

Luis Javier Quero Bellido

Complejos de oro y compuestos
polifenólicos como agentes
antiproliferativos en el cáncer de
colon: determinación de dianas
terapéuticas y vías de muerte
celular

Director/es

Rodríguez Yoldi, María Jesús
Cerrada Lamuela, Elena

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

© Universidad de Zaragoza
Servicio de Publicaciones

ISSN 2254-7606

Tesis Doctoral

COMPLEJOS DE ORO Y COMPUESTOS
POLIFENÓLICOS COMO AGENTES
ANTIPROLIFERATIVOS EN EL CÁNCER DE
COLON: DETERMINACIÓN DE DIANAS
TERAPÉUTICAS Y VÍAS DE MUERTE CELULAR

Autor

Luis Javier Quero Bellido

Director/es

Rodríguez Yoldi, María Jesús
Cerrada Lamuela, Elena

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA
Escuela de Doctorado

Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas y Biotecnológicas

2023

COMPLEJOS DE ORO Y COMPUESTOS POLIFENÓLICOS COMO AGENTES ANTIPROLIFERATIVOS EN EL CÁNCER DE COLON: DETERMINACIÓN DE DIANAS TERAPEÚTICAS Y VÍAS DE MUERTE CELULAR

Luis Javier Quero Bellido

Memoria presentada para optar al grado de doctor
en Ciencias Biomédicas y Biotecnológicas por la
Universidad de Zaragoza

Departamento de Farmacología, Fisiología y
Medicina Legal y Forense

Enero 2023



Universidad Zaragoza



Instituto de Síntesis Química y Catálisis Homógena



Instituto de Investigación
Sanitaria Aragón



Las doctoras **M^a Jesús Rodríguez Yoldi**, catedrática del Departamento de Farmacología, Fisiología y Medicina Legal y Forense de la Universidad de Zaragoza, y **Elena Cerrada Lamuela**, profesora titular del Departamento de Química Inorgánica de la Universidad de Zaragoza.

Certifican: que Luis Javier Quero Bellido, graduado en Biotecnología por la Universidad de Zaragoza, ha realizado bajo nuestra dirección el trabajo con el título: *Complejos de oro y compuestos polifenólicos como agentes antiproliferativos en el cáncer de colon: determinación de dianas terapéuticas y vías de muerte celular*, que presenta como memoria para aspirar al grado de Doctor en Ciencias Biomédicas y Biotecnológicas.

Este trabajo se ha llevado a cabo en los departamentos de Farmacología, Fisiología y Medicina Legal y Forense y de Química Inorgánica de la Universidad de Zaragoza.

Zaragoza, 16 de enero de 2023

RODRIGUEZ
YOLDI MARIA
JESUS - DNI
15812563V

Firmado digitalmente
por RODRIGUEZ YOLDI
MARIA JESUS - DNI
15812563V
Fecha: 2023.01.16
13:08:57 +01'00'

Fdo: M^a Jesús Rodríguez Yoldi

CERRADA
LAMUELA
ELENA - DNI
25437640P

Firmado digitalmente
por CERRADA
LAMUELA ELENA - DNI
25437640P
Fecha: 2023.01.16
13:17:57 +01'00'

Fdo: Elena Cerrada Lamuela

AGRADECIMIENTOS:

En primer lugar, no puedo sino dar las gracias a las grandes culpables de todo esto, mis directoras: María Jesús y Elena. Ellas me dieron mi primera oportunidad, cuando solo era un estudiante de tercero de biotecnología, y con ellas he crecido académica, personal y profesionalmente. Gracias a las dos por vuestra paciencia, por enseñarme desde el principio y por confiar en mí para llevar a cabo esta tesis.

Además, no puedo sino agradecer a todos los miembros del departamento de fisiología y mis compañeros doctorandos, Berta, Elisa, Andrea y Diego, por ofrecerme su ayuda siempre que ha sido necesaria. Y, por supuesto, gracias a los miembros que han pasado por el grupo Dieta Mediterránea y Potencial Nutracéutico y, especialmente, a Luís, Javi y Tania. Gracias a los tres por todos vuestros consejos en lo científico, la ayuda que me dabais *arriba* cada vez que la necesitaba y, lo más importante, los buenos ratos en el laboratorio. Muchas gracias también a todos aquellos que me han acompañado durante largas horas en el cuarto de cultivos, sembrando, tratando y charlando, ya que no solo amenizaban las horas de trabajo, sino que parte de esta tesis es gracias a ellos: Nacho, Sara, José Carlos y Javi. ¡Muchísimas gracias a todos!

Gracias también a Carla Ramos y Joana Santos, del Instituto Politécnico de Viana Do Castelo, que me abrieron las puertas de su laboratorio cuando así lo necesité y me transmitieron todo su conocimiento en el cultivo de bacterias. Muchas gracias por hacerme sentir como en casa en un país que no era el mío.

Y, por supuesto, sin salir del laboratorio, no hay suficientes gracias para Inés, amiga y mentora. Ella estaba allí cuando yo llegué y ella me dio las fuerzas para comenzar la tesis y para seguir adelante cada vez que parecía no haber salida. No se me ocurre una mejor compañera para mis primeros años en la investigación, tanto por su capacidad de trabajo y de involucrarse ayudándome en todo lo que podía, como por las interminables charlas que hacían llevadero el trabajo más tedioso y las estancias más allá de Zaragoza. Probablemente no haya palabras para agradecer todo lo que significa para esta tesis y para haber llegado a este momento, espero que lo sepa.

Pero, por supuesto, no todo es el laboratorio y, de hecho, el inicio de todo está en casa. Gracias a mi familia porque sin ellos no podría haber hecho esta tesis ni todo lo que la precede. Y porque será con ellos con los que podré hacer todo lo que llegue en el futuro. Gracias a mis padres por su apoyo, por acompañarme en cada paso que he dado y por solucionar todos los problemas que han surgido en estos 5 años y los 23 anteriores. Gracias a mi abuela por preocuparse por mí y hacer todo lo posible para que la vida sea sencilla. Y gracias a mis hermanas porque me han acompañado en cada momento desde que nacieron y porque me impulsan a seguir cada día.

Esta tesis tampoco podría haber salido adelante sin mis amigos, con los que compartir risas y desahogarse cuando algo va mal:

Marcos, gracias por acompañarme ininterrumpidamente desde 2009, compartiendo apuntes, recreos y tardes de viernes. Hacer biotecnología fue mucho más fácil sabiendo que tú ibas a estar a mi lado y gracias a ti he pasado unos de los mejores años de mi vida. Gracias por escucharme cuando ha sido necesario, eres demasiado bueno para tu propio interés, pero el resto te estamos eternamente agradecidos. Y gracias a David, el tercero del trío de 3º de la ESO, y con el que he compartido momentos inolvidables desde que la memoria me alcanza a recordar.

Marcos y Chenco, mejoráis cualquier momento. Gracias por ser directos cuando hay que serlo y por sacarme de casa cuando es necesario. Salvasteis esta tesis en mil puntos, la última con una comida en el colombiano en el momento justo.

Y a los que llegaron en 2012, muchas gracias también. Hicisteis de la carrera una experiencia inolvidable y me habéis acompañado hasta hoy:

Félix, te admiro por muchas cosas, pero sobre todo por tu capacidad para subir el ánimo de cualquier grupo con solo aparecer. No sé de dónde sacas tanta energía, pero bendita sea. Y prepárate, que el próximo eres tú.

Marqueta, a pesar de que la tesis es de la gente con la que la haces, tú también tienes una labor importante en que esta haya seguido adelante. Gracias por tener siempre algo que añadir, aunque sea por fastidiar.

María, ya te lo he dicho todo. Tenerte de compañera en el camino hacia la universidad fue lo mejor que me podía pasar, todo lo que salió de ahí no tiene precio. Gracias por los cientos de cafés en los que nos hemos contado nuestros problemas y por darme un buen consejo siempre que lo he necesitado.

