 3.** Estructura de los derivados de oro(I) y plata(I) coordinados con ligandos derivados de la 2-anilino piridina.

Para evaluar su potencial antitumoral, todos los complejos fueron incubados durante 72h en las líneas celulares Caco-2 (adenocarcinoma de colon) y MCF-7 (carcinoma de mama), obteniéndose el valor de su IC<sub>50</sub> que se recoge en la Tabla 19. Esta aproximación es similar a la llevada a cabo en el Capítulo 3, y tiene como objeto estudiar una posible selectividad de los derivados en cuanto al tipo de tumor. Puede observarse que todos los derivados poseen un mayor efecto antiproliferativo que el cisplatino sobre ambos modelos tumorales, con la notable excepción del complejo [Ag(TfO)(L1)]<sub>2</sub> (**10a**) en la línea MCF-7, sobre la que parece carecer de efecto. El complejo de oro [Au(L1)(PPh<sub>3</sub>)](TfO) (**7a**), además, muestra valores de IC<sub>50</sub> comparables a los del

auranofin en ambas líneas, lo que sugiere que se trata de un derivado con un prometedor potencial antitumoral. En general, los complejos de oro [Au(L1)(PPh<sub>3</sub>)](TfO) (**7a**) y [Au(L2)(PPh<sub>3</sub>)](TfO) (**7b**) con los dos ligandos derivados de la 2-anilinopiridina muestran un mayor efecto antiproliferativo que sus análogos de plata, con la notable excepción del complejo [Ag<sub>2</sub>(TfO)<sub>2</sub>(L1)(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>] (**9a**), que posee un IC<sub>50</sub> en torno a 9 veces mayor que **7a** sobre la línea Caco-2. No obstante, durante la caracterización del mismo se observó que, al disolverlo en dimetilsulfoxido, evolucionaba con el tiempo a una mezcla de productos entre los que además de **9a** se identificó la especie [Ag(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]TfO, por lo que el efecto antitumoral de este compuesto de plata no se correspondería con el causado por una única especie. Por consiguiente, la opción más prudente fue apartar a **9a** de futuros ensayos.

**Tabla 19.** Valores de IC<sub>50</sub> (μM) obtenidos para los complejos de oro y plata, así como para sus ligandos y para cisplatino y auranofin como controles positivos, obtenidos tras 72h de incubación en células Caco-2 y MCF-7. Los resultados se expresan como media ± desviación estándar.

Complejo	IC <sub>50</sub> (μM)	
	Caco-2	MCF-7
<b>L1</b>	>100	17,45 ± 8,16
[Au(L1)(PPh <sub>3</sub> )](TfO) ( <b>7a</b> )	2,23 ± 0,21	0,46 ± 0,56
[Ag(TfO)(L1)(PPh <sub>3</sub> )] ( <b>8a</b> )	5,52 ± 1,89	7,22 ± 0,69
[Ag <sub>2</sub> (TfO) <sub>2</sub> (L1)(PPh <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ] ( <b>9a</b> )	0,25 ± 0,10	4,10 ± 0,44
[Ag(TfO)(L1)] <sub>2</sub> ( <b>10a</b> )	7,50 ± 3,14	>100
[Ag(TfO)(L1)] <sub>2</sub> ( <b>11a</b> )	10,22 ± 5,02	15,60 ± 1,08
<b>L2</b>	48,54 ± 13,32	12,48 ± 5,32
[Au(L2)(PPh <sub>3</sub> )](TfO) ( <b>7b</b> )	3,75 ± 0,41	3,53 ± 0,52
[Ag(TfO)(L2)(PPh <sub>3</sub> )] ( <b>8b</b> )	7,11 ± 0,92	6,71 ± 0,01
[Ag <sub>2</sub> (TfO) <sub>2</sub> (L2)(PPh <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ] ( <b>9b</b> )	14,41 ± 2,61	7,43 ± 0,49
[Ag(TfO)(L2)] <sub>2</sub> ( <b>10b</b> )	1,32 ± 0,47	2,65 ± 0,32
[Ag(TfO)(L2)] <sub>2</sub> ( <b>11b</b> )	4,22 ± 2,00	0,90 ± 0,11
<b>Cisplatino</b>	37,24 ± 5,15	41,82 ± 0,07
<b>Auranofin</b>	1,80 ± 0,10	0,77 ± 0,05

Los datos recogidos en la Tabla 19 merecen un análisis en profundidad. En primer lugar, resulta llamativo que el ligando con la unidad tiofeno, **L2** (N-fenil-N-(piridin-2-il)tiofeno-2-carboxamida), muestre un efecto antiproliferativo comparable al del cisplatino en la línea Caco-2 y que sea incluso mayor en la línea MCF-7, sobre la que el ligando con una unidad adicional de piridina, **L1** (N-fenil-N-(piridin-2-il)isonicotinamida), también tiene un efecto considerable. Es decir, el modelo de carcinoma de mama utilizado parece ser especialmente sensible al tratamiento con los ligandos **L1** y **L2**.

Al coordinar dichos ligandos al centro metálico se observa un aumento del efecto antitumoral del complejo resultante en comparación con el obtenido para el ligando por sí solo. Esto es especialmente notable en el caso de la serie **7-11a** en la línea Caco-2, ya que el ligando **L1** es inactivo sobre este modelo celular; no obstante, esta observación es extensible a la serie **7-11b** y a la línea MCF-7, cuya sensibilidad hacia **L2** ya ha sido mencionada. Curiosamente, la elección de un ligando u otro no parece modificar el efecto antitumoral del derivado resultante, salvo en algunos casos concretos en los que la diferencia es significativa ( $p < 0,05$ ) y que se detallan a continuación:

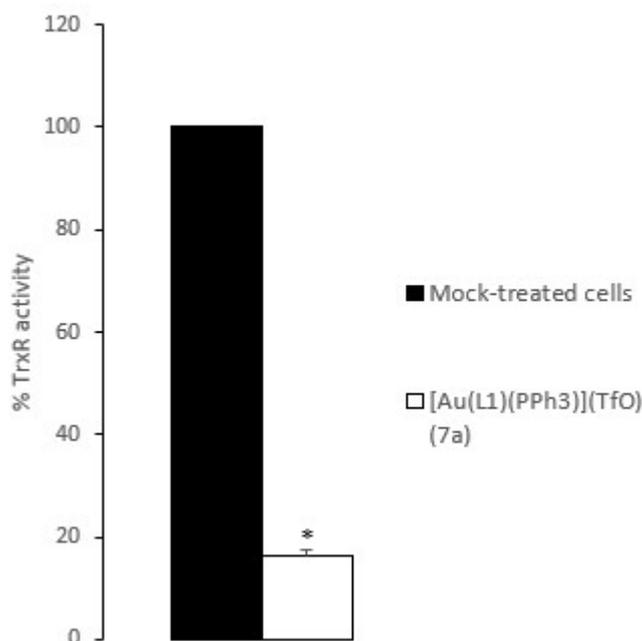
- El complejo  $[\text{Ag}_2(\text{TfO})_2(\text{L1})(\text{PPh}_3)_2]$  (**9a**) presenta un  $\text{IC}_{50}$  aproximadamente 58 veces mayor que su equivalente de plata  $[\text{Ag}_2(\text{TfO})_2(\text{L2})(\text{PPh}_3)_2]$  (**9b**) en la línea Caco-2. Sin embargo, este resultado podría achacarse a la ya mencionada presencia adicional de la especie  $[\text{Ag}(\text{PPh}_3)_2]\text{TfO}$ , que no fue detectada en las disoluciones del homólogo **9b**.
- El complejo  $[\text{Au}(\text{L1})(\text{PPh}_3)](\text{TfO})$  (**7a**) posee un  $\text{IC}_{50}$  aproximadamente 8 veces mayor que su equivalente con el ligando **L2**,  $[\text{Au}(\text{L2})(\text{PPh}_3)](\text{TfO})$  (**7b**), en la línea MCF-7.
- El complejo  $[\text{Ag}(\text{TfO})(\text{L2})_2]$  (**11b**) muestra un valor de  $\text{IC}_{50}$  aproximadamente 17 veces mayor que su homólogo  $[\text{Ag}(\text{TfO})(\text{L1})_2]$  (**11a**) sobre la línea MCF-7, siendo de interés por ser el único caso en el que un complejo coordinado con **L2** muestra mayor efecto que su equivalente coordinado con **L1**.
- Finalmente, tal y como se ha destacado anteriormente, el complejo  $[\text{Ag}(\text{TfO})(\text{L1})]_2$  (**10a**) no presenta actividad anticancerígena sobre la línea MCF-7, mientras que el equivalente de plata  $[\text{Ag}(\text{TfO})(\text{L2})]_2$  (**10b**) es muy activo frente a este modelo tumoral.

Si comparamos los valores obtenidos al tratar con el mismo compuesto las dos líneas celulares, encontramos de igual manera algunas discrepancias interesantes. La más llamativa de ellas es sin duda el ya mencionado efecto antiproliferativo que muestran ambos ligandos sobre la línea MCF-7, siendo prácticamente inocuos para la línea Caco-2, con especial énfasis en el caso de **L1**. Cabría esperar, por lo tanto, que los complejos resultasen mucho más activos sobre la línea MCF-7, aunque en la práctica esto no ocurre en todos los casos estudiados.

Centrándonos en el efecto del complejo  $[\text{Au}(\text{L1})(\text{PPh}_3)](\text{TfO})$  (**7a**), la Tabla 19 muestra que posee un valor de  $\text{IC}_{50}$  unas 5 veces mayor en la línea MCF-7 que en la línea Caco-2.

En nuestra experiencia, la tendencia que muestran los complejos de oro(I) es a ejercer un mayor efecto antiproliferativo sobre el modelo de cáncer colorrectal, lo que se hace evidente si observamos los resultados obtenidos con las series **3a-d** y **4a-d** (ver Capítulo 3, pág. 205; Tabla 12). Este comportamiento también se observó con el complejo [Au(C≡C-2-NC<sub>5</sub>H<sub>4</sub>)(PTA)] (**2a**), cuyo IC<sub>50</sub> sobre células MCF-7 tiene un valor de 19,02 ± 0,02 μM, 5 veces mayor que sobre células Caco-2<sup>33</sup>. Trabajos de otros autores muestran pautas similares tanto con complejos de oro(I)<sup>34</sup>, como de oro(III)<sup>35</sup>. Una posible explicación a estas diferencias reside en la afinidad de los complejos de oro por la tiorredoxina reductasa, enzima que está sobreexpresada de forma habitual en cáncer colorrectal, pero no en todos los subtipos de cáncer de mama. En este sentido, la inhibición de la TrxR puede ser de gran interés en tumores colorrectales dada su alta dependencia de su acción redox<sup>36,37</sup>, pero se ha observado que en tumores de mama positivos para el receptor de estrógenos la situación es completamente diferente. Un estudio llevado a cabo por Cañas *et al.*<sup>38</sup> sobre la línea MCF-7, modelo de cáncer de mama positivo para el receptor de estrógenos, reveló que la inhibición de la TrxR causada por auranofin tenía como consecuencia un aumento en la cantidad de proteínas nitrosiladas. Esta ruptura de la homeostasis S-nitrosotiol causaba un efecto proliferativo sobre el cultivo celular. Es decir, en el caso de complejos de oro cuya única diana sea la TrxR, es esperable que su efecto terapéutico sea menor en la línea MCF-7 que en otros modelos celulares como puede ser la línea Caco-2. De hecho, esto explicaría en parte el hecho de que el complejo [Au(L2b)PPh<sub>3</sub>] (**3b**) (siendo L2b el alquino derivado de la 3-hidroxi flavona 2-(4-bromofenil)-3-hidroxi-4H-cromen-4-one) tuviese un efecto considerablemente mayor sobre la línea Caco-2 que sobre la MCF-7 (ver Capítulo 3, pág. 205; Tabla 12), ya que dos de sus dianas terapéuticas eran la COX-2, que no se expresa en la línea MCF-7, y además la TrxR, cuya inhibición podría incluso tener el efecto contrario al deseado<sup>38</sup>. Retomando el papel del complejo [Au(L1)(PPh<sub>3</sub>)](TfO) (**7a**) sobre la línea MCF-7 a la vista de estas consideraciones, estos datos podrían interpretarse de dos maneras. Puede suponerse que este complejo carece de afinidad por la TrxR y que en su lugar afecta a otra diana, o bien que se trata de un complejo *multitarget* y que además de inhibir a dicha enzima afecte a otras dianas que sí son clave para la supervivencia de la línea MCF-7.

Tomando como modelo a la línea Caco-2, se decidió analizar la capacidad de **7a** de inhibir a la TrxR tras 24h de incubación. Se encontró un descenso significativo ( $p < 0,05$ ) en la actividad de la enzima (Figura 75), lo cual la señala como una de sus potenciales dianas terapéuticas. Por lo tanto, esto parece invalidar la primera de las hipótesis planteadas.



**Figura 75.** Efecto del complejo **7a** ( $IC_{50}$ ) sobre la TrxR de células Caco-2 tras 24h de incubación. \* $p < 0,05$  vs control negativo.

En el ya mencionado trabajo de Cañas *et al.*<sup>38</sup>, los autores descubrieron que la inhibición de la TrxR llevada a cabo por el tratamiento con auranofin sí causaba la muerte de las células MCF-7 si se bloqueaba al mismo tiempo la expresión del receptor de estrógenos. De acuerdo con estos resultados, cabría la posibilidad de que el complejo **7a** actúe no solo como inhibidor de la TrxR sino, además, como un antagonista del receptor de estrógenos. De acuerdo con esta aproximación, el efecto proliferativo causado por la inhibición de la tiorredoxina reductasa podría quedar anulado y causar la muerte de la célula. Este efecto antagonista podría estar mediado por un bloqueo directo del receptor o bien por una inhibición indirecta al reducir su nivel de expresión. Se decidió llevar a cabo un ensayo preliminar para determinar si el mecanismo de acción de los ligandos y los complejos podría estar relacionado con el receptor de estrógenos. Para ello, se calculó el  $IC_{50}$  de ambos ligandos y de los complejos [Au(L1)(PPh<sub>3</sub>)](TfO) (**7a**) y [Au(L2)(PPh<sub>3</sub>)](TfO) (**7b**) a modo de ejemplo sobre la línea celular MDA-MB-231, un modelo de cáncer de mama que no expresa el receptor de estrógenos<sup>39</sup>. Los valores obtenidos tras 72h de incubación se muestran en la Tabla 20.

**Tabla 20.** Valores de IC<sub>50</sub> (μM) obtenidos para los complejos **7a** y **7b**, así como para sus ligandos **L1** y **L2**, tras 72h de incubación en células MDA-MB-231. Los resultados se expresan como media ± desviación estándar. \*p<0,05 vs ligando.

Complejo	IC <sub>50</sub> (μM)
<b>L1</b>	5,69 ± 0,11
[Au(L1)(PPh <sub>3</sub> )](TfO) ( <b>7a</b> )	0,78 ± 0,20*
<b>L2</b>	154,09 ± 0,01
[Au(L2)(PPh <sub>3</sub> )](TfO) ( <b>7b</b> )	0,27 ± 0,05*

Si comparamos estos resultados con los previamente obtenidos sobre la línea MCF-7 (Tabla 19), el dato más llamativo es el IC<sub>50</sub> del ligando **L2**, ya que es aproximadamente 12 veces mayor en el modelo que no expresa el receptor de estrógenos que en el que sí lo expresa. Esta marcada diferencia podría implicar que el ligando **L2** es capaz de interactuar con el receptor de estrógenos, lo que explicaría su considerable efecto sobre la línea MCF-7. El ligando **L1**, por el contrario, resulta más efectivo frente al modelo negativo para el receptor de estrógenos que para el positivo, por lo que se descarta la hipótesis planteada en este supuesto. De igual manera, los dos derivados de oro(I) ensayados sobre la línea MDA-MB-231 muestran valores comparables a los previamente obtenidos en la línea MCF-7 (complejo **7a**), o incluso exhiben un mayor efecto antiproliferativo (complejo **7b**). Por tanto, parece quedar descartada la posibilidad de que el efecto biológico de los complejos esté mediado por una fuerte interacción con el receptor de estrógenos. No obstante, los datos obtenidos en la línea MDA-MB-231 resultan interesantes en tanto a que todos los resultados obtenidos hasta el momento apuntan a que esta serie de derivados de oro(I) podrían tener un futuro prometedor en el tratamiento del cáncer de mama, independientemente de que se exprese o no el receptor de estrógenos. Existen evidencias de que el auranofin es capaz de reducir la actividad de la enzima telomerasa mediante la producción de ROS y la inactivación de STAT3 en células MDA-MB-231<sup>40</sup>. Puesto que la actividad telomerasa es clave para las células tumorales, esta podría ser una de las dianas a través de las cuales los complejos **7a** y **7b** llevan a cabo su efecto antiproliferativo. No obstante, serán necesarios futuros ensayos en esta dirección para poder ahondar en esta hipótesis.