Soraya, tuvieron que pasar años, pero conocerte fue una grata sorpresa. Admiro tu temple y tu manera de afrontar los problemas. Y, sobre todo, admiro tu capacidad de escuchar. Gracias por todos los momentos que hemos pasado juntos.

Y, por último, Tresa. Gracias a ti por todo y a quien sea por ponerte en mi camino. Gracias por todos los cafés a lo largo de estos años, para distraer la mente del trabajo o para descargar la frustración cuando las cosas no van bien. Has sido mi apoyo fundamental para que esta tesis haya llegado a buen puerto y mi cabeza no se haya quedado por el camino.

Y a Sara. Gracias por los dibujos de esta tesis y por todo lo que no cabe ni en las 250 páginas que ocupa. Gracias por acompañarme cada día.

Mil gracias a todos y cada uno de vosotros.

A mi familia: mis padres Javier y Belén, mis hermanas Marina y Eva y mi abuela Brigi.

Gracias

ARTÍCULOS CIENTÍFICOS PUBLICADOS Y PARTICIPACIÓN EN CONFERENCIAS:

Artículos científicos publicados:

1. Marmol, I.; Virumbrales-Munoz, M.; Quero, J.; Sanchez-De-Diego, C.; Fernandez, 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, doi:10.1016/j.jinorgbio.2017.08.020.
2. Gascon, S.; Jimenez-Moreno, N.; Jimenez, S.; Quero, J.; Rodriguez-Yoldi, M.J.; Ancin-Azpilicueta, C. Nutraceutical composition of three pine bark extracts and their antiproliferative effect on Caco-2 cells. *J Funct Foods* **2018**, *48*, 420-429, doi:10.1016/j.jff.2018.07.040.
3. Mármol, I.; Quero, J.; Rodríguez-Yoldi, M.J. Modifiable and Non-Modifiable Risk Factors of Colorectal Cancer. In *Advances in Health and Disease*, Duncan, L.T., Ed.; Nova Science Publishers, Inc: New York, **2018**; Volume 7.
4. Quero, J.; Cabello, S.; Fuertes, T.; Marmol, I.; Laplaza, R.; Polo, V.; Gimeno, M.C.; Rodriguez-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*, 10832-10845, doi:10.1021/acs.inorgchem.8b01464.
5. Allaoui, A.; Gascon, S.; Benomar, S.; Quero, J.; Osada, J.; Nasri, M.; Rodriguez-Yoldi, M.J.; Boualga, A. Protein Hydrolysates from Fenugreek (*Trigonella foenum graecum*) as Nutraceutical Molecules in Colon Cancer Treatment. *Nutrients* **2019**, *11*, doi:ARTN 724 10.3390/nu11040724.
6. Marmol, I.; Quero, J.; Rodriguez-Yoldi, M.J.; Cerrada, E. Gold as a Possible Alternative to Platinum-Based Chemotherapy for Colon Cancer Treatment. *Cancers* **2019**, *11*, doi:ARTN 78010.3390/cancers11060780.
7. Marmol, I.; Quero, J.; Jimenez-Moreno, N.; Rodriguez-Yoldi, M.J.; Ancin-Azpilicueta, C. A systematic review of the potential uses of pine bark in food industry and health care. *Trends Food Sci Tech* **2019**, *88*, 558-566, doi:10.1016/j.tifs.2018.07.007.
8. Quero, J.; Marmol, I.; Cerrada, E.; Rodriguez-Yoldi, M.J. Insight into the potential application of polyphenol-rich dietary intervention in degenerative disease management. *Food Funct* **2020**, *11*, 2805-2825, doi:10.1039/d0fo00216j.
9. Marmol, I.; Quero, J.; Ibarz, R.; Ferreira-Santos, P.; Teixeira, J.A.; Rocha, C.M.R.; Perez-Fernandez, M.; Garcia-Juiz, S.; Osada, J.; Martin-Belloso, O.; et al. Valorization of agro-food by-products and their potential therapeutic applications. *Food Bioprod Process* **2021**, *128*, 247-258, doi:10.1016/j.fbp.2021.06.003.
10. Quero, J.; Jimenez-Moreno, N.; Esparza, I.; Osada, J.; Cerrada, E.; Ancin-Azpilicueta, C.; Rodriguez-Yoldi, M.J. Grape Stem Extracts with Potential Anticancer and Antioxidant Properties. *Antioxidants-Basel* **2021**, *10*, doi:ARTN 243 10.3390/antiox10020243.

11. Quero, J.; Ruighi, F.; Osada, J.; Gimeno, M.C.; Cerrada, E.; Rodriguez-Yoldi, M.J. Gold(I) Complexes Bearing Alkylated 1,3,5-Triaza-7-phosphaadamantane Ligands as Thermoresponsive Anticancer Agents in Human Colon Cells. *Biomedicines* **2021**, *9*, doi:10.3390/biomedicines9121848.
12. Velderrain-Rodriguez, G.R.; Quero, J.; Osada, J.; Martin-Belloso, O.; Rodriguez-Yoldi, M.J. Phenolic-Rich Extracts from Avocado Fruit Residues as Functional Food Ingredients with Antioxidant and Antiproliferative Properties. *Biomolecules* **2021**, *11*, doi:ARTN 977 10.3390/biom11070977.
13. Quero, J.; Ballesteros, L.F.; Ferreira-Santos, P.; Velderrain-Rodriguez, G.R.; Rocha, C.M.R.; Pereira, R.N.; Teixeira, J.A.; Martin-Belloso, O.; Osada, J.; Rodriguez-Yoldi, M.J. Unveiling the Antioxidant Therapeutic Functionality of Sustainable Olive Pomace Active Ingredients. *Antioxidants-Basel* **2022**, *11*, doi:ARTN 828 10.3390/antiox11050828.
14. Quero, J.; Royo, J.C.; Fodor, B.; Gimeno, M.C.; Osada, J.; Rodriguez-Yoldi, M.J.; Cerrada, E. Sulfonamide-Derived Dithiocarbamate Gold(I) Complexes Induce the Apoptosis of Colon Cancer Cells by the Activation of Caspase 3 and Redox Imbalance. *Biomedicines* **2022**, *10*, doi:ARTN 143710.3390/biomedicines10061437.
15. Marmol, I.; Quero, J.; Azcarate, P.; Atrian-Blasco, E.; Ramos, C.; Santos, J.; Gimeno, M.C.; Rodriguez-Yoldi, M.J.; Cerrada, E. Biological Activity of NHC-Gold-Alkynyl Complexes Derived from 3-Hydroxyflavones. *Pharmaceutics* **2022**, *14*, doi:ARTN 2064 10.3390/pharmaceutics14102064.

Participación en conferencias:

1. **Título:** Necroptosis induction by an alkynyl gold(I) complex in colon carcinoma cells
Autores: Javier Quero, Inés Mármol, Cristina Sánchez-de-Diego, Sonia Gascón, M. Jesús Rodríguez-Yoldi, Elena Cerrada
Tipo de participación: póster
Evento: XI Congreso Anual de Biotecnología 2017
2. **Título:** Efecto biológico de complejos de oro(III) con ligandos tiolato y ditiocarbamato sobre células de cáncer de colon
Autores: Javier Quero, Inés Mármol, M. Jesús Rodríguez-Yoldi, Elena Cerrada
Tipo de participación: póster
Evento: 8ª Jornada de Jóvenes Investigadores (Química y Física) de Aragón
3. **Título:** Evaluation of protective effect of agroalimentary industry by-products on a mucosal barrier model
Autores: Javier Quero, Inés Mármol, Raquel Ibarz, Olga Martín-Belloso, M. Jesús Rodríguez-Yoldi
Tipo de participación: póster
Evento: XIII Congreso Anual de Biotecnología 2019

4. **Título:** N-Heterocyclic carbene gold(I) derivatives with long aliphatic side chains as potential anticancer agents in colon cancer
Autores: Javier Quero, Adrian Alconchel, Sara Ortega, M. Concepción Gimeno, M. Jesús Rodríguez-Yoldi, Elena Cerrada
Tipo de participación: póster
Evento: 1st International Workshop on Metals in Medicine