A continuación, se procederá a comparar la efectividad de los distintos derivados de plata de acuerdo con los valores de sus IC<sub>50</sub> recogidos en la Tabla 19. En el caso de los complejos **7-11a** con el ligando **L1** (N-fenil-N-(piridin-2-il)isonicotinamida), aquellos derivados coordinados con un único ligando (complejos [Ag(TfO)(L1)(PPh<sub>3</sub>)] (**8a**) y [Ag<sub>2</sub>(TfO)<sub>2</sub>(L1)(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>] (**9a**)) muestran un mayor efecto antiproliferativo que sus análogos coordinados con dos ligandos (complejos **10a** y **11a**) sobre ambos modelos

tumorales. Los datos obtenidos parecen indicar que la presencia de estos dos ligandos tipo 2-anilino piridina podría dificultar la entrada en la célula o bien impedir una unión efectiva a la diana terapéutica, lo que explicaría su menor efecto antiproliferativo en comparación con sus análogos. De igual manera, son en general más efectivos los complejos con dos centros metálicos ( $[\text{Ag}_2(\text{TfO})_2(\text{L1})(\text{PPh}_3)_2]$  (**9a**) y  $[\text{Ag}(\text{TfO})(\text{L1})]_2$  (**10a**)) que aquellos que cuentan con un único átomo de plata, salvo la ya mencionada excepción de **10a** en la línea MCF-7. A grandes rasgos, estos derivados podrían ordenarse de acuerdo con su efecto terapéutico de la siguiente manera: **9a** > **8a** > **10a** > **11a**. Los complejos con el ligando tiofeno **L2** (N-fenil-N-(piridin-2-il)tiofeno-2-carboxamida) (**7b-11b**), sin embargo, muestran un comportamiento diferente, puesto que los derivados coordinados con dos ligandos **L2** (complejos  $[\text{Ag}(\text{TfO})(\text{L2})]_2$  (**10b**) y  $[\text{Ag}(\text{TfO})(\text{L2})]_2$  (**11b**)) tienen un mayor efecto antitumoral que los que solo cuentan con un ligando. Considerando que el ligando **L2** posee un efecto citotóxico considerable por sí solo, estos resultados no deberían ser sorprendentes, puesto que gran parte de la acción biológica de los derivados podría ser consecuencia directa de la presencia del ligando. En este caso, además, las diferencias entre los derivados mono o dinucleares son menos acusadas que en el caso de los complejos **7a-11a**.

Posteriormente, se obtuvo una primera aproximación acerca de la toxicidad de los derivados de oro y plata sobre tejidos sanos calculando el valor del  $\text{IC}_{50}$  tras 72h de exposición sobre la línea Caco-2 diferenciada, así como los valores del índice de selectividad correspondientes (Tabla 21). Según puede observarse, son varios los complejos con un índice de selectividad superior al del cisplatino y auranofin. Por el contrario, los ligandos libres muestran una selectividad escasa, con valores de SI en el mismo rango que el de los dos controles positivos en la línea Caco-2 y en el rango del auranofin en la línea MCF-7. Estos datos sugieren que, a pesar de que los ligandos muestran un cierto efecto antiproliferativo por sí solos, especialmente sobre la línea Caco-2 (Tabla 19), su uso como quimioterápicos estaría descartado debido a su potencial toxicidad sobre los tejidos sanos.

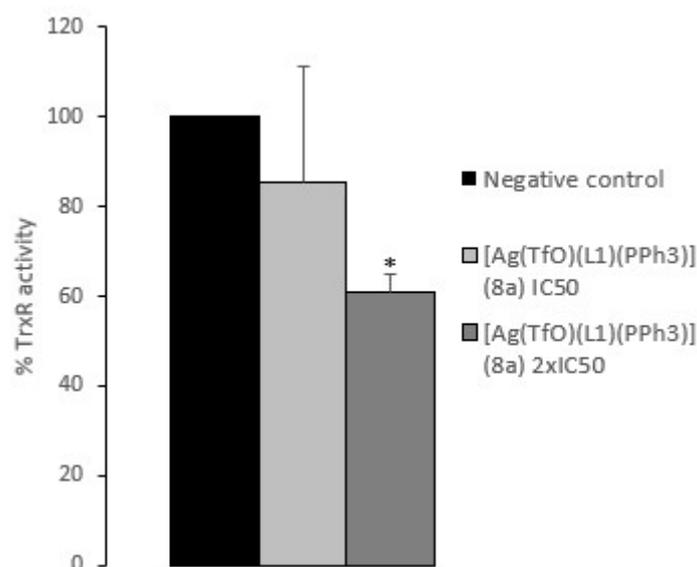
De entre los complejos que poseen índices de selectividad superiores a los de cisplatino y auranofin, se escogió a aquellos que, además, destacasen por su potencial antiproliferativo. Teniendo en cuenta, por lo tanto, los datos de las Tablas 19 y 21 de manera conjunta, los derivados más prometedores resultaron ser los complejos  $[\text{Au}(\text{L1})(\text{PPh}_3)](\text{TfO})$  (**7a**),  $[\text{Ag}(\text{TfO})(\text{L1})(\text{PPh}_3)]$  (**8a**),  $[\text{Ag}(\text{TfO})(\text{L2})]_2$  (**10b**) y  $[\text{Ag}(\text{TfO})(\text{L2})]_2$  (**11b**). No obstante, se optó por descartar a los dos derivados con el ligando **L2**, puesto que según se ha mencionado anteriormente, gran parte de su efecto biológico podría estar mediado por el ligando, siendo la coordinación al centro metálico una forma de reducir su toxicidad en tejidos sanos más que una estrategia para aumentar su acción antitumoral. Por consiguiente, en futuros ensayos solamente se tomarán en consideración los complejos **7a** y **8a**. Dado que ambos complejos son mononucleares y poseen un único ligando de tipo 2-anilino piridina, se aprovechó además para comparar

la eficacia del centro metálico en dos complejos que por lo demás son análogos. Es decir, se comparó el potencial anticancerígeno de un complejo de oro(I) con el de uno de plata(I).

**Tabla 21.** Estudio preliminar de la selectividad de los complejos de oro y plata mediante el cálculo del IC<sub>50</sub> tras 72h de exposición en células Caco-2 diferenciadas y la determinación del índice de selectividad a partir de los datos de IC<sub>50</sub> en células tumorales.

Complejo	IC <sub>50</sub> (μM) en Caco-2 diferenciadas	Índice de selectividad	
		Caco-2	MCF-7
<b>L1</b>	125,76 ± 13,43	1,26	7,21
[Au(L1)(PPh <sub>3</sub> )](TfO) ( <b>7a</b> )	39,40 ± 23,39	17,67	85,65
[Ag(TfO)(L1)(PPh <sub>3</sub> )] ( <b>8a</b> )	9,44 ± 2,12	1,71	1,31
[Ag <sub>2</sub> (TfO) <sub>2</sub> (L1)(PPh <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ] ( <b>9a</b> )	10,88 ± 2,82	43,52	2,65
[Ag(TfO)(L1)] <sub>2</sub> ( <b>10a</b> )	48,74 ± 10,01	6,50	-
[Ag(TfO)(L1)] <sub>2</sub> ( <b>11a</b> )	120,51 ± 11,52	11,79	7,73
<b>L2</b>	124,29 ± 7,50	2,56	9,96
[Au(L2)(PPh <sub>3</sub> )](TfO) ( <b>7b</b> )	13,53 ± 0,02	3,61	3,83
[Ag(TfO)(L2)(PPh <sub>3</sub> )] ( <b>8b</b> )	10,23 ± 4,02	1,44	1,52
[Ag <sub>2</sub> (TfO) <sub>2</sub> (L2)(PPh <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ] ( <b>9b</b> )	39,65 ± 19,06	2,75	5,34
[Ag(TfO)(L2)] <sub>2</sub> ( <b>10b</b> )	55,40 ± 1,43	41,97	20,91
[Ag(TfO)(L2)] <sub>2</sub> ( <b>11b</b> )	80,26 ± 26,90	19,02	89,18
<b>Cisplatino</b>	151,13 ± 58,12	3,31	3,61
<b>Auranofin</b>	6,21 ± 0,44	3,45	8,06

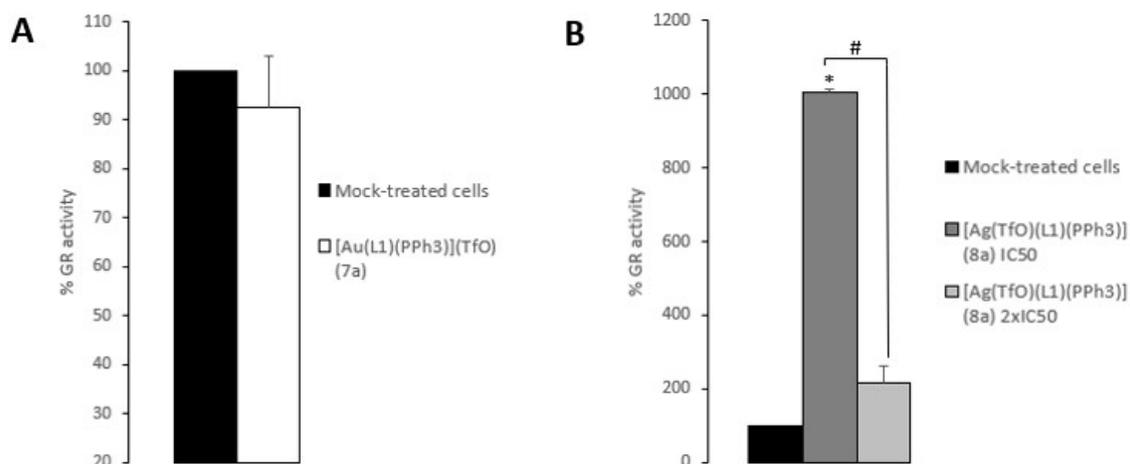
Puesto que ya se ha propuesto a la tioredoxina reductasa como potencial diana del complejo de oro **7a**, y existen algunas evidencias de que los derivados de plata podrían interactuar de manera similar con esta enzima<sup>25,41</sup>, se analizó la actividad de la TrxR de un cultivo de células Caco-2 tras 24h de incubación con el complejo de plata **8a**. Al no encontrarse ningún efecto sobre la función de la enzima tratando el cultivo con una cantidad equivalente al IC<sub>50</sub> del complejo (5 μM), se duplicó esta cantidad, obteniéndose entonces una reducción significativa (p<0,05) en la actividad enzimática (Figura 76).



**Figura 76.** Efecto de dos concentraciones de **8a** (IC<sub>50</sub>: 5  $\mu$ M y 2xIC<sub>50</sub>: 10  $\mu$ M) sobre la enzima TrxR de células Caco-2 tras 24h de incubación. \*p<0,05 vs control negativo.

Estos resultados parecen sugerir que el complejo [Ag(TfO)(L1)(PPh<sub>3</sub>)] (**8a**) es capaz de interactuar con la TrxR, si bien es necesario aumentar la cantidad del mismo en el cultivo para observar un efecto significativo. Esto podría sugerir que la TrxR no es la diana principal del complejo, sino que se interacciona con ella una vez que esta hipotética diana principal queda saturada. Por tanto, estos resultados no invalidarían los previamente encontrados por otros autores sobre enzimas recombinantes, ya que en efecto parece existir una cierta atracción entre los complejos de plata(I) y la tiorredoxina reductasa, aunque puede que no sea la diana molecular por la que sienten una mayor afinidad, de modo que es posible que la TrxR no sea la única diana de esta clase de complejos.

Si bien los resultados de Citta *et al.*<sup>41</sup> sugieren que los complejos de plata podrían ser inactivos frente a la enzima glutatión reductasa (GR), Lee *et al.*<sup>42</sup> observaron que la administración de nitrato de plata en la planta acuática *Lemna paucicostata* tenía un considerable efecto inhibitorio sobre dicha enzima. Aunque deberíamos basarnos en los resultados de Citta *et al.*<sup>41</sup>, ya que fueron obtenidos sobre un modelo tumoral, no puede ser descartada la existencia de una cierta afinidad entre los complejos de plata y la enzima GR notificada por Lee *et al.*<sup>42</sup>, lo que podría apuntar a esta proteína como una potencial diana de **8a**. Por lo tanto, se decidió evaluar la actividad de esta enzima en células Caco-2 tras 24h de incubación con los dos complejos de oro y plata **7a** y **8a** respectivamente (Figura 77). El complejo de oro **7a** fue incluido en el estudio para determinar si se trataba de un inhibidor específico de la TrxR o si, por el contrario, se trataba de un compuesto *multitarget*.

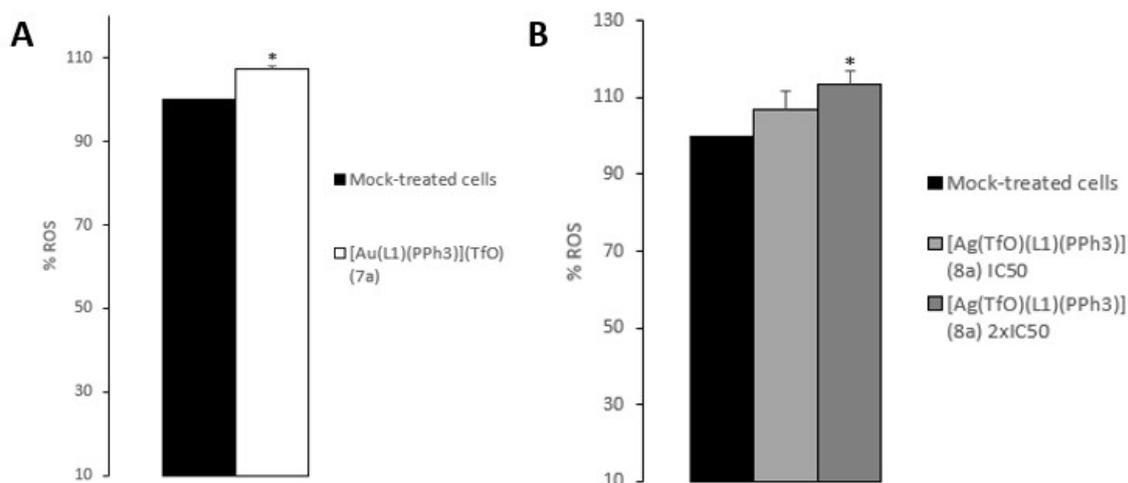


**Figura 77.** Análisis de la actividad GR de células Caco-2 tras 24h de incubación con los complejos de oro y plata. A) Efecto de **7a** (IC<sub>50</sub>). B) Efecto de **8a** (IC<sub>50</sub> y 2xIC<sub>50</sub>). \* $p < 0,05$  vs control negativo. # $p < 0,05$  vs IC<sub>50</sub>.

De acuerdo con los datos de la Figura 77A, el complejo [Au(L1)(PPh<sub>3</sub>)](TfO) (**7a**) parece ser un inhibidor selectivo de la TrxR, como es habitual para los complejos de oro(I) dada su alta afinidad por las selenoproteínas como la tiorredoxina reductasa<sup>43,44</sup>. En este caso, no se encuentra un aumento de la actividad GR para compensar el bloqueo de la tiorredoxina reductasa que sí se había observado en apartados anteriores de la presente memoria (ver Capítulo 3, pág. 212; Figura 69B).

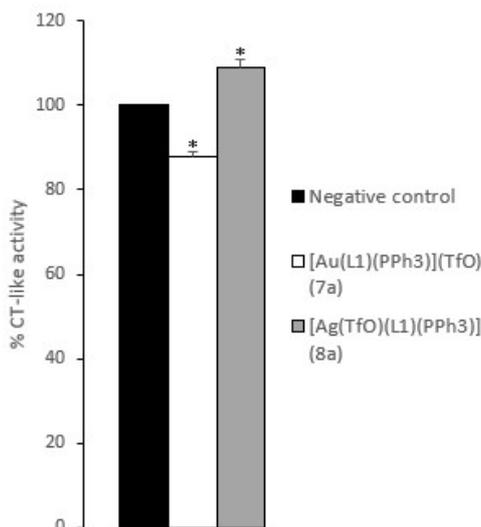
En cuanto al cultivo tratado con el complejo [Ag(TfO)(L1)(PPh<sub>3</sub>)] (**8a**), los resultados resultan sorprendentes (Figura 77B). Al incubar las células con una cantidad equivalente al IC<sub>50</sub> del derivado de plata, se observa un enorme incremento de la actividad de la enzima, que sufre una reducción al duplicar la cantidad de compuesto a añadir, recuperándose unos valores comparables a los del control negativo. Este aumento en la actividad de la GR podría corresponderse con un mecanismo de la célula tumoral para evitar el efecto antiapoptótico de **8a**, ya que la sobreexpresión de la GR se puede correlacionar con la resistencia a la quimioterapia<sup>45</sup>. Por otra parte, también puede producirse un aumento en los niveles de actividad de la GR sin necesidad de que aumente su nivel de expresión. Estos cambios son dependientes de los niveles de ROS y se cree que son parte de un mecanismo defensivo de la célula frente a un exceso de estrés oxidativo, siendo su misión principal mantener constantes los niveles de glutatión reducido para evitar la muerte celular<sup>46</sup>. En cualquier caso, al aumentar la concentración de **8a** tiene lugar una considerable pérdida en la actividad de la GR, hasta tal punto que no existen diferencias significativas respecto al control negativo. Puede suponerse que el posible efecto protector se perdería, quizá debido al bloqueo de otras macromoléculas clave para la célula tumoral, por ejemplo la TrxR (Figura 76). En cualquier caso, ninguna de las enzimas redox estudiadas hasta el momento parecen ser las dianas principales del derivado de plata(I) **8a**.

A la vista de los resultados obtenidos hasta el momento, se decidió analizar los niveles de ROS tras 1h de incubación con ambos complejos; del complejo **8a** se ensayaron las dos concentraciones ya probadas para medir las actividades enzimáticas. Tal y como cabía esperar, se observa un incremento significativo ( $p < 0,05$ ) de los niveles de ROS tras la incubación con el complejo de oro **7a**, siendo esta la consecuencia del bloqueo de la TrxR (Figura 78A). Por otra parte, el tratamiento con el IC<sub>50</sub> del complejo de plata **8a** no tiene ningún efecto sobre el equilibrio redox, si bien al duplicar la cantidad a añadir sí se obtiene un aumento significativo ( $p < 0,05$ ) respecto al control negativo (Figura 78B). De nuevo, estos resultados se correlacionan con los previamente obtenidos al analizar la actividad TrxR (Figura 76), ya que cuando se añade al cultivo una cantidad equivalente al IC<sub>50</sub> de **8a** no se observan cambios en la función de la enzima, no así al duplicar la concentración. Por otro lado, se descarta que el aumento en la actividad de la GR observado al tratar el cultivo con el IC<sub>50</sub> del derivado de plata esté motivado por un exceso de ROS, según se planteaba anteriormente<sup>46</sup>.



**Figura 78.** Medida de los niveles de ROS en células Caco-2 tras 1h de incubación con A) **7a** (IC<sub>50</sub>) o B) dos concentraciones de **8a** (IC<sub>50</sub> y 2xIC<sub>50</sub>). \* $p < 0,05$  vs control negativo.

Tras descartar a estas dos enzimas redox como principales dianas terapéuticas del complejo de plata **8a**, y observar que el complejo de oro **7a** podría actuar como un inhibidor selectivo de la TrxR, pasamos a investigar el posible papel del proteasoma en el efecto antiproliferativo de ambos compuestos. En el apartado 1.5 se ha mencionado la capacidad del auranofin de inhibir a las enzimas deubiquitinasas asociadas a la subunidad 19S del proteasoma<sup>47</sup>, de forma similar a lo descrito por Chen *et al.*<sup>32</sup> con una serie de nuevos derivados de plata. Sin embargo, también se ha descrito que existen derivados de oro capaces de inhibir a la subunidad 20S del proteasoma<sup>31,48</sup>. Por tanto, se decidió analizar la actividad quimotripsina del proteasoma, que se corresponde con su capacidad proteolítica, tras 24h de incubación con ambos complejos (Figura 79).

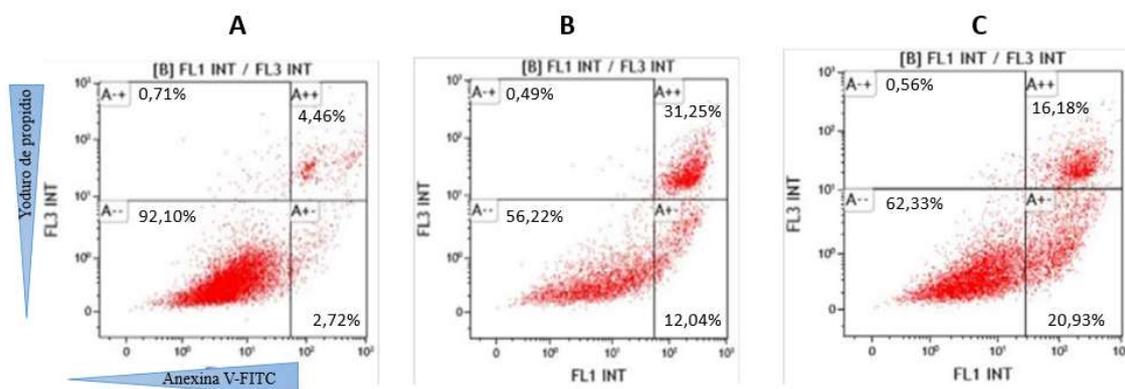


**Figura 79.** Efecto de 24h de incubación de los complejos **7a** y **8a** sobre la actividad quimotripsina (subunidad 20S) del proteasoma de células Caco-2. \* $p < 0,05$  vs control negativo.

De acuerdo con la Figura 79, puede observarse que el tratamiento con el complejo de oro **7a** induce un descenso significativo en la capacidad proteolítica del proteasoma, lo que se corresponde con una inhibición de su función normal. Por consiguiente, este derivado parece actuar como un compuesto **multitarget** capaz de inhibir tanto a la TrxR como a la subunidad 20S del proteasoma. Por el contrario, al tratar el cultivo con su análogo de plata no solo no se observa un descenso en la actividad proteasa de este orgánulo, sino que incluso se aprecia un aumento significativo ( $p < 0,05$ ) de la misma. Este incremento en la actividad del proteasoma podría causar a su vez el aumento en la actividad de la GR previamente mostrado en la Figura 77B, puesto que se ha recogido que la actividad proteasomal podría estar directamente relacionada con el estatus redox de la célula y causar un aumento en los niveles de expresión de la glutatión reductasa entre otras enzimas antioxidantes<sup>49</sup>. La Figura 79 permite, además, descartar que el derivado de plata cause su efecto antitumoral a través del bloqueo de la subunidad 20S del proteasoma. Estos resultados concordarían con los previamente obtenidos por Chen *et al.*<sup>32</sup>, según los cuales los complejos de plata parecen sentir una mayor afinidad por las deubiquitinasas asociadas al proteasoma que por la subunidad 20S. Por lo tanto, sigue sin tenerse clara la diana terapéutica con la que interacciona el complejo de plata para causar el descenso en la viabilidad celular observado.

A continuación, se estudió la capacidad de ambos complejos de inducir apoptosis en el cultivo de células Caco-2. Inicialmente, el tiempo de incubación se fijó en 24h, aunque no se obtuvo ningún resultado apreciable con el complejo de plata **8a**. Se podría haber optado por aumentar la concentración a añadir, de forma similar a como se había hecho para medir la actividad TrxR y GR, aunque en este caso se prefirió incrementar el tiempo de incubación hasta las 48h (Figura 80). El motivo tras esta decisión fue, precisamente, los cambios observados al aumentar la concentración del complejo en cuanto a su efecto sobre las enzimas redox. Aumentar la concentración de un fármaco para determinar su

afinidad por una proteína es una aproximación comparable a realizar un ensayo con enzimas recombinantes. Es decir, es una manera de “forzar” una interacción para obtener no tanto una idea del mecanismo de acción del complejo en concreto que se está ensayando, sino de otros derivados que compartan ciertas características con él. En este sentido, debe tenerse en cuenta que la afinidad de los complejos de plata por la tioredoxina puede ser limitada, pero no se puede negar su existencia. No obstante, al doblar la cantidad de compuesto que se añade al medio de cultivo podrían obtenerse, de igual manera, resultados “forzados” al bloquearse enzimas y vías que no lo harían de tratarse el cultivo con el IC<sub>50</sub> del compuesto. Teniendo en cuenta que el tipo de muerte celular puede ser determinante a la hora de escoger el tumor que mejor responda a un tratamiento concreto (por ejemplo, un fármaco capaz de inducir necroptosis sería adecuado para un tumor resistente a la apoptosis), nos pareció arriesgada la posibilidad de alterar estos resultados. Por ello, se aumentó el tiempo de exposición, ya que en casos anteriores esta estrategia había dado buenos resultados (ver Capítulo 3, pág. 217; Figura 72A).

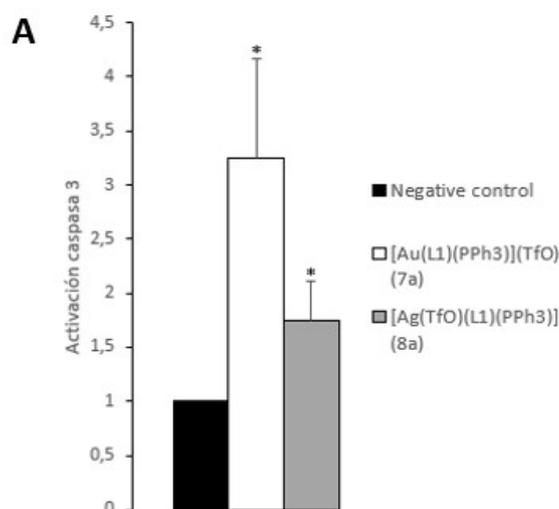


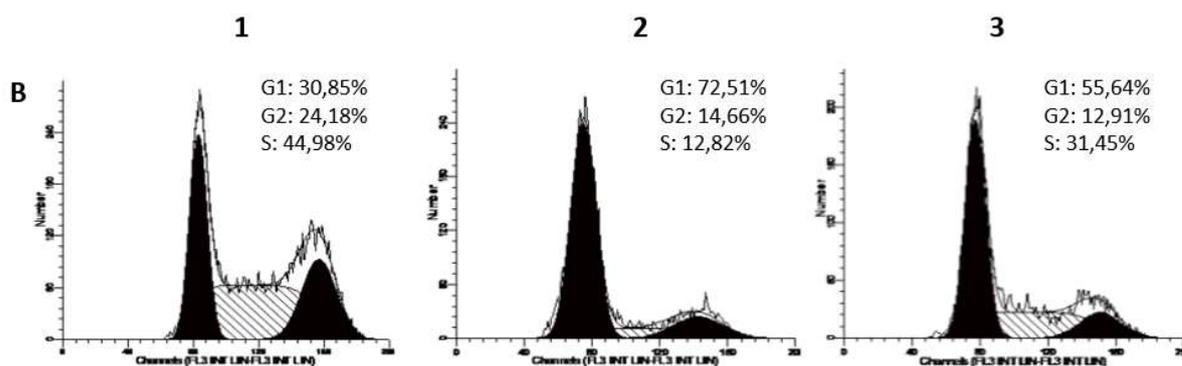
**Figura 80.** Estudio de las poblaciones apoptóticas y necróticas en un cultivo de células Caco-2 indiferenciadas tras 48h de tratamiento con A) DMSO (control negativo); B) **7a** (IC<sub>50</sub>); C) complejo **8a** (IC<sub>50</sub>).

Los resultados obtenidos muestran que ambos compuestos inducen un aumento de la población apoptótica tras 48h de incubación. En el caso del complejo de oro **7a** (Figura 80B), se observa un aumento de 4,4 veces en el porcentaje de células en apoptosis temprana, y de 7 veces en el de apoptosis tardía, mientras que el complejo de plata **8a** (Figura 80C) induce un aumento de 7,7 veces en el porcentaje de células en apoptosis temprana y de 3,6 veces en el de apoptosis tardía. Según se apuntaba anteriormente, el complejo de plata podría tardar más tiempo que su homólogo de oro en inducir la muerte del cultivo celular, lo que parece corroborar el hecho de que **7a** cause un aumento en la población de células en apoptosis tardías mientras que **8a** hace lo propio en las que se encuentran todavía en una fase temprana de esta clase de muerte. Por otra parte, ninguno de los complejos indujo cambios significativos en la población necrótica. Por lo tanto, los resultados mostrados en la Figura 80 sugieren que ambos compuestos inducen la muerte por apoptosis tras 48h de incubación. Para confirmarlo,

se analizaron otros dos parámetros estrechamente relacionados con la inducción de apoptosis.

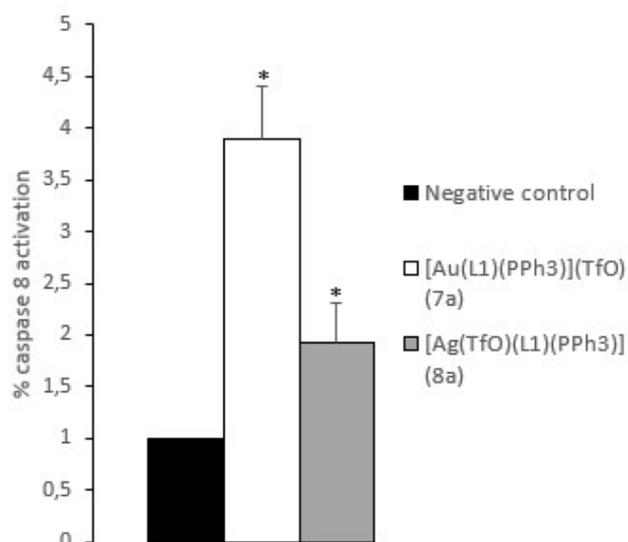
En primer lugar, se estudió la activación de la caspasa 3 tras 48h de incubación con ambos complejos en cantidades equivalentes a sus  $IC_{50}$ , encontrándose un aumento significativo ( $p < 0,05$ ) en ambos casos (Figura 81A). Dado que la activación de la caspasa ejecutora 3 supone la culminación del proceso apoptótico (ver apartado 1.2, pág. 36; Figura 7)<sup>50,51</sup>, y teniendo en cuenta los resultados previamente obtenidos con la doble tinción anexina V-FITC y yoduro de propidio (Figura 80), parece que ambos complejos son capaces de inducir la muerte de las células tumorales por apoptosis dependiente de caspasas. También se evaluó la progresión en el ciclo celular de los cultivos tratados con cada complejo durante 48h, dado que el daño celular severo se traduce en un cese en el avance y, por consiguiente, en un aumento de la población en una fase concreta<sup>52</sup>. Ambos complejos indujeron un aumento en el número de eventos en la fase  $G_1$  del ciclo celular, en detrimento de las fases  $G_2$  y S, siendo especialmente marcado el descenso de la población celular en la fase S tras el tratamiento con el complejo de oro **7a** (Figura 81B). Los datos mostrados en la Figura 81 parecen confirmar la capacidad de ambos derivados de inducir la muerte por apoptosis de las células Caco-2. Además, los dos marcadores apoptóticos analizados son más evidentes tras la incubación con **7a** que con su análogo **8a**; es decir, se aprecia una mayor tasa de activación de la caspasa 3 (Figura 81A) y una mayor proporción de la población celular detenida en la fase  $G_1$  (Figura 81B). Estos resultados están de acuerdo con los mostrados en la Figura 80, según los cuales se apuntaba a una mayor capacidad del complejo de oro de inducir la muerte por apoptosis que el complejo de plata.