5. **Título:** Protective effect of maltodextrin-encapsulated cucumber and red pepper extracts on an intestinal barrier model
Autores: Javier Quero, Inés Mármol, Raquel Ibarz, Olga Martín-Belloso, M. Jesús Rodríguez-Yoldi
Tipo de participación: póster
Evento: X Congreso Nacional CyTA CESIA

6. **Título:** Influence of hyperthermia and fluorinated appendages in the potential anticancer properties of gold(I) complexes
Autores: Javier Quero, Francesco Ruighi, J.Carlos Royo, M. Concepción Gimeno, Elena Cerrada, M. Jesús Rodríguez-Yoldi
Tipo de participación: póster
Evento: Metals & Water 2021

7. **Título:** Nuevas estrategias para el tratamiento del cáncer de colon: complejos de NSAID oro(I)
Autores: Javier Sáez, M^a Jesús Rodríguez-Yoldi, Javier Quero, M. Concepción Gimeno, Elena Cerrada
Tipo de participación: póster
Evento: I Simposio del Instituto de Síntesis Química y Catálisis Homogénea

8. **Título:** Gold(I) Complexes as Thermoresponsive Anticancer Agents in Human Colon Cancer Cells
Autores: Javier Quero, M. Concepción Gimeno, M. Jesús Rodríguez-Yoldi and Elena Cerrada
Tipo de participación: póster
Evento: XII Reunión Científica de Bioinorgánica

9. **Título:** Therapeutic applications of dithiocarbamate gold(I) complexes derived from sulfonamides on colon cancer cells
Autores: Elena Cerrada, Javier Quero, José Carlos Royo, Beatrice Fodor, M. Jesús Rodríguez-Yoldi
Tipo de participación: Póster
Evento: XL Reunión GEQO

ABREVIATURAS:

5-FU: 5-Fluorouracilo

AC: Anhidrasa carbónica

AF: Auranofin

AIF: Factor de inducción de apoptosis

APC: Adenomatous polyposis coli

ARE: elemento de respuesta antioxidante

Bcl: Proteína de Leucemia/Linfoma de células B

Bid: Agonista de la muerte de dominio interactivo BH3

BMPR1A: Receptor 1 A de la proteína ósea morfogénica

BRAF: Gen homólogo del fibrosarcoma acelerado rápidamente B

B-Raf: Raf quinasa tipo B

BSA: Albúmina sérica bovina

C-L: Tipo caspasa

CAP: Capecitabina

Cas: Caspasa

CCR: Cáncer colorrectal

CDK: Quinasa dependiente de ciclina

CHR: Región homóloga de genes del ciclo celular

CKI: Proteína inhibidora de CDK

COX: Ciclooxygenasa

CT-L: Tipo quimotripsina

CTL: Linfocito T citotóxico

Cyt c: Citocromo c

DCF: 7,5-diclorodihidrofluoresceína

DCFH-DA: 2',7'-diclorodihidrofluoresceína 3',6'-diacetato

DiI1(5): 1,1',3,3,3'-hexametilindodicarbo-cianina

DMARD: Fármaco antirreumático modificador de la enfermedad

DMEM: Medio esencial Eagle modificado por DULBECCO

DMSO: Dimetilsulfóxido

DNA: Ácido desoxirribonucleico

DTNB: 5,5'-Ditiobis-(ácido 2-nitrobenzoico)

E2F1: Factor de transcripción 1 E2F

EGFR: Receptor del factor de crecimiento epidérmico

EII: Enfermedad Intestinal Inflamatoria

EPCAM: Molécula de adhesión celular epitelial

ERK: Quinasa regulada por señales extracelulares

FAP: Poliposis adenomatosa familiar

FDA: Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos

GPX4: Glutatión peroxidasa 4

GSDMD: Gasdermina D

GSH: Glutatión

GSR: Glutatión reductasa

GST: Gen supresor de tumores

HER2: Receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano

IC₅₀: Concentración inhibitoria media

IL: Interleuquina

IRI: Irinotecán

Keap1: Proteína 2 asociada a ECH tipo Kelch

KRAS: Oncogén homólogo a virus Kirsten del sarcoma de rata

LV: Leucovorina

MAPK: Proteínas quinasas activadas por mitógenos

MEK: Quinasa de MAPK

miRNA: Micro-RNA

MLH: Proteína homóloga de MutL

MLKL: Mixed lineage kinase domain-like

MMR: Mecanismo de reparación de errores de apareamiento

MSH: Proteína homóloga de MutS

MSI: Inestabilidad microsatelital

MTT: 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazolio bromuro

MYC: Oncogen viral homólogo de mielocitomatosis

NF- κ B: Factor nuclear potenciador de la cadenas ligeras kappa de las células B activadas

NHC: Carbeno N-heterocíclico

NOC: Nitroso derivado

Nrf2: Factor nuclear derivado de eritoride 2 similar al 2

OG: Oncogen

OMS: Organización Mundial de la Salud

OX: Oxaliplatino

PBS: Tampón fosfato salino

PCNA: Antígeno nuclear de proliferación celular

PET: Tomografía por emisión de positrones

PEt₃: Trietilfosfina

PI: Ioduro de propidio

PI3K: Fosfatidilinositol 3-quinasa

PIK3CA: Subunidad catalítica alfa de la fosfatidilinositol 3-quinasa

PIK3CB: Subunidad catalítica beta de la fosfatidilinositol 3-quinasa

pRb: Proteína del retinoblastoma

PS: Fosfatidilserina

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

PTEN: Gen homólogo de fosfatasa y tensina

RAS: Oncogén homólogo a virus del sarcoma de rata

RE: Retículo endoplasmático

RIP: Complejo pro-supervivencia

RM: Resonancia magnética

RNA: Ácido ribonucleico

ROS: Especies reactivas de oxígeno

RTK: Receptor tirosina quinasa

SFB: Suero fetal bovino

SOH: Sangre oculta en heces

SPECT: Tomografía computarizada por emisión de fotón único

STK11: Serina/Treonina quinasa 11

T-L: Tipo tripsina

TLR: Receptor tipo Toll

TNB²: 2-nitro-5-tiobenzoato

TNF: Factor de necrosis tumoral

TNFR1: Receptor 1 de TNF

TNM: Tamaño-nodo-metástasis

TP53: Proteína tumoral 53

Trx: Tiorredoxina

TrxR: Tiorredoxina reductasa

Ub: Ubiquitina

UICC: Unión para el Control del Cáncer Internacional

UPS: sistema ubiquitin-proteasoma

UV: Ultravioleta

VEGF: Factor de crecimiento del endotelio vascular

ÍNDICE:

Resumen/Abstract	1
I.Introducción	4
I.1. El cáncer	4
I.1.1. El cáncer a lo largo de la historia	4
I.1.2. Clasificación	5
I.1.3. El cáncer colorrectal	7
I.2. Terapia anticancerígena	13
I.2.1. Terapia del cáncer de colon	14
I.2.2. Uso de metales contra el cáncer	16
I.2.3. Hipertermia	26
I.2.4. Extractos vegetales	29
I.3. Muerte celular	33
I.3.1. El ciclo celular	33
I.3.2. Necrosis	35
I.3.3. Apoptosis	35
I.3.4. Otras formas de muerte celular	38
I.4. Dianas intracelulares	39
I.4.1. La tioredoxina reductasa	40
I.4.2. El proteasoma	41
I.4.3. La anhidrasa carbónica	43
II. Objetivos	57
III. Material y métodos	58
III.1. Material biológico	58
III.1.1. Líneas celulares eucariotas	58
III.1.2. Cultivo celular	60
III.2. Ensayos de citotoxicidad	63
III.2.1. Evaluación de la proliferación celular mediante MTT	63
III.2.2. Evaluación de la proliferación celular mediante Resazurina	64
III.2.3. Determinación del valor IC ₅₀	64
III.3. Ensayos de actividad enzimática	65
III.3.1. Actividad TrxR	65
III.3.2. Actividad quimotripsina del proteasoma	67
III.3.3. Actividad anhidrasa carbónica	68
III.3.4. Ensayo de Bradford	68
III.4. Ensayos de determinación de los niveles de ROS intracelulares	69
III.4.1. Estudio del efecto sobre la producción de ROS	70