**Figura 81.** Estudio de otros parámetros relacionados con el tipo de muerte celular. A) Medida de la activación de la caspasa 3 tras 48h de incubación con los complejos **7a** y **8a** (IC<sub>50</sub>). \*p<0,05 vs control negativo. B) Análisis de la progresión en el ciclo celular tras 48h de incubación con DMSO (control negativo; panel 1), **7a** (panel 2; IC<sub>50</sub>) o **8a** (panel 3; IC<sub>50</sub>).

Según se mencionaba en el apartado 1.2, existen dos posibles vías a través de las cuales se puede activar la caspasa 3 (ver apartado 1.2, pág. 36; Figura 7)<sup>53</sup>. Si bien hasta el momento se han analizado exclusivamente marcadores de la vía intrínseca, en el capítulo 3 se adelantaba la posibilidad de que el estudio de caspasa 3 y progresión en el ciclo celular no permitía concretar qué vía se estaba activando preferencialmente. Por otra parte, resultados obtenidos por Almeida *et al.*<sup>54</sup> sugieren que los complejos de plata podrían ser capaces de inducir la muerte por apoptosis a través de la activación de la vía extrínseca. Por lo tanto, nos pareció interesante medir la activación de la caspasa 8 tras 48h de incubación con el complejo de plata. El complejo de oro **7a** también fue incluido en el ensayo, ya que uno de los objetivos del capítulo era comparar el efecto antitumoral de complejos de oro y plata. En la Figura 82 puede observarse que la incubación con ambos complejos causaba un aumento significativo (p<0,05) en la activación de la caspasa 8.



**Figura 82.** Medida de la activación de la caspasa 8 tras 48h de incubación con **7a** y **8a** (IC<sub>50</sub>). \*p<0,05 vs control negativo.

Aunque la mayor parte de estudios relativos a la capacidad de los complejos de oro(I) de inducir apoptosis han apuntado a la activación de la vía intrínseca como principal responsable, existen algunas evidencias acerca de que el tratamiento con auranofin puede promover la activación de la caspasa 8, y, con ello, la activación de la vía extrínseca<sup>55,56</sup>. Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que todavía hay muchas incógnitas por resolver para caracterizar por completo el potencial antitumoral de los derivados de oro(I), siendo este un campo muy prometedor y que requiere futuras investigaciones, ya que la apoptosis extrínseca se inicia tradicionalmente por la unión a los receptores de muerte<sup>53,57</sup>. En este sentido, cabe plantearse la posibilidad de que el átomo de oro tenga afinidad por alguno de estos receptores de muerte, en cuyo caso ni siquiera sería necesaria su entrada en la célula tumoral para causar su muerte. Por otra parte, existe una segunda posibilidad, dado que se ha observado que niveles altos de ROS pueden contribuir a la activación de los receptores de muerte<sup>58</sup>. Dado el potencial típico de los derivados de oro(I), incluyendo al auranofin y al complejo **7a**, de generar niveles altos de ROS, esta podría ser la explicación más razonable a la activación de la caspasa 8 observada. No obstante, serán necesarios futuros ensayos para arrojar luz sobre esta y otras cuestiones todavía por resolver.

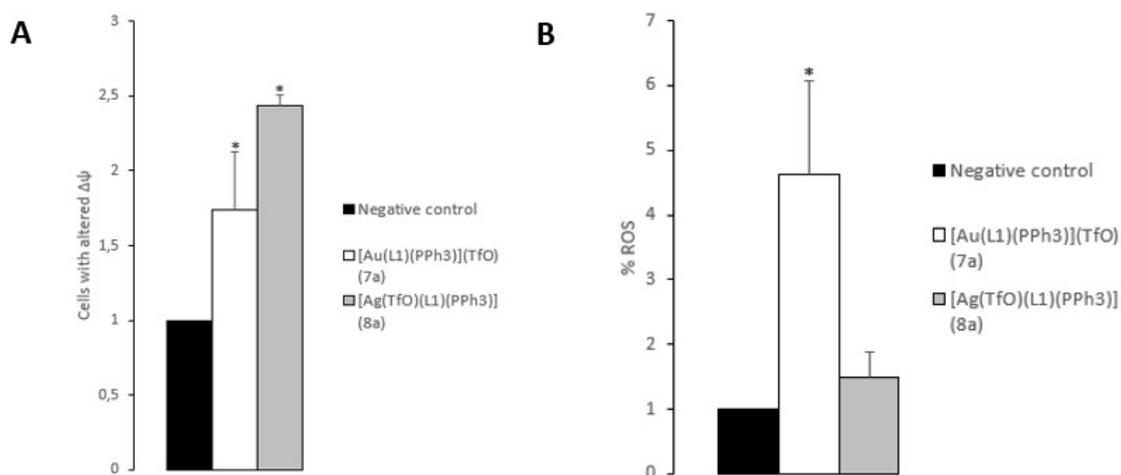
El caso del complejo de plata es incluso más interesante, puesto que parece que no existe relación entre la sobreproducción de ROS y la muerte celular, por lo que se descartaría que fuesen las ROS las responsables de activar a los receptores de muerte y, en consecuencia, a la caspasa 8. Dada la escasa información que se tiene hasta la fecha respecto al potencial antitumoral de la plata en comparación con otros metales, resulta complicado establecer una hipótesis de partida al respecto con los datos disponibles. Por el momento, la explicación más probable podría ser el hecho de que el complejo **8a** sí sea capaz de interactuar directamente con un receptor de muerte, aunque son necesarios estudios en profundidad para probarlo.

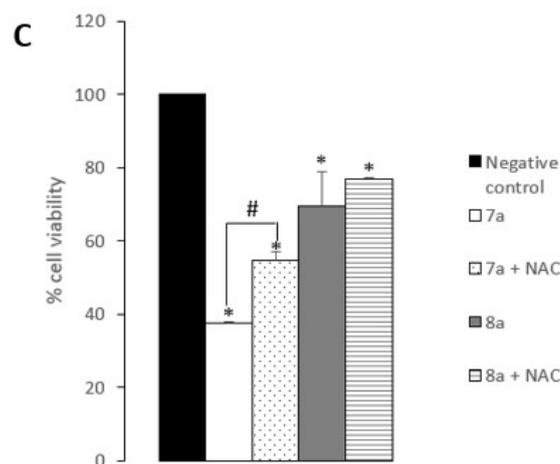
A continuación, se estudió el efecto del tratamiento con ambos complejos sobre el potencial de membrana mitocondrial. Tras 48h de incubación, se observó un aumento en la despolarización de la mitocondria en los dos casos (Figura 83A). De acuerdo a lo discutido anteriormente, un cambio significativo en el valor de  $\Delta\psi$  es considerado como un marcador apoptótico más, puesto que tanto en la vía extrínseca como en la intrínseca se forman poros en la membrana mitocondrial que derivan en una pérdida de su potencial de membrana (ver apartado 1.2; Figura 7)<sup>57,59</sup>. Por lo tanto, este resultado confirma los previamente obtenidos acerca de la capacidad de ambos complejos de inducir la muerte por apoptosis.

Resulta llamativo el hecho de que, si bien hasta el momento todos los marcadores apoptóticos estudiados se encontraban más incrementados tras el tratamiento con el

complejo de oro **7a**, en la Figura 83A puede observarse que la incubación con el complejo de plata **8a** induce una mayor despolarización de la mitocondria que su análogo de oro(I). De acuerdo con el trabajo llevado a cabo por Eloy *et al.*<sup>29</sup>, este dato podría estar altamente relacionado con su mecanismo de acción. Los autores observaron que una serie de derivados de plata(I) coordinados con ligandos de tipo carbeno inducían la muerte de las células tumorales mediante su acumulación en la mitocondria. Esto causaba un aumento en la permeabilidad de la membrana mitocondrial que daba lugar a la liberación del factor inductor de apoptosis (*Apoptosis-Inducing Factor*; AIF), proteína capaz de inducir la muerte por apoptosis sin necesidad de activar a las caspasas ejecutoras. Existen diferencias notables entre los resultados de Eloy *et al.* y los nuestros, ya que los autores no observaron activación de caspasas ni cambios en el ciclo celular, aunque de acuerdo con los datos mostrados en la Figura 83A cabría suponer que la mitocondria pudiera ser la principal diana del complejo de plata.

Otro dato interesante obtenido por Eloy *et al.*<sup>29</sup> es la ausencia de una ruptura del equilibrio redox en la despolarización de la membrana mitocondrial causada por sus derivados de plata(I). De acuerdo con los resultados de la Figura 83B, el tratamiento con el IC<sub>50</sub> del complejo [Ag(TfO)(L1)(PPh<sub>3</sub>)] (**8a**) no indujo ningún cambio en los niveles de ROS, a diferencia de lo que ocurría con su análogo [Au(L1)(PPh<sub>3</sub>)](TfO) (**7a**). Por consiguiente, se consideró interesante evaluar el efecto de las especies reactivas de oxígeno en la muerte inducida por ambos complejos. Para ello, se realizó un pre-tratamiento con el agente neutralizador de ROS N-acetil-cisteína (NAC) y posteriormente se analizó la viabilidad del cultivo tras 24h de incubación con ambos complejos en una cantidad equivalente a sus IC<sub>50</sub>. De acuerdo con los datos obtenidos, el uso de NAC revierte parcialmente el descenso en la viabilidad celular causada por el complejo de oro **7a**, aunque no se observa ningún efecto significativo cuando el cultivo es tratado con su análogo de plata (Figura 83C). Por lo tanto, estos resultados parecen indicar que, de acuerdo con el trabajo de Eloy *et al.*<sup>29</sup>, la muerte inducida por el derivado de plata **8a** es independiente de ROS.





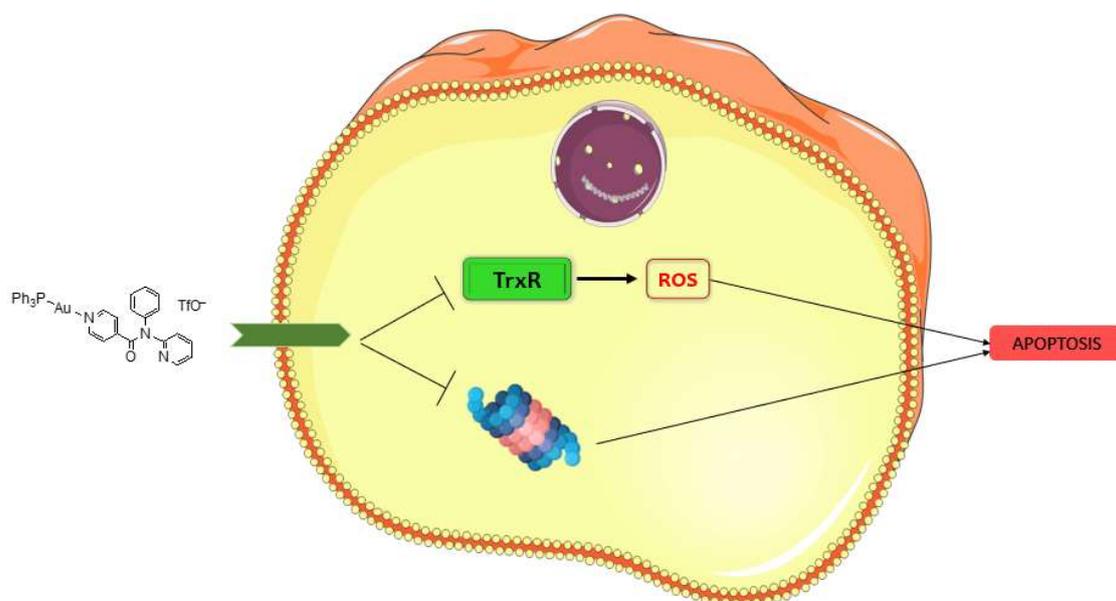
**Figura 83.** Estudio de la implicación de la función mitocondrial y las ROS en la muerte inducida por **7a** y **8a** ( $IC_{50}$ ). A) Análisis de la integridad del potencial de membrana mitocondrial tras 48h de incubación. \* $p < 0,05$  vs control negativo. B) Medida de la viabilidad celular tras 24h de incubación con los complejos en presencia o ausencia de NAC (30 mM, 1h). \* $p < 0,05$  vs control negativo. # $p < 0,05$  vs ausencia de NAC. C) Determinación de los niveles de ROS tras 24h de incubación con los complejos. \* $p < 0,05$  vs control negativo.

De acuerdo con la implicación de las especies reactivas de oxígeno en el proceso apoptótico, es posible distinguir entre apoptosis dependiente e independiente de ROS. En el caso de las células tumorales, debido a su delicado equilibrio redox, es frecuente que los fármacos quimioterapéuticos induzcan apoptosis dependiente de ROS, ya que es el exceso de radicales libres que se genera el responsable directo de la muerte celular. De acuerdo con lo mencionado en el Capítulo 1, un exceso de ROS genera daños en el ADN nuclear, lo que da lugar a un cese en la progresión en el ciclo celular y a la activación de p38, lo que a su vez se traduce en un aumento de la activación de la caspasa 9<sup>60,61</sup>. A pesar de su efectividad frente a las células tumorales, la inducción de apoptosis dependiente de ROS puede ser una espada de doble filo, puesto que los fármacos que la causan también pueden generar estrés oxidativo en los tejidos sanos. A modo de ejemplo, previamente se mencionaba que parte de los efectos secundarios del cisplatino parecen ser consecuencia del estrés oxidativo que induce en las regiones sanas del organismo<sup>62-64</sup>, por lo que el uso de antioxidantes podría paliar estos daños<sup>65,66</sup>. Es por ello que el desarrollo de nuevos fármacos capaces de inducir apoptosis independiente de ROS es una interesante nueva estrategia para el tratamiento de los tumores<sup>67</sup>.

De acuerdo con una revisión realizada por Ivanova *et al.*, la mayoría de los fármacos capaces de inducir apoptosis independiente de ROS afectan a vías de señalización claves para la supervivencia celular en lugar de a las macromoléculas como el DNA. Citan como ejemplo al análogo de la glucosa 2-desoxi-D-glucosa, un inhibidor de la glucólisis capaz de causar apoptosis independiente de ROS en algunos modelos tumorales al causar estrés en el retículo endoplasmático como consecuencia<sup>67,68</sup>. Otro posible mecanismo de acción consiste en la sobreexpresión de los sistemas de defensa antioxidante de la

célula, lo que da lugar a un descenso en los niveles basales de ROS. Puesto que los radicales libres son necesarios para la proliferación de las células tumorales<sup>69</sup>, reducir sus niveles tiene un efecto igualmente perjudicial para ellas. El fármaco antidiabético metformina es uno de los compuestos que ha manifestado esta capacidad sobre modelos tumorales, al favorecer un aumento de la actividad de la enzima superóxido dismutasa y causar apoptosis intrínseca independiente de ROS<sup>70</sup>. Es poco probable que esta segunda situación esté relacionada con el mecanismo de acción del complejo [Ag(TfO)(L1)(PPh<sub>3</sub>)] (**8a**), puesto que no se han encontrado diferencias significativas respecto al control negativo en cuanto a los niveles de ROS, y para suponer que se ha producido un aumento de la defensa antioxidante debería observarse un descenso (aunque sí se haya encontrado un aumento aparente en la actividad de la glutatión reductasa; Figura 79B). Por lo tanto, los resultados obtenidos hasta el momento sugieren que el efecto antitumoral de este derivado podría estar mediado por la inhibición de una ruta metabólica necesaria para la supervivencia de la célula tumoral, de una manera similar al mecanismo de acción de la 2-desoxi-D-glucosa. En este sentido, Allison *et al.*<sup>25</sup> describieron la acción de un nuevo derivado de plata de tipo biscarbano capaz de inhibir la glucólisis selectivamente en células tumorales. Aunque en su caso sí observaron un aumento en los niveles de ROS como consecuencia del tratamiento, sus resultados suponen una segunda evidencia a favor de que el mecanismo de acción de **8a** pueda estar relacionado con la inhibición de la glucólisis u otras rutas relacionadas. Serán necesarios futuros experimentos en este sentido para confirmar o descartar esta hipótesis.