III.4.2. Estudio del efecto protector frente a un estrés oxidativo	70
III.5. Ensayos de citometría de flujo	70
III.5.1. Medida de la apoptosis	70
III.5.2. Tinción con yoduro de propidio para analizar el ciclo celular	72
III.5.3. Determinación de proteínas intracelulares (Cas3, p53)	73
III.5.4. Análisis de la liberación del citocromo c	73
III.5.5. Medida del potencial de membrana mitocondrial (Ψ)	74
IV. Resultados	76
IV.1. Proteasome vs thioredoxin reductase competition as possible biological targets in antitumor mixed thiolate dithiocarbamate gold(III) complexes	76
IV.2. Gold(I) complexes bearing alkylated 1,3,5-triazol-7-ylphosphadamantane ligands as thermoresponsive anticancer agents in human colon cells	133
IV.3. Sulfonamide-derived dithiocarbamate gold(I) complexes induce apoptosis of colon cancer cells by activation of caspase 3 and redox imbalance	176
IV.4. Grape stem extracts with potential anticancer and antioxidant properties	218
V. Discusión	240
VI. Conclusiones/Conclusions	246

RESUMEN

En los últimos años la incidencia del cáncer se ha disparado y se prevé que estas cifras sigan aumentando a lo largo de las próximas décadas. Además, se trata de enfermedades muy agresivas que, en muchos casos, no cuentan con un tratamiento adecuado que permita eliminar las células tumorales con los menos efectos secundarios posibles. En concreto, el cáncer colorrectal no solo es uno de los más diagnosticados, con cerca de 2.000.000 de nuevos casos al año, sino que además presenta una alta tasa de mortalidad (la supervivencia general a 5 años es de en torno al 60%). Por lo tanto, es necesario encontrar nuevas terapias que permitan aumentar esa tasa de supervivencia.

En la presente tesis se ha estudiado el potencial de diversos tipos de complejos de oro como potenciales fármacos frente al cáncer de colon, así como la influencia que los diferentes ligandos pueden tener en la actividad anticancerígena de los mismos. En una segunda vertiente del estudio, se ha querido explorar las posibilidades de extractos vegetales ricos en compuestos polifenólicos como terapias anticancerígenas y como solución a un problema medioambiental de acumulación de residuos.

En cuanto a los complejos de oro, se ha observado que complejos de oro(III) con ligandos tiolato y ditiocarbamato exhiben poder antiproliferativo frente a células de cáncer de colon humanas (Caco-2). Por otro lado, una nueva familia de complejos de oro(I) con ligandos 1,3,5-Triaza-7-fosfaadamantano (PTA) alquiladas también presentaron poder citotóxico frente a células Caco-2. Además, se observó que cuando las células incubadas con los complejos eran sometidas a un leve aumento de temperatura (hipertermia – 40 °C –) esta capacidad citotóxica se veía incrementada. Por último, se estudió la influencia de la coordinación de ligandos derivados de sulfonamidas a oro(I) en forma de ligandos del tipo ditiocarbamato, obteniendo de nuevo complejos metálicos con la capacidad de inhibir el crecimiento de las células Caco-2.

Para analizar en profundidad la citotoxicidad de los complejos de oro se realizaron diversos estudios por citometría de flujo, obteniendo en todos los casos resultados similares. El tratamiento de células Caco-2 con los complejos lleva a la parada del ciclo celular y la despolarización de la membrana mitocondrial, lo que conduce en última instancia a la muerte celular por apoptosis.

Además, el estudio de las posibles dianas intracelulares mostró que la mayoría de los complejos de oro analizados son capaces de inhibir la enzima tiorredoxina reductasa *in vitro*. Sin embargo, en el caso de los complejos de oro(III) con ligandos ditiocarbamato, la tiorredoxina reductasa no se veía afectada a nivel celular, siendo en estos casos la actividad del proteasoma la que se ve comprometida tras el tratamiento con dichos complejos. Por último, los complejos de oro(I) con ligandos ditiocarbamato derivados de bencenosulfonamidas mostraron la capacidad de inhibir la actividad de la anhidrasa carbónica IX purificada, además de la tiorredoxina reductasa.

Con respecto a los extractos vegetales ricos en polifenoles, el estudio de un extracto de raspones de uva arrojó resultados prometedores como agente antiproliferativo frente a células humanas

de cáncer colon (Caco-2) y de mama (MCF-7 y MDA-MB-231). En el caso de las tres líneas celulares el extracto rico en polifenoles es capaz de alterar el potencial de membrana y conducir a la apoptosis. Además, se observó que a concentraciones citotóxicas el extracto de raspones es capaz de aumentar el estrés oxidativo de las células cancerosas y modificar la actividad del proteasoma y la tiorredoxina reductasa.

ABSTRACT

Incidence of cancer has growth alarmingly in the last decades and is expected to continue, or even increase this tendency in the following years. In addition, cancer is a very aggressive condition with inappropriate treatments, which hardly achieve cancer total regression or lead to several side effects. Colorectal carcinoma is specifically one of the most diagnosed cancers, with around 2.000.000 new cases every year. Moreover, survival rate in 5 years is lower than desired (near to 60%), which suggests the emergency of finding new therapies that allow to decrease that mortality.

Within this thesis the anticarcinogenic effect of gold complexes against colon cancer has been studied, as well as the influence of different ligands on their anticancer properties. Secondly, the potential of polyphenolic-riched plant extracts in cancer treatment was explored. The use of plant extracts would allow overcoming with a major environmental problem such as waste accumulation.

Regarding gold complexes, new mixed thiolate-dithiocarbamate gold(III) derivatives displayed high antiproliferative effect against human colon cancer cells (Caco-2). On the other hand, a new family gold(I) complexes bearing alkylated 1,3,5-Triaza-7-phosphaadamantane ligands also proved cytotoxicity against Caco-2 cells. Moreover, this cytotoxic effect was enhanced by slightly increased temperature (hyperthermia - 40 °C). Finally, the influence of coordinating sulfonamide-derived dithiocarbamate ligands to gold(I) was analyzed. As previous gold derivatives, these complexes compromise Caco-2 cells survival, inhibiting normal cell proliferation.

Deeper analysis of gold complexes cytotoxicity was carried by flow cytometry, which threw similar results for every studied complex. The treatment of Caco-2 cell with gold derivatives drives to cell cycle arrest and mitochondrial depolarization, which finally leads to apoptosis cell death.

In addition, the study of potential intracellular targets showed that most analyzed gold complex inhibit thioredoxin reductase activity *in vitro*. However, gold(III) complexes bearing dithiocarbamate ligands do not compromise thioredoxin reductase activity in cells, whereas proteasome activity is inhibited. Finally, gold(I) complexes with sulfonamide-derived ligands exhibited the capacity to inhibit carbonic anhydrase IX activity, in addition to thioredoxin reductase.

In relation to phenolic-rich plant extracts, the study of grape stem extracts exhibited promising results as antiproliferative agent against human colon (Caco-2) and breast (MCF-7 and MDA-MB-231) cells. In three tested cell lines, treatment with the extract rich in polyphenols disrupt mitochondrial membrane potential and lead to apoptosis. In addition, cytotoxic concentrations of grape stem extracts increase oxidative stress in cancerous cells and alter proteasome and thioredoxin reductase activities.

I. INTRODUCCIÓN

1.1. El cáncer

Cáncer es un término global que comprende un conjunto de enfermedades diferentes, según el órgano y tejido de origen, pero que se caracterizan por dos procesos comunes a todas ellas: transformación celular y metástasis.