En resumen, en el capítulo actual se ha constatado una vez más que los derivados de oro(I) pueden actuar como complejos *multitarget*, lo que los posiciona como una prometedora nueva herramienta quimioterapéutica. El complejo [Au(L1)(PPh<sub>3</sub>)](TfO) (**7a**) aquí estudiado, además de resultar interesante para el tratamiento del cáncer colorrectal, ha mostrado un importante efecto antiproliferativo sobre dos modelos de cáncer de mama, uno de ellos positivo para el receptor de estrógenos y el otro negativo. Estos datos sugieren que, además de las dos dianas terapéuticas identificadas en el presente estudio (tioredoxina reductasa y proteasoma), el complejo podría interactuar con alguna otra que sea especialmente relevante para la supervivencia del cáncer de mama. En cuanto al tipo de muerte inducida por el complejo, se ha observado un aumento en varios marcadores apoptóticos que sugieren que esta es la vía principal. Es destacable el hecho de que el tratamiento promueve la activación de la caspasa 8, lo que plantea la duda de si se induce exclusivamente la vía extrínseca o bien son activadas ambas vías al mismo tiempo. Se ha observado también que parte del efecto antiproliferativo está mediado por la generación de ROS, debido probablemente al bloqueo de la actividad de la tioredoxina reductasa. El mecanismo de acción de **7a** se encuentra resumido en la Figura 84.



**Figura 84.** Mecanismo de acción del complejo  $[\text{Au}(\text{L1})(\text{PPh}_3)](\text{TfO})$  (**7a**) sobre células Caco-2.

Por otra parte, se ha comparado el efecto de sustituir un átomo de oro por un átomo de plata en el centro metálico de un potencial agente antitumoral. En este caso concreto, se ha obtenido un efecto antiproliferativo mayor para el derivado de oro que para el de plata en términos de  $\text{IC}_{50}$ , y además se ha observado que el primero posee una mayor capacidad pro-apoptótica que el segundo. Por lo tanto, se ha concluido que el derivado de oro ensayado posee un mayor interés como potencial quimioterapéutico que su análogo de plata. Sin embargo, dados los resultados obtenidos no puede negarse el potencial de los derivados de plata como complejos anticancerígenos. A pesar de no haberse identificado su diana o dianas terapéuticas, los resultados preliminares sugieren que, al inducir apoptosis independiente de ROS, su impacto sobre los tejidos sanos podría ser bajo. Por lo tanto, parece que este complejo cumple el criterio de selectividad que es requisito imprescindible para los agentes quimioterapéuticos del futuro. De acuerdo con la literatura científica previa, la mitocondria y/o las deubiquitinasa asociadas a la subunidad 19S del proteasoma podrían ser sus dianas terapéuticas más probables, aunque serán necesarios futuros ensayos para poder confirmarlo.

Resulta interesante, además, el hecho de que los derivados de oro(I) y plata(I) podrían no compartir dianas terapéuticas, de acuerdo con los datos aquí mostrados. Esto podría ser de gran relevancia en cuanto a que los complejos de plata(I) podrían ser utilizados como quimioterapia de segunda elección en caso de que el tumor desarrollase resistencia a la terapia con oro(I), y viceversa. Por otro lado, este trabajo pone de manifiesto la necesidad de validar los resultados obtenidos al realizar ensayos de actividad enzimática utilizando proteínas recombinantes sobre modelos celulares, puesto que podrían obtenerse conclusiones poco acertadas. En este sentido, se ha propuesto a la tiorredoxina reductasa como una posible diana terapéutica de los derivados de plata, y si bien nuestros datos sugieren que, en efecto, los complejos de

plata(I) pueden llegar a inhibir la acción de dicha enzima, es necesario aumentar la concentración del mismo para poder observar este efecto en un ensayo sobre un cultivo celular. Por lo tanto, sería recomendable repetir todo ensayo realizado en un entorno celular sobre un modelo tumoral antes de darlos por válidos, lo que pone el foco sobre la importancia de los equipos de investigación multidisciplinarios para un adecuado avance de la investigación biomédica.

## REFERENCIAS

---

- (1) Zhang, Z.; Wang, H.; Yan, M.; Wang, H.; Zhang, C. Novel Copper Complexes as Potential Proteasome Inhibitors for Cancer Treatment (Review). *Mol. Med. Rep.* **2017**, *15* (1), 3–11. <https://doi.org/10.3892/mmr.2016.6022>.
- (2) Katarzyna M; Anna S; Zielinska-Blizniewska H; Ireneusz M. An Evaluation of the Antioxidant and Anticancer Properties of Complex Compounds of Copper (II), Platinum (II), Palladium (II) and Ruthenium (III) for Use in Cancer Therapy. *Mini Rev Med Chem.* **2018**, *18* (16), 1373–1381. <https://doi.org/doi: 10.2174/1389557518666180423145825>.
- (3) Simpson, P. V.; Desai, N. M.; Casari, I.; Massi, M.; Falasca, M. Metal-Based Antitumor Compounds: Beyond Cisplatin. *Future Med. Chem.* **2019**, *11* (2), 119–135. <https://doi.org/10.4155/fmc-2018-0248>.
- (4) Liang, X.; Luan, S.; Yin, Z.; He, M.; He, C.; Yin, L.; Zou, Y.; Yuan, Z.; Li, L.; Song, X.; Lv, C.; Zhang, W. Recent Advances in the Medical Use of Silver Complex. *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, *157*, 62–80. <https://doi.org/10.1016/J.EJMECH.2018.07.057>.
- (5) Liang, J.-X.; Zhong, H.-J.; Yang, G.; Vellaisamy, K.; Ma, D.-L.; Leung, C.-H. Recent Development of Transition Metal Complexes with in Vivo Antitumor Activity. *J. Inorg. Biochem.* **2017**, *177*, 276–286. <https://doi.org/10.1016/J.JINORGBIO.2017.06.002>.
- (6) Klasen, H. J. A Historical Review of the Use of Silver in the Treatment of Burns. II. Renewed Interest for Silver. *Burns* **2000**, *26* (2), 131–138. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0305-4179\(99\)00116-3](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0305-4179(99)00116-3).
- (7) Fox, C. L.; York, N. Silver Sulfadiazine--a New Topical Therapy for Pseudomonas in Burns. Therapy of Pseudomonas Infection in Burns. *Arch Surg* **1968**, *96* (2), 184–188.
- (8) Melaiye, A.; Youngs, W. J. Silver and Its Application as an Antimicrobial Agent. *Expert Opin. Ther. Pat.* **2005**, *15* (2), 125–130. <https://doi.org/10.1517/13543776.15.2.125>.
- (9) Lansdown, A. B. G. Silver in Health Care: Antimicrobial Effects and Safety in Use Interactions between Skin and Biofunctional Metals. *Curr Probl Dermatol. Basel, Karger* **2006**, *33*, 17–34.
- (10) Hartinger, C. G.; Dyson, P. J. Bioorganometallic Chemistry—from Teaching Paradigms to Medicinal Applications. *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38* (2), 391–401. <https://doi.org/10.1039/b707077m>.
- (11) Hussaini, S. Y.; Haque, R. A.; Razali, M. R. Recent Progress in Silver(I)-, Gold(I)/(III)- and Palladium(II)-N-Heterocyclic Carbene Complexes: A Review towards Biological Perspectives. *J. Organomet. Chem.* **2019**, *882*, 96–111. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jorganchem.2019.01.003>.
- (12) Johnson, N. A.; Southerland, M. R.; Youngs, W. J. Recent Developments in the Medicinal Applications of Silver-Nhc Complexes and Imidazolium Salts. *Molecules* **2017**, *22* (8), 1263. <https://doi.org/10.3390/molecules22081263>.
- (13) Liu, W.; Gust, R. Update on Metal N-Heterocyclic Carbene Complexes as Potential Anti-Tumor Metallodrugs. *Coord. Chem. Rev.* **2016**, *329*, 191–213. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ccr.2016.09.004>.
- (14) Hindi, K. M.; Panzner, M. J.; Tessier, C. A.; Cannon, C. L.; Youngs, W. J. The Medicinal

- Applications of Imidazolium Carbene-Metal Complexes. *Chem. Rev.* **2009**, *109* (8), 3859–3884. <https://doi.org/10.1021/cr800500u>.
- (15) Fourie, E.; Erasmus, E.; Swarts, J. C.; Tuchscherer, A.; Jakob, A.; Lang, H.; Joone, G. K.; Rensburg, C. E. J. Van. Cytotoxicity of Hydrophilic Silver Carboxylate Complexes. *Anticancer Res* **2012**, *32* (2), 519–522.
- (16) Liu, J. J.; Galettis, P.; Farr, A.; Maharaj, L.; Samarasinha, H.; McGechan, A. C.; Baguley, B. C.; Bowen, R. J.; Berners-Price, S. J.; McKeage, M. J. In Vitro Antitumour and Hepatotoxicity Profiles of Au(I) and Ag(I) Bidentate Pyridyl Phosphine Complexes and Relationships to Cellular Uptake. *J. Inorg. Biochem.* **2008**, *102* (2), 303–310. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2007.09.003>.
- (17) Santini, C.; Pellei, M.; Papini, G.; Morresi, B.; Galassi, R.; Ricci, S.; Tisato, F.; Porchia, M.; Rigobello, M. P.; Gandin, V.; Marzano, C. In Vitro Antitumour Activity of Water Soluble Cu(I), Ag(I) and Au(I) Complexes Supported by Hydrophilic Alkyl Phosphine Ligands. *J. Inorg. Biochem.* **2011**, *105* (2), 232–240. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2010.10.016>.
- (18) Abbehausen, C.; Heinrich, T. A.; Abrão, E. P.; Costa-Neto, C. M.; Lustri, W. R.; Formiga, A. L. B.; Corbi, P. P. Chemical, Spectroscopic Characterization, DFT Studies and Initial Pharmacological Assays of a Silver(I) Complex with N-Acetyl-L-Cysteine. *Polyhedron* **2011**, *30* (4), 579–583. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.poly.2010.11.025>.
- (19) Cardoso, J. M. S.; Correia, I.; Galvão, A. M.; Marques, F.; Carvalho, M. F. N. N. Synthesis of Ag(I) Camphor Sulphonylimine Complexes and Assessment of Their Cytotoxic Properties against Cisplatin-Resistant A2780cisR and A2780 Cell Lines. *J. Inorg. Biochem.* **2017**, *166*, 55–63. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2016.11.003>.
- (20) Zaehariadis, P. C.; Hadjikakou, S. K.; Hadjiliadis, N.; Skoulika, S.; Michaelides, A.; Balzarini, J.; De Clercq, E. Synthesis, Characterization and in Vitro Study of the Cytostatic and Antiviral Activity of New Polymeric Silver(I) Complexes with Ribbon Structures Derived from the Conjugated Heterocyclic Thioamide 2-Mercapto-3,4,5,6-Tetrahydropyrimidine. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2004**, No. 7, 1420–1426. <https://doi.org/10.1002/ejic.200300672>.
- (21) Ciol, M. R.; Manzano, C. M.; Cuin, A.; Pavan, F. R.; Ribeiro, C. M.; Ruiz, A. L. T. G.; de Oliveira, E. C. S.; Lustri, W. R.; Fregonezi, N. F.; Nogueira, F. A. R.; Corbi, P. P. A Silver Complex with Cycloserine: Synthesis, Spectroscopic Characterization, Crystal Structure and In Vitro Biological Studies. *ChemistrySelect* **2018**, *3* (6), 1719–1726. <https://doi.org/10.1002/slct.201703078>.
- (22) Abdelghay, A. M.; Zaky, R. R. Synthesis, Characterization and Anticancerous Properties of Mixed Ligand Pd(II) and Ag(I) Complexes with 2-Amino-7-Oxo-4, 5, 6, 7-Tetrahydrobenzo[b]Thiophene-3-Carbonitrile and 2,2'-Bipyridyl. *Inorg. Chem. An Indian J.* **2010**, *6* (1), 15–22.
- (23) Poyraz, M.; Banti, C. N.; Kourkoumelis, N.; Dokorou, V.; Manos, M. J.; Simčič, M.; Golič-Grdadolnik, S.; Mavromoustakos, T.; Giannoulis, A. D.; Verginadis, I. I.; Charalabopoulos, K.; Hadjikakou, S. K. Synthesis, Structural Characterization and Biological Studies of Novel Mixed Ligand Ag(I) Complexes with Triphenylphosphine and Aspirin or Salicylic Acid. *Inorganica Chim. Acta* **2011**, *375* (1), 114–121. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ica.2011.04.032>.
- (24) Carvalho, M. F. N. N.; Botelho do Rego, A. M.; Galvão, A. M.; Herrmann, R.; Marques, F. Search for Cytotoxic Compounds against Ovarian Cancer Cells: Synthesis, Characterization and Assessment of the Activity of New Camphor Carboxylate and

- Camphor Carboxamide Silver Complexes. *J. Inorg. Biochem.* **2018**, *188*, 88–95. <https://doi.org/10.1016/J.JINORGBIO.2018.08.011>.
- (25) Allison, S. J.; Sadiq, M.; Baronou, E.; Cooper, P. A.; Dunnill, C.; Georgopoulos, N. T.; Latif, A.; Shepherd, S.; Shnyder, S. D.; Stratford, I. J.; Wheelhouse, R. T.; Willans, C. E.; Phillips, R. M. Preclinical Anti-Cancer Activity and Multiple Mechanisms of Action of a Cationic Silver Complex Bearing N-Heterocyclic Carbene Ligands. *Cancer Lett.* **2017**, *403*, 98–107. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2017.04.041>.
- (26) Pellei, M.; Gandin, V.; Marinelli, M.; Orsetti, A.; Del Bello, F.; Santini, C.; Marzano, C. Novel Triazolium Based 11th Group NHCs: Synthesis, Characterization and Cellular Response Mechanisms. *Dalt. Trans.* **2015**, *44* (48), 21041–21052. <https://doi.org/10.1039/c5dt02934a>.
- (27) Sanchez, O.; González, S.; Fernández, M.; Higuera-Padilla, A. R.; Leon, Y.; Coll, D.; Vidal, A.; Taylor, P.; Urdanibia, I.; Goite, M. C.; Castro, W. Novel Silver(I)– and Gold(I)–N-Heterocyclic Carbene Complexes. Synthesis, Characterization and Evaluation of Biological Activity against Tumor Cells. *Inorganica Chim. Acta* **2015**, *437*, 143–151. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ica.2015.08.017>.
- (28) Banti, C. N.; Giannoulis, A. D.; Kourkoumelis, N.; Owczarzak, A. M.; Poyraz, M.; Kubicki, M.; Charalabopoulos, K.; Hadjikakou, S. K. Mixed Ligand-Silver(I) Complexes with Anti-Inflammatory Agents Which Can Bind to Lipoxygenase and Calf-Thymus DNA, Modulating Their Function and Inducing Apoptosis. *Metallomics* **2012**, *4* (6), 545–560. <https://doi.org/10.1039/c2mt20039b>.
- (29) Eloy, L.; Jarrousse, A. S.; Teyssot, M. L.; Gautier, A.; Morel, L.; Jolival, C.; Cresteil, T.; Roland, S. Anticancer Activity of Silver-N-Heterocyclic Carbene Complexes: Caspase-Independent Induction of Apoptosis via Mitochondrial Apoptosis-Inducing Factor (AIF). *ChemMedChem* **2012**, *7* (5), 805–814. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201200055>.
- (30) Ceramella, J.; Mariconda, A.; Iacopetta, D.; Saturnino, C.; Barbarossa, A.; Caruso, A.; Rosano, C.; Sinicropi, M. S.; Longo, P. From Coins to Cancer Therapy: Gold, Silver and Copper Complexes Targeting Human Topoisomerases. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2020**, *30* (3), 126905. <https://doi.org/10.1016/J.BMCL.2019.126905>.
- (31) Quero, J.; Cabello, S.; Fuertes, T.; Mármol, I.; Laplaza, R.; Polo, V.; Gimeno, M. C.; Rodríguez-Yoldi, M. J.; Cerrada, E. Proteasome versus Thioredoxin Reductase Competition as Possible Biological Targets in Antitumor Mixed Thiolate-Dithiocarbamate Gold(III) Complexes. *Inorg. Chem.* **2018**, *57* (17), 10832–10845. <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.8b01464>.
- (32) Chen, X.; Yang, Q.; Chen, J.; Zhang, P.; Huang, Q.; Zhang, X.; Yang, L.; Xu, D.; Zhao, C.; Wang, X.; Liu, J. Inhibition of Proteasomal Deubiquitinase by Silver Complex Induces Apoptosis in Non-Small Cell Lung Cancer Cells. *Cell. Physiol. Biochem.* **2018**, *49* (2), 780–797. <https://doi.org/10.1159/000493041>.
- (33) Mármol, I.; Virumbrales-Muñoz, M.; Quero, J.; Sánchez-de-Diego, C.; Fernández, L.; Ochoa, I.; Cerrada, E.; Yoldi, M. J. R. Alkynyl Gold(I) Complex Triggers Necroptosis via ROS Generation in Colorectal Carcinoma Cells. *J. Inorg. Biochem.* **2017**, *176*, 123–133. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2017.08.020>.
- (34) González-Barcia, L. M.; Fernández-Fariña, S.; Rodríguez-Silva, L.; Bermejo, M. R.; González-Noya, A. M.; Pedrido, R. Comparative Study of the Antitumoral Activity of Phosphine-Thiosemicarbazone Gold(I) Complexes Obtained by Different Methodologies. *J. Inorg. Biochem.* **2020**, *203*, 110931.