El cáncer es un trastorno derivado de la proliferación descontrolada de las células. En el proceso de transformación, o dediferenciación, las células van perdiendo su morfología y función normales a causa de alteraciones genéticas que suponen la activación de oncogenes y la pérdida de función de genes supresores de tumores, convirtiéndose en células malignas o cancerosas y resultando en un crecimiento continuado sin control. De manera general se puede considerar que las alteraciones fisiológicas derivadas de estas mutaciones y, que llevan a la transformación en células cancerosas, son la adquisición de 4 rasgos: autosuficiencia para crecer en ausencia de señales de crecimiento, insensibilidad a señales inhibitoras del crecimiento, capacidad de evasión de la muerte celular programada (apoptosis) y, por último, un potencial de replicación ilimitado [1].

A continuación, las células cancerosas adquieren la capacidad de invadir otros tejidos, proceso conocido como metástasis. Este proceso implica la transformación de las células de un carcinoma en células mesenquimales que atraviesan la lámina basal para viajar a través del torrente sanguíneo hasta el tejido secundario. Una vez allí se transforman en células epiteliales y forman una nueva masa tumoral con mayor parecido a las células de origen que a las células del tejido en que se han establecido.

El cáncer es una de las enfermedades más preocupantes en el mundo actual, ya que su elevada incidencia y tasa de mortalidad la sitúan como una de las principales causas de muerte en todos los países del mundo. Según datos de la OMS, en 2019 el cáncer supuso un total de 9.296.641 muertes (16,78% del total) y era una de las dos primeras causas de muerte antes de los 70 años en 112 de 183 países estudiados, la mayoría de los cuales se encuentran en Europa, Asia, América y el norte de África [2]. Estos datos sugieren una asociación de esta enfermedad con el envejecimiento de la población y ciertos factores de riesgo ligados a aspectos culturales y socioeconómicos que derivan en una incidencia y mortalidad mayores en los países más desarrollados.

1.1.1. El cáncer a lo largo de la historia

El cáncer no sólo ha acompañado al ser humano a lo largo de toda su historia, como demuestra el hallazgo de tumores de hueso en momias y fósiles en todo el planeta [3,4], sino que diversos estudios paleontológicos sugieren la existencia de tumores en animales desde tiempos prehistóricos, antes de la aparición de los humanos en la Tierra [5,6]. La primera referencia escrita al cáncer se encuentra en el Papiro de Edwin Smith, que fue descubierto en Egipto y data,

aproximadamente, del año 3000 a.c. Se trata de una reproducción de un antiguo tratado egipcio sobre cirugía que recoge el diagnóstico y tratamiento de diferentes lesiones traumáticas. Entre éstas, se describen algunas lesiones de pecho que incluyen casos de cáncer, en los que se explica la presencia de tumores y la ausencia de un tratamiento para esta enfermedad [7]. El papiro Ebers es otro tratado médico del antiguo Egipto redactado cerca del año 1500 a.c. y ofrece la primera descripción de un tumor de tejido blando, un tumor graso. Además, incluye referencias a pólipos nasales, anales y uterinos y a tumores de piel, tiroides, faringe, estómago, recto y cérvix uterino [8].

Siglos más tarde, los griegos, con Hipócrates como máximo representante, le confirieron al cáncer un origen natural, racionalizando sus posibles causas y aplicando tratamientos diferentes en función del tipo de cáncer descrito. Es en este momento cuando se establece el origen de los términos *carcinoma*, que Hipócrates utilizó para definir tumores malignos, y *carcinos* (cangrejo en griego), acuñado para los tumores malignos ulcerados, ya que el crecimiento canceroso recordaba a un cangrejo moviéndose. La evolución hasta el término actual cáncer se completa cuando Celso (25 a.c. – 50 d.c.), un influyente médico romano que describió el tratamiento con ungüentos para carcinomas superficiales y la cirugía para diferentes tumores viscerales, traduce del griego *carcinos* al latín *cancer* [9].

Con el colapso del imperio romano el centro del conocimiento médico se estableció en Bagdad y fue reubicándose a lo largo de la historia de la mano de las grandes civilizaciones. Sin embargo, el progreso realizado por todos los grandes médicos de las antiguas civilizaciones se vio limitado, retrocediendo con la caída de los grandes imperios y condicionado por sus creencias religiosas. No fue hasta el periodo renacentista que se efectuó un progreso destacable en la medicina y el tratamiento del cáncer [10].

El último gran avance tiene lugar en el siglo XX. En primer lugar, a raíz del descubrimiento de la estructura del DNA por Watson y Crick, que permitió la identificación de diferentes oncogenes y genes supresores de tumores y estableció la influencia genética en el desarrollo del cáncer, abandonando así las teorías antiguas sobre sus posibles causas (desde el origen humoral defendido por Hipócrates hasta el traumático apoyado en el siglo XIX, pasando por teoría de la linfa del siglo XVII o las causas parasitarias del XVIII) [11]. En segundo lugar, el desarrollo científico y tecnológico a lo largo del siglo pasado permitió abandonar los tratamientos clásicos para introducir nuevos métodos más fiables como la quimioterapia, la cirugía moderna, la radioterapia o la inmunoterapia [11].

1.1.2. Clasificación

En una aproximación general se distingue entre cánceres líquidos y cánceres sólidos. Los primeros, son aquellos que se desarrollan en los tejidos líquidos, fluidos corporales como la sangre o la médula ósea, y se caracterizan por la ausencia de una masa celular. Los cánceres sólidos, por el contrario, son aquellos caracterizados por la presencia de una masa anormal de células, o tumor, con ausencia de áreas líquidas.

En una clasificación más profunda, se puede definir los diferentes tipos de cáncer desde un punto de vista histológico, en función del tejido en el que se desarrolla en origen. Atendiendo a este rasgo, se definen 5 categorías principales: carcinoma, sarcoma, mieloma, linfoma y leucemia. El carcinoma hace referencia a aquellos cánceres de origen epitelial y a su vez se subdividen en adenocarcinomas, propios de órganos y glándulas, y carcinomas de células escamosas, que se desarrollan en el epitelio escamoso. El sarcoma tiene su origen en los tejidos conectivo y de soporte como el hueso, el músculo, o el tejido graso [12]. El linfoma se origina en el tejido linfático, el mieloma surge en las células plasmáticas de la médula ósea y la leucemia procede de los tejidos que forman la sangre.

Por último, se puede nombrar el cáncer según su lugar de procedencia, es decir, el órgano en el que ha comenzado su desarrollo. Bajo esta denominación destacan, por su prevaencia, los cánceres de pulmón, colorrectal, de estómago, de mama, de próstata, de hígado, y de cuello uterino (figura 1).

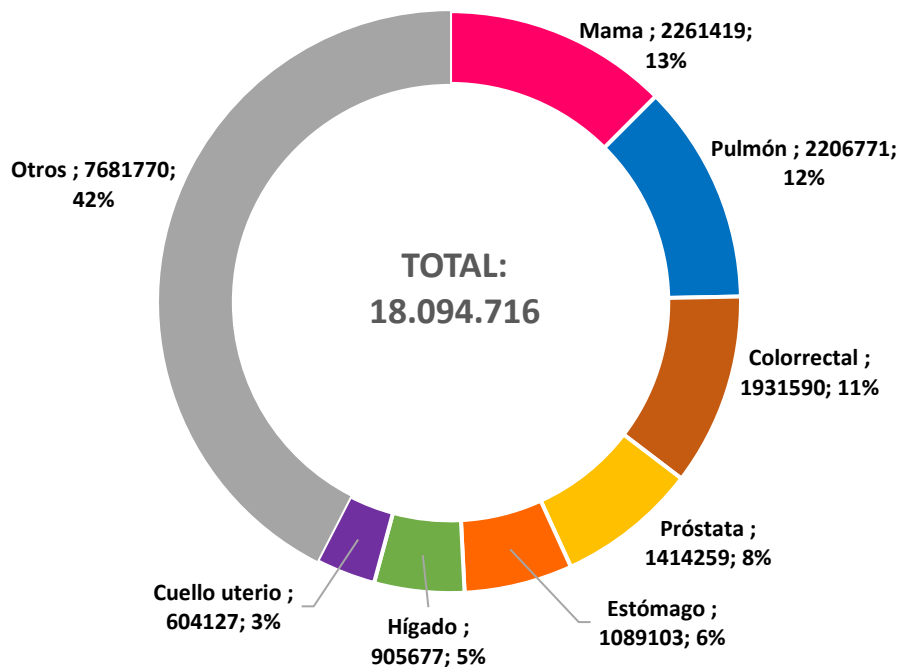


Figura 1: estimación de nuevos casos diagnosticados (incidencia) de cada tipo de cáncer en el año 2020 a nivel mundial según la OMS.