<https://doi.org/10.1016/J.JINORGBIO.2019.110931>.

- (35) Sâmia, L. B. P.; Parrilha, G. L.; Da Silva, J. G.; Ramos, J. P.; Souza-Fagundes, E. M.; Castelli, S.; Vutey, V.; Desideri, A.; Beraldo, H. Metal Complexes of 3-(4-Bromophenyl)-1-Pyridin-2-Ylprop-2-En-1-One Thiosemicarbazone: Cytotoxic Activity and Investigation on the Mode of Action of the Gold(III) Complex. *BioMetals* **2016**, *29* (3), 515–526. <https://doi.org/10.1007/s10534-016-9933-5>.
- (36) Labunskyy, V. M.; Hatfield, D. L.; Gladyshev, V. N. Selenoproteins: Molecular Pathways and Physiological Roles. *Physiol. Rev.* **2014**, *94* (3), 739–777. <https://doi.org/10.1152/physrev.00039.2013>.
- (37) Mahmood, D. F. D.; Abderrazak, A.; El Hadri, K.; Simmet, T.; Rouis, M. The Thioredoxin System as a Therapeutic Target in Human Health and Disease. *Antioxidants Redox Signal.* **2013**, *19* (11), 1266–1303. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.4757>.
- (38) Cañas, A.; López-Sánchez, L. M.; Valverde-Esteba, A.; Hernández, V.; Fuentes, E.; Muñoz-Castañeda, J. R.; López-Pedreira, C.; De La Haba-Rodríguez, J. R.; Aranda, E.; Rodríguez-Ariza, A. Maintenance of S-Nitrosothiol Homeostasis Plays an Important Role in Growth Suppression of Estrogen Receptor-Positive Breast Tumors. *Breast Cancer Res.* **2012**, *14* (6), R153. <https://doi.org/10.1186/bcr3366>.
- (39) Oxenhandler, R. W.; Mccune, R.; Subtelney, A.; Truelove, C.; Tyrer, H. W. Flow Cytometric Determination of Estrogen Receptors in Intact Cells. *Cancer Re* **1984**, *44* (6), 2516–2523.
- (40) Kim, N. H.; Park, H. J.; Oh, M. K.; Kim, I. S. Antiproliferative Effect of Gold(I) Compound Auranofin through Inhibition of STAT3 and Telomerase Activity in MDA-MB 231 Human Breast Cancer Cells. *BMB Rep.* **2013**, *46* (1), 59–64. <https://doi.org/10.5483/BMBRep.2013.46.1.123>.
- (41) Citta, A.; Schuh, E.; Mohr, F.; Folda, A.; Massimino, M. L.; Bindoli, A.; Casini, A.; Rigobello, M. P. Fluorescent Silver(i) and Gold(i)-N-Heterocyclic Carbene Complexes with Cytotoxic Properties: Mechanistic Insights. *Metallomics* **2013**, *5* (8), 1006–1015. <https://doi.org/10.1039/c3mt20260g>.
- (42) Lee, Y.; Kim, H.; Kim, S.; Park, A.; Kim, Y. J.; Han, T.; Choi, E. M. The Effects of Silver and Arsenic on Antioxidant System in Lemna Paucicostata: Different Effects on Glutathione System. *Toxicol. Environ. Health Sci.* **2016**, *8* (5), 332–340. <https://doi.org/10.1007/s13530-016-0294-9>.
- (43) Gandin, V.; Fernandes, A. P.; Rigobello, M. P.; Dani, B.; Sorrentino, F.; Tisato, F.; Björnstedt, M.; Bindoli, A.; Sturaro, A.; Rella, R.; Marzano, C. Cancer Cell Death Induced by Phosphine Gold(I) Compounds Targeting Thioredoxin Reductase. *Biochem. Pharmacol.* **2010**, *79* (2), 90–101. <https://doi.org/10.1016/J.BCP.2009.07.023>.
- (44) Vergara, E.; Casini, A.; Sorrentino, F.; Zava, O.; Cerrada, E.; Rigobello, M. P.; Bindoli, A.; Laguna, M.; Dyson, P. J. Anticancer Therapeutics That Target Selenoenzymes: Synthesis, Characterization, in Vitro Cytotoxicity, and Thioredoxin Reductase Inhibition of a Series of Gold(I) Complexes Containing Hydrophilic Phosphine Ligands. *ChemMedChem* **2010**, *5* (1), 96–102. <https://doi.org/10.1002/cmdc.200900370>.
- (45) Zhu, Z.; Du, S.; Du, Y.; Ren, J.; Ying, G.; Yan, Z. Glutathione Reductase Mediates Drug Resistance in Glioblastoma Cells by Regulating Redox Homeostasis. *J. Neurochem.* **2018**, *144* (1), 93–104. <https://doi.org/10.1111/jnc.14250>.
- (46) Frasier, C. R.; Moukdar, F.; Patel, H. D.; Sloan, R. C.; Stewart, L. M.; Alleman, R. J.; La Favor,

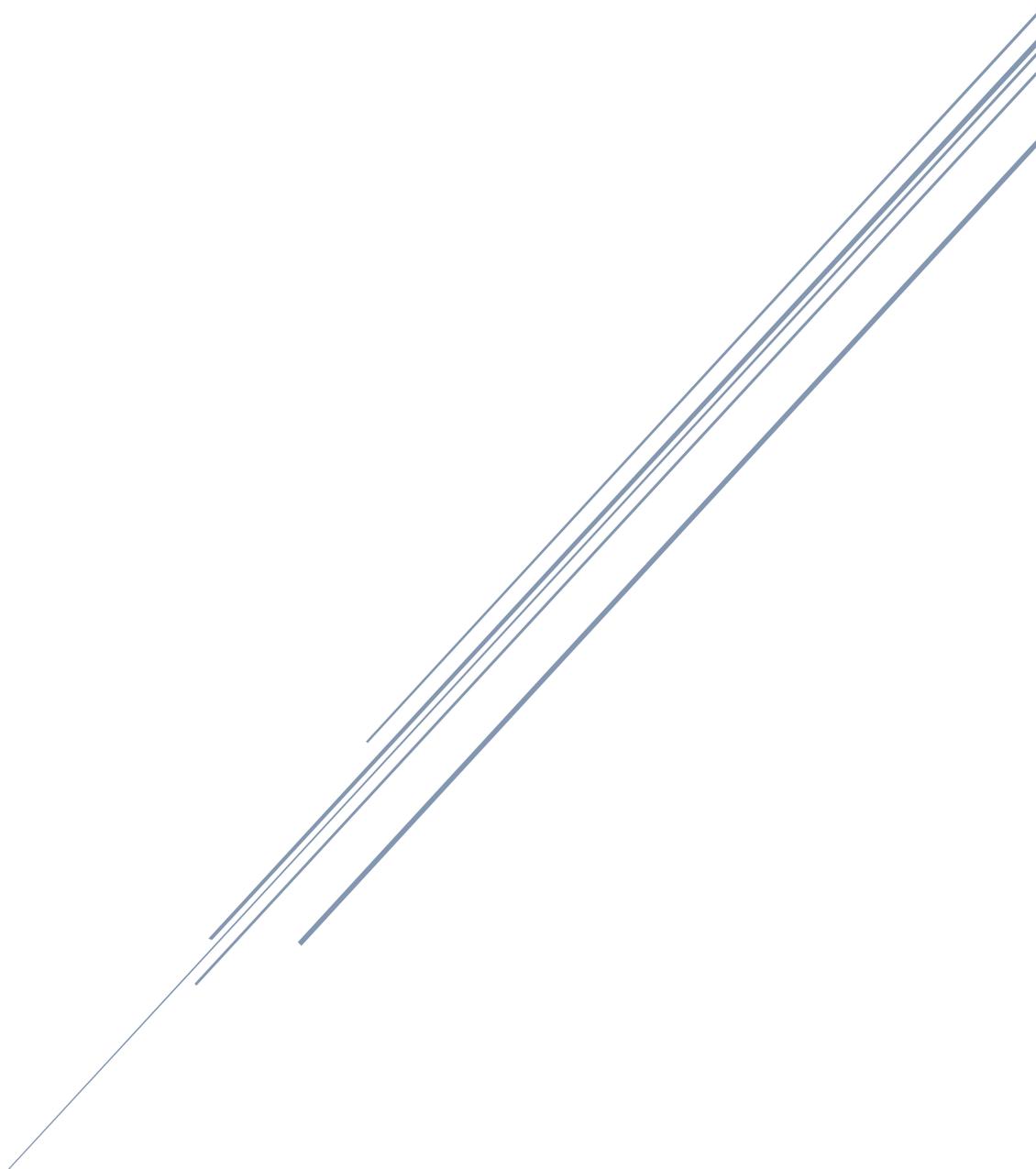
- J. D.; Brown, D. A. Redox-Dependent Increases in Glutathione Reductase and Exercise Preconditioning: Role of NADPH Oxidase and Mitochondria. *Cardiovasc. Res.* **2013**, *98* (1), 47–55. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvt009>.
- (47) Liu, N.; Li, X.; Huang, H.; Zhao, C.; Liao, S.; Yang, C.; Liu, S.; Song, W.; Lu, X.; Lan, X.; Chen, X.; Yi, S.; Xu, L.; Jiang, L.; Zhao, C.; Dong, X.; Zhou, P.; Li, S.; Wang, S.; Shi, X.; Dou, P. Q.; Wang, X.; Liu, J. Clinically Used Antirheumatic Agent Auranofin Is a Proteasomal Deubiquitinase Inhibitor and Inhibits Tumor Growth. *Oncotarget* **2014**, *5* (14), 5453–5471. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.2113>.
- (48) Zhang, X.; Frezza, M.; Milacic, V.; Ronconi, L.; Fan, Y.; Bi, C.; Fregona, D.; Dou, Q. P. Inhibition of Tumor Proteasome Activity by Gold-Dithiocarbamate Complexes via Both Redox-Dependent and -Independent Processes. *J. Cell. Biochem.* **2010**, *109* (1), 162–172. <https://doi.org/10.1002/jcb.22394>.
- (49) Alva, N.; Panisello-Roselló, A.; Flores, M.; Roselló-Catafau, J.; Carbonell, T. Ubiquitin-Proteasome System and Oxidative Stress in Liver Transplantation. *World J Gastroenterol* **2018**, *24* (31), 3521–3530. <https://doi.org/10.3748/wjg.v24.i31.3521>.
- (50) Xu, X.; Lai, Y.; Hua, Z. C. Apoptosis and Apoptotic Body: Disease Message and Therapeutic Target Potentials. *Biosci. Rep.* **2019**, *39* (1), BSR20180992. <https://doi.org/10.1042/BSR20180992>.
- (51) Saraste, A.; Pulkki, K. Morphologic and Biochemical Hallmarks of Apoptosis. *Cardiovasc. Res.* **2000**, *45* (3), 528–537.
- (52) Chen, J. The Cell-Cycle Arrest and Apoptotic Functions of P53 in Tumor Initiation and Progression. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2016**, *6* (3), a026104. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a026104>.
- (53) Tummers, B.; Green, D. R. Caspase-8: Regulating Life and Death. *Immunol. Rev.* **2017**, *277* (1), 76–89. <https://doi.org/10.1111/imr.12541>.
- (54) Almeida, J.; Roma-Rodrigues, C.; Mahmoud, A. G.; Guedes da Silva, M. F. C.; Pombeiro, A. J. L.; Martins, L. M. D. R. S.; Baptista, P. V.; Fernandes, A. R. Structural Characterization and Biological Properties of Silver(I) Tris(Pyrazolyl)Methane Sulfonate. *J. Inorg. Biochem.* **2019**, *199*, 110789. <https://doi.org/10.1016/J.JINORGBIO.2019.110789>.
- (55) Park, S. J.; Kim, I. S. The Role of P38 MAPK Activation in Auranofin-Induced Apoptosis of Human Promyelocytic Leukaemia HL-60 Cells. *Br. J. Pharmacol.* **2005**, *146* (4), 506–513. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0706360>.
- (56) Park, N.; Chun, Y. J. Auranofin Promotes Mitochondrial Apoptosis by Inducing Annexin A5 Expression and Translocation in Human Prostate Cancer Cells. *J. Toxicol. Environ. Heal. - Part A Curr. Issues* **2014**, *77*, 1467–1476. <https://doi.org/10.1080/15287394.2014.955834>.
- (57) D’Arcy, M. S. Cell Death: A Review of the Major Forms of Apoptosis, Necrosis and Autophagy. *Cell Biol. Int.* **2019**, *43* (6), 582–592. <https://doi.org/10.1002/cbin.11137>.
- (58) Redza-Dutordoir, M.; Averill-Bates, D. A. Activation of Apoptosis Signalling Pathways by Reactive Oxygen Species. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **2016**, *1863* (12), 2977–2992. <https://doi.org/10.1016/J.BBAMCR.2016.09.012>.
- (59) Hassan, M.; Watari, H.; Abualmaaty, A.; Ohba, Y.; Sakuragi, N. Apoptosis and Molecular Targeting Therapy in Cancer. *Biomed. Res. Int.* **2014**, *2014*, 150845. <https://doi.org/10.1155/2014/150845>.