En cuanto a la patología y extensión en el organismo de un tumor maligno, la clasificación TNM (Tamaño-Nodo-Metástasis) de la Unión para el Control del Cáncer Internacional (UICC) evalúa el alcance del tumor primario (T), la extensión a los nódulos linfáticos de la región (N) y la presencia de metástasis (M). Cada una de estas tres categorías tiene asociados varios números que determinan el estadio del tumor. Esta clasificación permite conocer el diagnóstico del paciente, elegir el tratamiento adecuado y desarrollar estudios epidemiológicos y recolección de datos de todo el mundo [13].

1.1.3. El cáncer colorrectal

Como se ha explicado en los puntos anteriores, el cáncer puede aparecer en cualquier tejido, adquiriendo en cada caso características específicas que lo diferencian de los propios de otros órganos. El cáncer colorrectal (CCR) en concreto es un adenocarcinoma, por lo tanto, propio de células epiteliales, y que en este caso se desarrolla en la mucosa del intestino grueso [14]. El CCR sufre un proceso de carcinogénesis progresivo comenzando como un pólipo adenomatoso intestinal benigno que degenera hasta convertirse en un adenoma con displasia (presencia de células que, aunque no son cancerosas, presentan una morfología anormal) de alto grado y de ahí a un adenocarcinoma invasivo que, finalmente, metastatiza otros órganos [15,16] (figura 2).

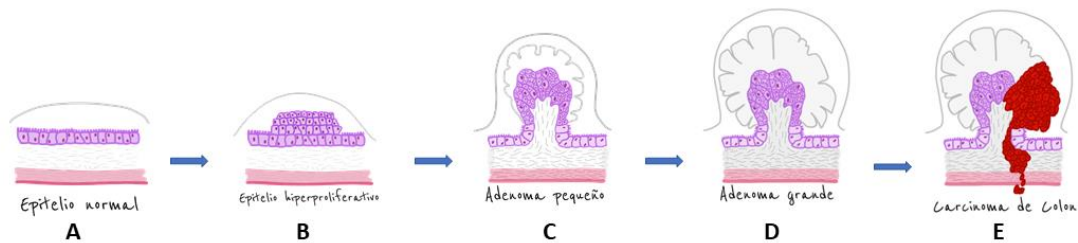


Figura 2. Proceso de carcinogénesis por el que el epitelio (A) comienza a sufrir la hiperproliferación de los enterocitos (hiperplasia) (B). Esta proliferación descontrolada da lugar a un pólipo adenomatoso benigno (C), pero con la acumulación de mutaciones, estas células hiperplásicas comenzarán a perder su morfología normal, convirtiéndose en un pólipo adenomatoso con un alto grado de displasia (D). En la última etapa de la carcinogénesis se origina el adenocarcinoma con capacidad invasiva (E).

1.1.3.1. Etiología. Factores de riesgo

El cáncer de colon se asocia a la aparición de mutaciones en un amplio grupo de genes entre los que destacan diversos oncogenes (OGs) y genes supresores de tumores (GSTs). Cuando se produce un desequilibrio entre la función de los GSTs y la regulación de los OGs se pierde el control del crecimiento celular. Se puede establecer una relación entre alteraciones específicas en OGs y GSTs y cada una de las etapas de la progresión adenoma-carcinoma propia de la carcinogénesis del CCR [15,17]. Entre los principales GSTs que se ven modificados en el CCR encontramos *APC* (adenomatous polyposis coli) y *TP53* (proteína tumoral 53) y los OGs más frecuentemente alterados son *KRAS* (oncogén homólogo a virus Kristen del sarcoma de rata), *BRAF* (fibrosarcoma acelerado rápidamente B), *PIK3CA* (subunidad catalítica alfa de la fosfatidilinositol 3-quinasa) y *MYC* (oncogen viral homólogo de mielocitomatosis). Las mutaciones en estos genes pueden darse en la línea germinal, originando los casos de cáncer de colon hereditario, o aparecer de forma espontánea en las células somáticas de la mucosa intestinal, dando lugar a los casos de CCR conocidos como esporádicos.

APC codifica para una proteína que actúa como regulador negativo de la cascada de señalización WNT, una ruta de señalización altamente conservada en todas las especies de animales multicelulares y encargada de regular procesos tales como la proliferación, la diferenciación o la migración celular entre muchos otros [18]. Por lo tanto, *APC* es un importante gen supresor

de tumores cuya pérdida de función conduce a la transformación de las células del intestino grueso.

TP53 codifica para la proteína p53, cuya función principal consiste en regular la transcripción de genes implicados en el control del ciclo celular y la apoptosis. Por lo tanto, una pérdida de función de p53 provocaría un desequilibrio en el ciclo celular, que no se detendría a pesar de que la célula se vea sometida a diferentes estreses, y evitaría la entrada de las células cancerosas en procesos apoptóticos. Se estima que alrededor del 60% de los casos de CCR presentan la proteína p53 mutada. Además de la pérdida de función como supresor de tumores de p53, se ha observado que algunas mutaciones sin sentido en *TP53* pueden inducir la adquisición de funciones oncogénicas en p53 [19].

KRAS es la isoforma de los genes *RAS* (*KRAS*, *NRAS* y *HRAS*) que prevalece en el cáncer de colon. Este gen, que codifica para una proteína de la familia Ras, se encuentra mutado en aproximadamente el 45% de los casos de CCR [20]. Ras es un intermediario en la ruta de señalización MAPK (proteínas quinasas activadas por mitógenos), que se activa a través de la unión a un receptor tirosina quinasa (RTK) como el EGFR (receptor del factor de crecimiento epidérmico), impulsando la transducción de señales a través de fosforilaciones sucesivas en una cascada de proteína-quinasa (Raf-MEK-ERK) desde el receptor de superficie hasta el interior celular para modular el crecimiento celular y la diferenciación. Las formas mutadas de *KRAS* dan lugar a la acumulación de Ras en su forma activa, ya que pierde la sensibilidad a GAP, la proteína encargada de devolverla a su forma inactiva [21]. Por lo tanto, la acumulación de Ras activa da lugar a una constante transducción de señales de supervivencia, proliferación y metástasis, promoviendo así la carcinogénesis.

Dentro de la cascada de señalización de EGFR, en la etapa posterior a Ras, se encuentra B-Raf (Raf quinasa tipo B). La mutación V600E en el gen **BRAF** está presente en el 5-10% de los CCRs [22]. V600 es necesaria para que B-Raf se mantenga inactiva en la ausencia de señales de activación por parte de Ras, por lo que mutaciones en este aminoácido dan lugar a la fosforilación constante de ERK, efector final, manteniendo activa esta vía de transducción de señales de forma constitutiva [23].

Además de la ruta de las MAPK (Raf-MEK-ERK), Ras también activa una segunda ruta en la que PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase) es el segundo efector que acaba con la activación de mTOR y estimula la síntesis de proteínas que promueven el crecimiento celular. La ruta PI3K se puede ver regulada al alza debido a mutaciones en los genes *PIK3CA*, que codifica para la subunidad catalítica con actividad quinasa p110 α y *PIK3CB* que codifica la subunidad catalítica p110 β [24,25], transmitiendo señales de proliferación y supervivencia celular que promueven la carcinogénesis.

c-Myc es una de las tres fosfoproteínas codificada por la familia de genes **MYC** y su expresión se ve aumentada en el 70-80% de los casos de CCR. La proteína c-Myc actúa como modulador de la expresión de hasta el 15% de los genes, uniéndose a las secuencias consenso E-box de sus regiones promotoras y, por lo tanto, aumentando su expresión [26]. Los genes cuya transcripción

está regulada por c-Myc están involucrados en varios procesos celulares incluyendo la supervivencia, el ciclo celular, la síntesis de proteínas, la adhesión celular y expresión de RNA no codificante [27].