- (60) Wang, J. N.; Zhang, Z. R.; Che, Y.; Yuan, Z. Y.; Lu, Z. L.; Li, Y.; Li, N.; Wan, J.; Sun, H. D.; Sun, N.; Puno, P. T.; He, J. Acetyl-Macrocalin B, an Ent-Kaurane Diterpenoid, Initiates Apoptosis through the ROS-P38-Caspase 9-Dependent Pathway and Induces G2/M Phase Arrest via the Chk1/2-Cdc25C-Cdc2/Cyclin B Axis in Non-Small Cell Lung Cancer. *Cancer Biol. Ther.* **2018**, *19* (7), 609–621. <https://doi.org/10.1080/15384047.2018.1449613>.
- (61) Kang, N.; Jian, J. feng; Cao, S. jie; Zhang, Q.; Mao, Y. wei; Huang, Y. yuan; Peng, Y. fei; Qiu, F.; Gao, X. mei. Physalin A Induces G2/M Phase Cell Cycle Arrest in Human Non-Small Cell Lung Cancer Cells: Involvement of the P38 MAPK/ROS Pathway. *Mol. Cell. Biochem.* **2016**, *415* (1–2), 145–155. <https://doi.org/10.1007/s11010-016-2686-1>.
- (62) Ozkok, A.; Edelstein, C. L. Pathophysiology of Cisplatin-Induced Acute Kidney Injury. *Biomed Res. Int.* **2014**, *2014*, 967826. <https://doi.org/10.1155/2014/967826>.
- (63) Soni, K. K.; Kim, H. K.; Choi, B. R.; Karna, K. K.; You, J. H.; Cha, J. S.; Shin, Y. S.; Lee, S. W.; Kim, C. Y.; Park, J. K. Dose-Dependent Effects of Cisplatin on the Severity of Testicular Injury in Sprague Dawley Rats: Reactive Oxygen Species and Endoplasmic Reticulum Stress. *Drug Des. Devel. Ther.* **2016**, *10*, 3959–3968. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S120014>.
- (64) Stojic, I. M.; Zivkovic, V. I.; Srejovic, I. M.; Nikolic, T. R.; Jeremic, N. S.; Jeremic, J. N.; Djuric, D. M.; Jovicic, N.; Radonjic, K. G.; Bugarcic, Z. D.; Jakovljevic, V. L. J.; Novokmet, S. S. Cisplatin and Cisplatin Analogues Perfusion through Isolated Rat Heart: The Effects of Acute Application on Oxidative Stress Biomarkers. *Mol. Cell. Biochem.* **2018**, *439* (1–2), 19–33. <https://doi.org/10.1007/s11010-017-3132-8>.
- (65) Brahmi, D.; Ayed, Y.; Hfaiedh, M.; Bouaziz, C.; Mansour, H. Ben; Zourgui, L.; Bacha, H. Protective Effect of Cactus Cladode Extract against Cisplatin Induced Oxidative Stress, Genotoxicity and Apoptosis in Balb/c Mice: Combination with Phytochemical Composition. *BMC Complement. Altern. Med.* **2012**, *12*, 111. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-12-111>.
- (66) Rjeibi, I.; Feriani, A.; Saad, A. Ben; Sdayria, J.; Saidi, I.; Ncib, S.; Souid, S.; Allagui, M. S.; Hfaiedh, N. Lycium Europaeum Extract: A New Potential Antioxidant Source against Cisplatin-Induced Liver and Kidney Injuries in Mice. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2018**, *2018*, 1630751. <https://doi.org/10.1155/2018/1630751>.
- (67) Ivanova, D.; Zhelev, Z.; Semkova, S.; Aoki, I.; Bakalova, R. Resveratrol Modulates the Redox-Status and Cytotoxicity of Anticancer Drugs by Sensitizing Leukemic Lymphocytes and Protecting Normal Lymphocytes. *Anticancer Res.* **2019**, *39* (7), 3745–3755. <https://doi.org/10.21873/anticancer.13523>.
- (68) Maximchik, P.; Abdrakhmanov, A.; Inozemtseva, E.; Tyurin-Kuzmin, P. A.; Zhivotovsky, B.; Gogvadze, V. 2-Deoxy-D-Glucose Has Distinct and Cell Line-Specific Effects on the Survival of Different Cancer Cells upon Antitumor Drug Treatment. *FEBS J.* **2018**, *285* (24), 4590–4601. <https://doi.org/10.1111/febs.14687>.
- (69) Moloney, J. N.; Cotter, T. G. ROS Signalling in the Biology of Cancer. *Semin. Cell Dev. Biol.* **2018**, *80*, 50–64. <https://doi.org/10.1016/J.SEMCDB.2017.05.023>.
- (70) Sharma, P.; Kumar, S. Metformin Inhibits Human Breast Cancer Cell Growth by Promoting Apoptosis via a ROS-Independent Pathway Involving Mitochondrial Dysfunction: Pivotal Role of Superoxide Dismutase (SOD). *Cell. Oncol.* **2018**, *41* (6), 637–650. <https://doi.org/10.1007/s13402-018-0398-0>.





# CONCLUSIONES





A lo largo de la presente tesis doctoral, se ha evaluado la capacidad antitumoral de varios derivados de oro(I) y plata(I) sintetizados previamente en el departamento de Química Inorgánica de la Universidad de Zaragoza sobre la línea Caco-2 como un modelo de cáncer colorrectal. De acuerdo con los datos preclínicos obtenidos, podría darse por cumplido el principal objetivo que se marcó al inicio del trabajo, consistente en encontrar una alternativa más segura y eficaz que el cisplatino. Tras analizar conjuntamente los valores de IC<sub>50</sub> y las cifras relativas al índice de selectividad, destacan de entre todos los derivados ensayados los complejos [Au(C≡C-2-NC<sub>5</sub>H<sub>4</sub>)(PTA)] (**2a**), la serie **3a-d** ([Au(L2a-d)PPh<sub>3</sub>]) con ligandos derivados de 3-hidroxi flavona, con énfasis en el complejo [Au(L2b)PPh<sub>3</sub>] (**3b**), el complejo [Au(L2c)PTA] (**4c**), que también posee un ligando derivado de 3-hidroxi flavona, y el complejo [Au(L1)(PPh<sub>3</sub>)](TfO) (**7a**) con un ligando derivado de la molécula de 2-anilino piridina, ya que han resultado ser los más prometedores de acuerdo con ambos parámetros de seguridad y eficacia. El complejo [Au(C≡CPh)(PTA)] (**1a**) también podría estar incluido dentro de esta categoría, puesto que, aunque no se ha determinado como tal su índice de selectividad, al tratar un modelo de la barrera gastrointestinal sana (células Caco-2 diferenciadas) con este derivado no se encontraron cambios significativos en la viabilidad celular respecto al control negativo, por lo que se podría considerar selectivo además de eficaz. En cualquier caso, se han identificado una serie de nuevos derivados de oro(I) que podrían tener un prometedor futuro en la práctica clínica.

La elección de los ligandos de coordinación tiene un peso innegable sobre el efecto terapéutico de la molécula final. El ejemplo más claro lo encontramos en el capítulo 1, al comparar la acción biológica de los complejos [Au(C≡CPh)(PTA)] (**1a**) y [Au(C≡C-2-NC<sub>5</sub>H<sub>4</sub>)(PTA)] (**2a**), dado que un cambio de un único átomo de nitrógeno en el esqueleto del alquino cambia por completo la afinidad del derivado por la enzima tiorredoxina reductasa, así como el tipo de muerte inducida por el complejo resultante. Este nitrógeno adicional facilita la interacción entre distintas moléculas del complejo [Au(C≡C-2-NC<sub>5</sub>H<sub>4</sub>)(PTA)], de modo que pierde la capacidad de interaccionar con la tiorredoxina reductasa que mostraba el complejo [Au(C≡CPh)(PTA)]; esto condiciona el mecanismo de acción del complejo **2a**, ya que la formación de agregados en el interior de la mitocondria causa un fallo en este orgánulo que tiene como consecuencia principal la muerte de la célula mediada por necroptosis, mientras que el complejo **1a** causaba la activación de la apoptosis intrínseca como es habitual en los derivados de oro(I) capaces de inhibir a la tiorredoxina reductasa, mecanismo de acción que comparte con el auranofin entre otros.

De forma similar, en el tercer capítulo se ha revelado que la elección de la unidad 3-hidroxi flavona como ligando de coordinación es una interesante estrategia para dirigir al complejo hacia dianas moleculares frente a las que los derivados de oro(I) suelen sentir poca o ninguna afinidad, como es la enzima ciclooxigenasa. De esta forma, se describe el caso de dos derivados capaces de inhibir a las dos isoformas principales de

dicha enzima, el complejo [Au(L2b)PPh<sub>3</sub>] (**3b**) y el complejo [Au(L2c)PTA] (**4c**), que inhiben a la isoforma 2 y 1 respectivamente. La unidad 3-hidroxi flavona parece ser la responsable, además, de la afinidad que siente el complejo [Au(L2c)PTA] (**4c**) por la enzima redox glutatión reductasa, que al no ser una selenoproteína es una enzima muy poco habitual de los derivados de oro(I). Por otro lado, ambos complejos son capaces de inhibir a la diana más típica de los derivados de oro(I), la enzima tiorredoxina reductasa, lo que sugiere que el centro metálico es tan importante como los ligandos de coordinación en lo referente al mecanismo de acción de las moléculas. Esta capacidad de interacción con más de una biomolécula al mismo tiempo que presentan este tipo de complejos, gracias presumiblemente a la elección del ligando, los convierte en compuestos de tipo multidiana, lo que debe ser muy tenido en consideración de cara a futuros estudios, dada la relevancia de esta clase de fármacos en la terapia antitumoral. Finalmente, también debe tenerse en cuenta que, aunque ambos complejos han resultado ser capaces de inducir la muerte por apoptosis, el complejo [Au(L2c)PTA] (**4c**) lo hace de forma más lenta que el complejo [Au(L2b)PPh<sub>3</sub>] (**3b**) por una posible activación de la autofagia como mecanismo citoprotector. Estos datos sugieren que podría ser interesante combinarlo con un inhibidor de la autofagia para incrementar su efecto terapéutico.

En definitiva, la elección de uno u otro ligando va a condicionar la acción antitumoral del complejo, haciéndolo más adecuado para el tratamiento de subtipos muy concretos de cáncer. Por ejemplo, frente a tumores que expresen ciclooxygenasa 2 podría ser de mayor utilidad recurrir al complejo [Au(L2b)PPh<sub>3</sub>] (**3b**), mientras que el complejo [Au(C≡C-2-NC<sub>5</sub>H<sub>4</sub>)(PTA)] (**2a**) podría ser una interesante alternativa para el tratamiento de tumores resistentes a la apoptosis. Por consiguiente, la creación de equipos multidisciplinares que colaboren estrechamente en todas las fases del trabajo, desde la síntesis del complejo hasta el análisis de su efecto antitumoral, se plantea como un requisito indispensable en el desarrollo de nuevos fármacos antitumorales.

Por otra parte, el desarrollo de un nuevo cóctel farmacológico compuesto por el complejo [Au(C≡C-2-NC<sub>5</sub>H<sub>4</sub>)(PTA)] (**2a**) y polifenoles ácidos del fruto de la planta silvestre *Rosa canina*, ha demostrado que, al igual que se había observado previamente con cisplatino y diversos extractos vegetales, también la acción terapéutica de los derivados de oro(I) puede mejorarse con el uso concomitante de extractos vegetales. La interacción de tipo aditivo entre ambos agentes sugiere que esta pueda ser una vía a través de la cual incrementar la eficacia terapéutica del fármaco metálico sin necesidad de aumentar la dosis del mismo, lo que podría ser beneficioso a la hora de reducir los posibles efectos secundarios causados por su acumulación en el organismo. Resulta muy interesante el hecho de que el extracto vegetal no potencie como tal el propio mecanismo de acción del derivado metálico, sino que la combinación resultante posee su propio mecanismo de acción, llegando incluso al extremo de bloquear la activación de la necroptosis causada por el complejo metálico en un intento de proteger la

integridad celular activando la autofagia; sin embargo, al resultar muy dañadas las mitocondrias por efecto del tratamiento, los lisosomas se ven a su vez afectados y el proceso autofágico no puede completarse, causando así la muerte por apoptosis. No obstante, no debe perderse de vista que los resultados obtenidos hasta el momento son por entero preclínicos, y deberían llevarse a cabo ensayos sobre modelos animales para poder validarlos.

Aunque el presente trabajo se ha centrado principalmente en el desarrollo de nuevos agentes quimioterapéuticos para el tratamiento del cáncer colorrectal, también se ha evaluado la actividad antitumoral de algunos de los derivados estudiados sobre otros modelos tumorales. Este análisis ha permitido determinar su posible selectividad frente al cáncer colorrectal. A modo de ejemplo, el complejo  $[\text{Au}(\text{L2b})\text{PPh}_3]$  (**3b**) estudiado en el capítulo 3, posee el doble de efecto sobre la línea Caco-2 que frente a un modelo de hepatocarcinoma, y su acción antitumoral es 9 veces mayor sobre la línea Caco-2 que sobre la MCF-7 (adenocarcinoma de mama), datos que sugieren que podría actuar selectivamente frente a un subtipo de cáncer colorrectal cuyo perfil bioquímico fuese muy similar al de esta línea Caco-2. Pero no sólo se han encontrado derivados aparentemente selectivos frente al modelo de adenocarcinoma de colon utilizado, sino que el complejo  $[\text{Au}(\text{L1})(\text{PPh}_3)](\text{TfO})$  (**7a**) ha destacado por su efectividad frente a dos modelos de cáncer de mama (líneas MCF-7 y MDA-MB-231). Estos datos ponen de manifiesto la importancia de trabajar con varios modelos celulares a pesar de que se pretenda encontrar un agente quimioterapéutico que actúe contra un tipo de cáncer muy concreto, ya que pueden obtenerse resultados inesperados pero de gran interés.

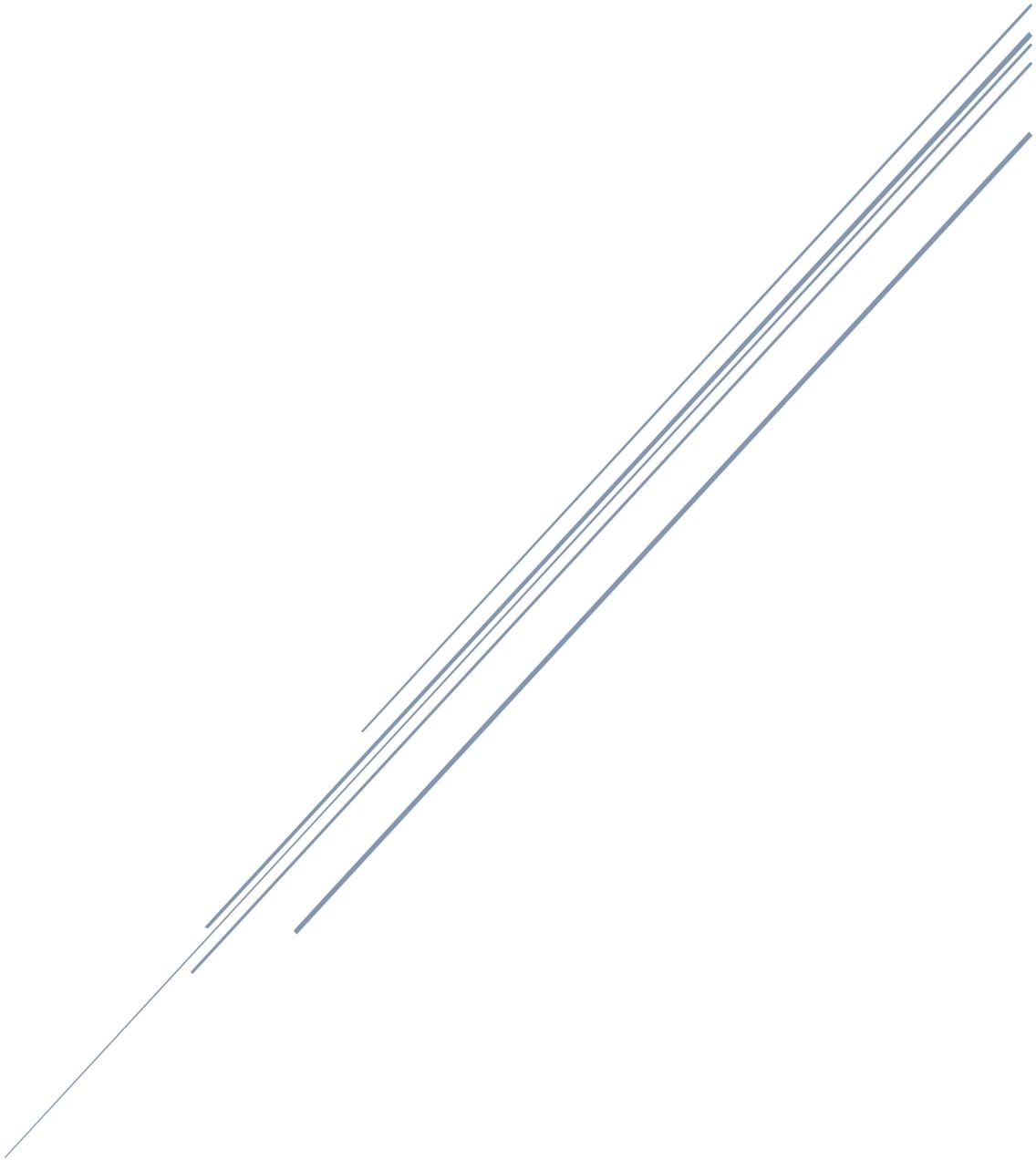
Lo anterior está muy relacionado con la idea del *drug repurposing*, una corriente que aboga por dar una segunda vida a fármacos como agentes terapéuticos frente a enfermedades diferentes para las que fueron inicialmente diseñados. En este sentido, en el capítulo 3 se ha estudiado el potencial antibacteriano de los carbenos complejos de oro(I) con los ligandos derivados de 3-hidroxi flavona, es decir, las series **5a-d** ( $[\text{Au}(\text{L2a-d})(\text{IMe})]$ ) y **6a-d** ( $[\text{Au}(\text{L2a-d})(\text{IPr})]$ ) frente a varias cepas Gram positivas y negativas. A pesar de que estos complejos fueron sintetizados como agentes quimioterapéuticos, su relativamente baja capacidad antiproliferativa en comparación con los complejos homólogos de oro(I) con fosfinas, podría haber motivado su descarte definitivo como fármacos. Sin embargo, al estudiar su efecto antibacteriano se les ha dado una segunda vida. De nuevo, se afianza la importancia de la elección de los ligandos que acompañan a la esfera de coordinación del metal, de modo que en este tipo de complejos la presencia de fosfinas (complejos **3a-d** y **4a-d**) conduce a una elevada citotoxicidad frente a los modelos tumorales ensayados, mientras que la sustitución de fosfinas por carbenos provoca una reducción de dicha citotoxicidad en beneficio de sus propiedades antibacterianas. Resulta especialmente interesante la capacidad del complejo  $[\text{Au}(\text{L2b})(\text{IMe})]$  (**5b**) de inhibir no solo el crecimiento de las bacterias Gram positivas, como es habitual en los derivados de oro(I), sino también el de las Gram

negativas. Este hallazgo sugiere que el complejo podría inhibir no solo a la diana típica de los complejos de oro(I) con efecto antibacteriano, la tiorredoxina reductasa, sino que podría mostrar afinidad por otra u otras proteínas bacterianas. Serán necesarios futuros ensayos en esta dirección para caracterizar por completo el efecto antibacteriano del complejo [Au(L2b)(IMe)] (**5b**).