Además, se ha reportado que la expresión de miRNAs frecuentemente se ve alterada, tanto al alza como a la baja, en el tejido canceroso colorrectal en comparación a la mucosa normal. Los miRNAs son moléculas pequeñas de RNA que no codifican proteínas, y cuya función es la regulación de la expresión génica, bien mediante la inhibición de la traducción postranscripcional o bien por la degradación del mRNA. De esta manera, los miRNAs podrían influir en la regulación de la proliferación celular y la apoptosis, siendo parte de las rutas celulares reguladas por los GSTs y los OGs. Se ha observado que existen diversos miRNAs que interactúan con GSTs y OGs mediando en los procesos de carcinogénesis [28].

Como se recoge en un capítulo en el que participó el autor de la presente tesis doctoral, y cuyos puntos principales se exponen a continuación, atendiendo a la causa de estas mutaciones podemos diferenciar entre factores de riesgo modificables y factores de riesgo no modificables. Aquellos factores de riesgo que dependen del paciente y que derivan del estilo de vida se corresponden a los factores de riesgo modificables como la dieta, la actividad física o el consumo de sustancias cancerígenas (alcohol y tabaco). Sin embargo, las mutaciones también pueden ser consecuencia de factores ineludibles, es decir, los factores de riesgo no modificables como las alteraciones genéticas en la línea germinal o la presencia de enfermedades previas [29].

1.1.3.1.1. Factores de riesgo no modificables

Dentro de los factores de riesgo no modificables se puede diferenciar entre los primarios y los secundarios. Los trastornos genéticos hereditarios y, por lo tanto, inherentes al paciente y causa directa de las mutaciones, comprenden los factores de riesgo no modificables primarios. En los secundarios, las mutaciones son consecuencia indirecta de otro trastorno preexistente como la enfermedad intestinal inflamatoria (EII).

Los factores de riesgo no modificables primarios son responsables de una proporción muy baja del total de los casos de CCR [30]. Entre los trastornos hereditarios principales que predisponen al desarrollo del cáncer de colon encontramos el síndrome de Lynch y los síndromes de poliposis adenomatosa, poliposis hamartomatosa y poliposis serrada.

El síndrome de Lynch se caracteriza por la ausencia de pólipos y es la principal causa de cáncer de colon entre los trastornos hereditarios. Los tumores asociados a este síndrome presentan inestabilidad microsatelital (MSI) como consecuencia de las mutaciones en los genes del mecanismo de reparación de desajustes (MMR -Mismatch Repair-) que conllevan errores en la reparación de los desajustes de las parejas de bases durante la replicación del DNA. Algunos de estos genes pertenecientes al MMR actúan como genes supresores de tumores y se encuentran mutados en pacientes con síndrome de Lynch son *MLH1* (proteína homóloga-1 de MutL), *MSH2* (proteína homóloga-2 de MutS), *MSH6* (proteína homóloga-6 de MutS) o *EPCAM* (molécula de adhesión celular epitelial) [31].

Entre los trastornos de poliposis, es decir, caracterizados por la presencia de pólipos en la luz intestinal, destaca la poliposis adenomatosa familiar (FAP), responsable de aproximadamente el 1% de los casos de CCR diagnosticados [32]. Este síndrome está causado por mutaciones germinales en el gen *APC*, uno de los genes que más frecuentemente se encuentra alterado en el cáncer de colon, no sólo por las mutaciones en la línea germinal que provocarían la FAP, sino también por alteraciones genéticas somáticas en un gran número de casos de cáncer de colon esporádico [33]. En segundo lugar, encontramos los síndromes de poliposis hamartomatosa como el síndrome de poliposis juvenil, causado por polimorfismos en los genes *BMPR1A* (receptor 1 A de la proteína ósea morfogenética) y *SMAD4* (Mothers Against Decapentaplegic homolog 4) [34]; el síndrome de Peutz-Jeghers, causado por mutaciones en el gen de la serina/treonina quinasa 11 (*STK11*) [35] y el síndrome de hamartoma tumoral PTEN, causado por mutaciones en el gen supresor de tumores *PTEN* (homólogo de fosfatasa y tensina) [36]. Por último, el síndrome de poliposis serrada, cuyas bases genéticas se desconocen [37].

La EII engloba dos patologías, la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa, y supone el principal factor de riesgo no modificable secundario. Estos trastornos preexistentes cambian el microambiente colorrectal, aumentando la susceptibilidad de las células a experimentar procesos de transformación a través de tres procesos: disbiosis, inflamación crónica y estrés oxidativo. Como respuesta a los procesos de inflamación, las células epiteliales del colon activan una serie de rutas metabólicas gobernadas por NF- κ B (factor nuclear potenciador de la cadenas ligeras kappa de las células B activadas) y COX-2 (ciclooxigenasa 2) que promueven la expresión de factores antiapoptóticos y proangiogénicos que facilitan la transformación celular [38]. El desequilibrio redox crónico que sufren las células del colon como consecuencia de la respuesta inmunitaria en EII daña el DNA de estas células aumentando el riesgo de mutaciones en genes implicados en carcinogénesis [39]. Por último, la disbiosis propia de estos trastornos incrementa el número de bacterias proinflamatorias que no sólo favorecen la inflamación intestinal, sino que producen toxinas carcinógenas [40].

I.1.3.1.2. Factores de riesgo modificables

Entre estos destacamos unos cuantos. En este caso no solo hablamos de factores que pueden aumentar el riesgo de padecer la enfermedad o ayudar a la transformación de las células, sino que hay factores que pueden ayudar a la prevención. Dieta, consumo de fibra y carnes rojas (bueno/malo), consumo de sustancias tóxicas y cancerígenas como el tabaco y el alcohol.

La dieta está estrechamente relacionada con la incidencia del CCR como demuestran numerosos estudios epidemiológicos a lo largo del mundo [41] y viene determinada por dos factores: el consumo de alimentos potencialmente dañinos y la ausencia de alimentos protectores. De este modo, el consumo habitual de alimentos ricos en grasa o carne roja está ligado a un aumento del riesgo de desarrollar CCR [42,43]. Sin embargo, también se puede prevenir la aparición de CCR mediante dietas ricas en alimentos con un alto contenido de fibra (frutas, verduras y cereales integrales) como la mediterránea o la nórdica.

La dieta occidental es un patrón dietético cada vez más extendido a lo largo de todo el mundo debido a la globalización y que se caracteriza por la abundancia de alimentos ultraprocesados. El alto contenido en grasas y azúcares de estos alimentos induce a la inflamación y disbiosis del intestino, promoviendo por lo tanto la aparición de CCR [44]. Uno de los elementos principales que hacen de la carne roja un factor de riesgo frente al desarrollo del CCR son los nitroso derivados (NOCs por sus siglas en inglés).

Por otro lado, la fibra de los alimentos de origen vegetal podría tener un efecto preventivo en la aparición del CCR ya que contribuye a acelerar el tránsito gastrointestinal e incrementar la cantidad de heces, lo que disminuye la exposición de la mucosa intestinal a los posibles carcinógenos [45]. Además, ayuda a disminuir los problemas de estreñimiento, que están relacionados con un incremento en el riesgo de padecer CCR [46]. La fibra también puede actuar reduciendo las sales biliares secundarias, bien mediante su unión directa o bien por la alteración del metabolismo de las mismas por parte del microbioma intestinal, reduciendo los niveles de ROS (especies reactivas de oxígeno) y previniendo la inflamación [45]. Por último, la fibra puede actuar sobre el microbioma intestinal, promoviendo la formación, a través de la fermentación de los componentes de la fibra, de diversos productos beneficiosos para la integridad intestinal. Entre estos destacan ácidos grasos de cadena corta como el butirato que modula la expresión de diversos genes implicados en la carcinogénesis y la progresión tumoral mediante la acetilación de histonas en sus regiones promotoras [47]. La fibra también puede alterar la microflora, aumentando la presencia de algunas especies como *Bifidobacterium* o *Lactobacterium* que se asocian a la prevención del CCR [29].