En el último capítulo, se ha analizado el efecto de la sustitución del átomo de oro(I) del centro metálico por uno de plata(I) sobre las propiedades antitumorales del complejo resultante. De acuerdo con los datos obtenidos, el complejo de oro [Au(L1)(PPh<sub>3</sub>)](TfO) (**7a**) sería aproximadamente 2,5 veces más eficaz que el equivalente de plata [Ag(TfO)(L1)(PPh<sub>3</sub>)] (**8a**), de acuerdo con los valores de IC<sub>50</sub> obtenidos en cada caso; además, es de gran importancia que el derivado de oro(I) es en torno a 10 veces más selectivo que el de plata(I). Tomados en consideración, estos resultados sugieren que, en este caso concreto, el complejo de oro [Au(L1)(PPh<sub>3</sub>)](TfO) (**7a**) podría ser una opción más adecuada que su homólogo de plata [Ag(TfO)(L1)(PPh<sub>3</sub>)] (**8a**) para el tratamiento del cáncer colorrectal. Por otra parte, se ha observado que ambos derivados no comparten dianas terapéuticas, ya que, mientras que el complejo [Au(L1)(PPh<sub>3</sub>)](TfO) (**7a**) causa apoptosis dependiente de ROS mediada por la inhibición de la tiorredoxina reductasa y la subunidad 20S del proteasoma, el complejo [Ag(TfO)(L1)(PPh<sub>3</sub>)] (**8a**) induce apoptosis independiente de ROS; la diana o dianas moleculares de este derivado no se han identificado hasta el momento, aunque los datos obtenidos podrían apuntar a un fallo mitocondrial. Esto podría indicar que no existirían resistencias cruzadas entre los derivados de oro(I) y plata(I), lo que podría ser de interés de cara al tratamiento de tumores colorrectales resistentes a la quimioterapia de primera elección. Por último, en este capítulo se ha mencionado la posibilidad de que los derivados de oro(I) sean capaces de activar la vía extrínseca de la apoptosis. La capacidad de esta clase de agentes quimioterapéuticos de activar la vía extrínseca ha sido poco explorada hasta la fecha, y podría suponer un interesante campo de estudio en un futuro próximo. De igual manera, también el derivado de plata mostró ser capaz de activar a la caspasa 8, de modo que parece ser capaz de igual manera de activar la vía extrínseca.

En definitiva, los complejos de oro(I) parecen ser una alternativa sólida al empleo de fármacos basados en platino frente al tratamiento del cáncer colorrectal. La presente tesis doctoral prueba que todavía existen numerosas incógnitas por despejar en torno a las propiedades antitumorales de estas moléculas, puesto que se han identificado dianas moleculares que, hasta el momento, no habían sido consideradas en profundidad, así como la capacidad de inducir formas de muerte alternativas a la clásica apoptosis intrínseca. La investigación en este campo debe continuar, trasladando estos estudios preclínicos a modelos tumorales tridimensionales y/o animales, para así avanzar en la búsqueda de un nuevo fármaco eficaz y selectivo con el que sustituir a las opciones terapéuticas actuales.

# CONCLUSIONS





## CONCLUSIONS

On this Thesis, the antitumoral capacity of several gold(I) derivatives previously synthesized in Inorganic Chemistry department of the University of Zaragoza has been evaluated towards Caco-2 cell line as a model of colorectal cancer. According to preclinical data obtained, the main goal proposed at the beginning - which consisted on finding a safer and more efficient alternative to cisplatin- can be considered fulfilled. Upon concomitant analysis of IC<sub>50</sub> values and Selectivity Index, certain complexes highlight among all of them, which are [Au(C≡C-2-NC<sub>5</sub>H<sub>4</sub>)(PTA)] (**2a**), **3a-d** series ([Au(L2a-d)PPh<sub>3</sub>]) coordinated to ligands derived from 3-hydroxyflavone units, specially [Au(L2b)PPh<sub>3</sub>] (**3b**), [Au(L2c)PTA] (**4c**), which also contains a molecule derived from 3-hydroxyflavone, and [Au(L1)(PPh<sub>3</sub>)](TfO) (**7a**) coordinated to a molecule derived from 2-anilinopiridine, according to both safety and efficacy parameters. [Au(C≡CPh)(PTA)] (**1a**) might be included in this category as well, given that, although its Selectivity Index has not been calculated, a model of gastrointestinal barrier (differentiated Caco-2 cells) showed no changes in cell viability upon treatment with IC<sub>50</sub> value of this derivative compared to negative control, which might be indicative of tumor selectivity as well as clinical efficacy. Nevertheless, a series of novel gold(I) derivatives that might display a promising clinical future has been identified.

The choice of the appropriate ligands has an undeniable effect on the therapeutic effect of the resultant molecule. A clear example is found on chapter 1 when comparing the bioactivity of complexes [Au(C≡CPh)(PTA)] (**1a**) and [Au(C≡C-2-NC<sub>5</sub>H<sub>4</sub>)(PTA)] (**2a**), since the addition of a single nitrogen atom on the alkynyl skeleton results on differences regarding the affinity toward thioredoxin reductase, as well as the type of cell death induced. The extra nitrogen facilitates interaction between molecules of [Au(C≡C-2-NC<sub>5</sub>H<sub>4</sub>)(PTA)], thus the capacity of interacting with thioredoxin reductase showed by complex [Au(C≡CPh)(PTA)] is lost. This fact is responsible of the mechanism of action exerted by complex **2a**, since the formation of such complexes aggregates on mitochondria leads to mitochondrial failure and, as a consequence, to necroptotic cell death, whereas complex **1a** triggered intrinsic apoptosis as usual for gold(I) derivatives, a mechanism of action that shares with auranofin among others.

Similarly, the election of 3-hydroxyflavone unit as ligand has shown to be an interesting strategy in order to lead complexes to molecular targets by which gold(I) derivatives usually display few or even no attraction, such as cyclooxygenase enzyme, as shown on chapter three. Two derivatives have been identified as cyclooxygenase inhibitors: [Au(L2b)PPh<sub>3</sub>] (**3b**) and [Au(L2c)PTA] (**4c**), which are able to inhibit isoforms 2 and 1 respectively. The molecule derived from 3-hydroxyflavone might be responsible of the affinity of [Au(L2c)PTA] (**4c**) for the redox enzyme glutathione reductase as well, given that gold complexes do not interact with this enzyme due to its lack of the selenocysteine amino acid. On the other hand, both complexes are able to inhibit the most usual molecular target of gold derivatives, the enzyme thioredoxin reductase, which suggests that the metallic centre is as relevant as the ligands in regards to

## CONCLUSIONS

mechanism of action of the resultant complex. This capacity of interacting with more than one biomolecule at once showed by these complexes, turn them into multitarget complexes, which must be taken into consideration for future studies given the relevance of this kind of drugs on chemotherapy. Lastly, it must be carefully considered that, despite both complexes are able to trigger apoptosis, complex [Au(L2c)PTA] (**4c**) showed a slower pro-apoptotic effect than complex [Au(L2b)PPh<sub>3</sub>] (**3b**), probably because of an activation of cytoprotective autophagy. In light of this, the combination of this complex with an autophagy inhibitor might increase its therapeutic effect.

Therefore, the choice of the ligand will strongly influence the antitumor effect of the complexes, thus becoming themselves more appropriate for the treatment of concrete subtypes of cancer. *E.g.* [Au(L2b)PPh<sub>3</sub>] (**3b**) might be more useful against those tumors displaying an overexpression of cyclooxygenase-2, whereas complex [Au(C≡C-2-NC<sub>5</sub>H<sub>4</sub>)(PTA)] (**2a**) might be of great interest for the treatment of apoptosis-resistant cancer. Consequently, creating multidisciplinary teams that collaborate close on each stage of the projects, from complex synthesis to analysis of its antitumor effect, must be a priority on the development of novel chemotherapeutic drugs.

On the other hand, the development of a novel drug cocktail containing [Au(C≡C-2-NC<sub>5</sub>H<sub>4</sub>)(PTA)] (**2a**) and acidic polyphenols from the rosehip of the wild plant *Rosa canina* has proved that, as well as was previously observed when combining cisplatin and several plant extracts, the therapeutic effect of gold(I) derivatives might be improved with the concomitant addition of plant extracts. The additive pharmacological interaction between both agents suggests a way to increase the antiproliferative effect of the metallodrug instead by increasing its concentration; which might be beneficial in order to reduce side effects derived by drug accumulation. The plant extract does not potentiate the mechanism of action of the metallodrug itself, instead, the combination blocks necroptosis triggered by the gold derivative upon autophagy activation in order to maintain cellular integrity. In addition, since mitochondria are quite damaged due to treatment, lysosomes are affected as well and the autophagic flux remains incomplete, thus triggering apoptosis cell death. Nevertheless, results obtained so far are entirely preclinical, and assays on animal models must be performed to validate them.

Despite the proposed thesis was initially focused on the development of novel chemotherapeutic agents for the treatment of colorectal cancer, some of the derivatives was tested towards further cancer models. This analysis allowed us to study their selectivity towards colorectal cancer. As an example, complex [Au(L2b)PPh<sub>3</sub>] (**3b**) studied on chapter 3, showed twice antiproliferative effect on Caco-2 cell line than on an hepatocarcinoma model, and a 9-fold increase on MCF-7 cell line (breast adenocarcinoma) compared to Caco-2 cell line, which suggests that might be selective toward a colorectal cancer subtype whose molecular profile was close to the one of Caco-2 cells. Not only likely colorectal cancer-selective complexes have been identified:

complex  $[\text{Au}(\text{L1})(\text{PPh}_3)](\text{TfO})$  (**7a**) displayed great antiproliferative effect towards two breast cancer models (MMCF-7 and MDA-MB-231 cell lines). These data show up the relevance of evaluating the effect of the complexes toward a panel of different cancer models despite the main purpose is finding a chemotherapeutic agent against a very specific cancer type, since unexpected but interesting results might be obtained.

This fact is closely related with the current idea of drug repurposing, which pleads with giving a second chance to drugs as novel therapeutic option for diseases other than the ones they were initially designed for. In this respect, on chapter 3 the antibacterial potential of series **5a-d** ( $[\text{Au}(\text{L2a-d})(\text{IMe})]$ ) and **6a-d** ( $[\text{Au}(\text{L2a-d})(\text{IPr})]$ ) has been studied towards a panel of Gram positive and Gram negative bacteria. Despite that these complexes were initially synthesized as chemotherapeutic agents, their relatively low antiproliferative capacity in comparison to their phosphine gold(I) homologues might have supposed their definitive discard as drugs. However, upon evaluating their antibacterial effect they have received a second opportunity. Again, the choice of the appropriate ligands is proved to be relevant, so that the presence of phosphines (series **3a-d** and **4a-d**) leads to a high cytotoxicity toward the evaluated cancer cell models, whereas the replacement of phosphines by carbenes results on a reduction in this cytotoxicity in benefit of their antibacterial properties. It is of great interest the capacity of complex  $[\text{Au}(\text{L2b})(\text{IMe})]$  (**5b**) to inhibit not only Gram positive bacteria growing, which is common for gold(I) derivatives, but also Gram negative. This finding suggests it might inhibit the usual molecular target of antibacterial gold(I) complexes, redox enzyme thioredoxin reductase, and also display certain affinity for other bacterial proteins. Further studies will be needed in order to fully characterize the antibacterial effect of complex  $[\text{Au}(\text{L2b})(\text{IMe})]$  (**5b**).

In the last chapter, the replacement of gold(I) by silver(I) has been analyzed in terms of the antitumor properties. According to the obtained data, the gold complex  $[\text{Au}(\text{L1})(\text{PPh}_3)](\text{TfO})$  (**7a**) displays a 2.5-fold increase in  $\text{IC}_{50}$  compared to silver(I) counterpart  $[\text{Ag}(\text{TfO})(\text{L1})(\text{PPh}_3)]$  (**8a**); besides, the gold(I) derivative displays a 10-fold increase in Selectivity Index, which is of great relevance. Taken together, these results suggest that, in this specific case, the gold complex  $[\text{Au}(\text{L1})(\text{PPh}_3)](\text{TfO})$  (**7a**) might be a more adequate therapeutic option than  $[\text{Ag}(\text{TfO})(\text{L1})(\text{PPh}_3)]$  (**8a**) for the management of colorectal cancer. On the other side, both complexes do not share molecular targets, since complex  $[\text{Au}(\text{L1})(\text{PPh}_3)](\text{TfO})$  (**7a**) triggers ROS-dependent apoptosis mediated by inhibition of thioredoxin reductase and 20S proteasome, whereas complex  $[\text{Ag}(\text{TfO})(\text{L1})(\text{PPh}_3)]$  (**8a**) induces ROS-independent apoptosis; molecular targets of this derivative have not been yet identified, although the obtained data suggest that mitochondria disruption might be involved. This might be indicative of a lack of cross-resistance between both gold(I) and silver(I) complexes, which suggests  $[\text{Ag}(\text{TfO})(\text{L1})(\text{PPh}_3)]$  (**8a**) could be used as back-up treatment for the management of tumor resistant to gold-containing drugs. Finally, the activation of extrinsic apoptosis

## CONCLUSIONS

pathway triggered by gold(I) derivatives has been mentioned in this chapter. The capacity of this type of chemotherapeutic agents of triggering extrinsic apoptosis has been poorly studied yet, and might be an interesting knowledge field to explore in a near future. Similarly, the silver derivative showed the capacity of activating caspase 8, which suggests it might trigger extrinsic apoptosis as well.

In summary, gold(I) complexes might be a strong alternative to the current platinum-based drugs for colorectal cancer treatment. This doctoral thesis proves that there are still numerous unknowns to solve regarding to the antitumor properties of these molecules, given that it has been identified molecular targets that have not been considered yet, and also alternative cell death pathways have been observed in response to treatments. Research on this knowledge field must pursue, transferring these preclinical studies to 3D and/or animal models in order to advance in the search of a novel effective and selective drug to replace the current therapeutic strategies.

## CONCLUSIONS