La actividad física es otro de los factores de riesgo modificables que existen, ya que un estilo de vida sedentario está estrechamente relacionado con un aumento de las probabilidades de desarrollar CCR. Además, mayores grados de actividad física en el tiempo libre se han asociado a un menor riesgo de padecer CCR [48]. Los efectos beneficiosos del ejercicio físico a la hora de prevenir el CCR vienen dados por la mejora del microambiente intestinal [49], la mejora del estreñimiento [50] y la ayuda en la gestión de la obesidad y los problemas derivados de sus síntomas [51].

Por último, el consumo de sustancias cancerígenas como el alcohol [52] o el tabaco [53] también pueden aumentar el riesgo de sufrir cáncer de colon. La presencia de hidrocarburos policíclicos aromáticos en el humo del tabaco -el 4-(metilnitrosamino)-1-(3-piridil)-1-butano- derivado de la nicotina y la propia nicotina son sustancias relacionadas con un mayor riesgo de padecer CCR [29]. En cuanto a las bebidas alcohólicas, muchos de los metabolitos que se producen durante la metabolización del etanol han sido identificados como pro-carcinogénicos. Entre estos destaca el acetaldehído que promueve la ruptura de las *tight junctions* de las células epiteliales del intestino, aumentando la permeabilidad paracelular [54]. Además, el acetaldehído está relacionado con el aumento de los niveles de ROS e inflamación en la mucosa colorrectal, así como con el daño del DNA, ya que impide su síntesis y reparación [55].

I.1.3.2. Diagnóstico

Debido a que el proceso de carcinogénesis progresivo del CCR es lento y asintomático, el diagnóstico temprano es clave para un mejor pronóstico. La detección del tumor en las primeras etapas del proceso adenoma-carcinoma facilita su eliminación o tratamiento, evitando que evolucione en un adenoma con displasia de alto grado y se origine el carcinoma, o, en el peor de los casos, metastatice a otros tejidos, momento en el que la tasa de recuperación total decae significativamente.

Cuando el CCR se encuentra en estadios tempranos, la tasa relativa de supervivencia a 5 años es del 90% aproximadamente, pero sólo 4 de cada 10 casos son detectados en esa etapa inicial [56]. Por lo tanto, muchos países han desarrollado programas de detección, efectuando pruebas para identificar la presencia de pólipos o CCR en etapas iniciales en personas que no presentan síntomas. Estos programas de detección sistemática se efectúan en población con un riesgo medio de desarrollar CCR. Considerando la edad el factor de riesgo principal en ausencia de antecedentes personales o familiares, en Europa se recomienda efectuar estas pruebas de cribado en mayores de 50 años, de forma periódica cada 12-24 meses, hasta aproximadamente los 75 años. Además, estas estrategias de detección se convierten en un sistema de prevención del CCR, ya que algunas pruebas permiten eliminar los pólipos y adenomas antes de que se desarrolle el carcinoma, proceso que puede llevar entre 10 y 15 años. [57,58]. Los programas de cribado suelen incluir una prueba de sangre oculta en las heces y una endoscopia de confirmación, bien una colonoscopia o una sigmoidoscopia [59].

En los casos en los que los pacientes presentan síntomas, ante la sospecha de CCR se efectúan una serie de pruebas previas entre las que se encuentran la exploración clínica, la prueba de sangre oculta en las heces (test de SOH) y los análisis sanguíneos para la detección de marcadores tumorales o alteraciones enzimáticas relacionadas con el CCR. Posteriormente, el paciente se somete a las pruebas radiológicas, siendo la colonoscopia convencional óptica la prueba de referencia hasta el momento, ya que permite una visualización directa a la vez que ofrece la posibilidad de resear pólipos y tomar muestras de biopsia para el diagnóstico definitivo [59]. Sin embargo, en los últimos años han aparecido otras pruebas de diagnóstico por imagen menos invasivas y dificultosas que la colonoscopia convencional. Entre estas nuevas alternativas destacan el enema de bario de doble contraste y, principalmente, la colonografía por tomografía computarizada (colonoscopia virtual) con una sensibilidad similar para la detección de CCR y pólipos y que goza de una mayor aceptación por parte del paciente [59].

I.1.3.3. Impacto en la sociedad

De acuerdo con los datos estimados por la OMS en su informe de 2019, el cáncer colorrectal es el segundo tipo de cáncer que más muertes causa a lo largo del mundo, por detrás de los cánceres de las vías respiratorias (tráquea, bronquios y pulmón), siendo responsable de 916.000 muertes (1,7% de las muertes totales) y situándose como la decimoquinta causa de muerte en el mundo. Además, es destacable el aumento en su impacto sobre la mortalidad a lo largo del

siglo XXI, ya que en el año 2000 el cáncer colorrectal se situaba como la decimonovena causa de muerte global, suponiendo un 1,2% de las muertes totales (597.000) y el tercer tipo de cáncer que más muertes acarrea [60].

Este impacto sobre la salud global que supone el cáncer de colon se debe a una combinación de dos factores: una alta incidencia (tercer cáncer más diagnosticado tras el de mama y el de pulmón) y una alta tasa de mortalidad. Por lo tanto, resulta de gran importancia derivar esfuerzos e investigación para mejorar los métodos de cribado y diagnóstico que ayuden, como se ha explicado en el apartado anterior, a una detección temprana que permita erradicar el tumor más fácilmente. Sin embargo, solo con eso no es suficiente, ya que la agresividad del cáncer colorrectal, junto con la ausencia de terapias adecuadas y la resistencia desarrollada ante estas, hace que incluso con un diagnóstico adecuado a veces sea difícil acabar con el tumor. Por lo tanto, urge encontrar nuevas terapias que aumenten la eficacia de las actuales a la hora de acabar con el tumor a la vez que se reducen los efectos secundarios sobre el organismo [61].

1.2. Terapia anticancerígena

Existen una gran variedad de tratamientos contra el cáncer, en función del tipo, el estadio en el que se encuentre y otros factores como el perfil genético (principales oncogenes o genes supresores de tumores alterados contra los que se puede dirigir la terapia):

Cirugía: se trata del tratamiento más antiguo y consiste en la extirpación del tumor y, en algunos casos, tejido circundante, mediante una intervención quirúrgica. La principal contraindicación de este tipo de intervenciones es el alto grado de invasión que presentan, debido a la dificultad para llegar hasta determinados tipos de tumores. Con la ayuda de la tecnología moderna se está trabajando en nuevas aproximaciones menos invasivas que no solo disminuyan el impacto sobre el paciente, mejorando el postoperatorio, sino que además aumenten la precisión y eficiencia de la cirugía para lograr unos resultados más favorables [62].

Quimioterapia: se basa en el uso de sustancias químicas, conocidas como fármacos o agentes quimioterapéuticos, para el tratamiento de una enfermedad, en este caso el cáncer. Al contrario que la cirugía, considerada como un tratamiento local, la quimioterapia actúa a nivel sistémico y su objetivo es erradicar el tumor o, al menos, reducir la carga tumoral y por lo tanto los síntomas relacionados con el cáncer. Aunque en ocasiones es utilizada como única terapia, normalmente se administra como terapia adyuvante de manera que los agentes quimioterapéuticos se utilizan para combatir las posibles células cancerosas que queden tras la cirugía, sobre todo en los casos en los que existen metástasis difíciles de eliminar [63,64].

Radioterapia: es otra de las terapias principales, siendo utilizada para el tratamiento de más de la mitad de los casos de cáncer. Consiste en la aplicación de una radiación ionizante (rayos X) sobre el tumor, dañando el DNA de las células cancerosas, lo que inhibe el crecimiento y división celular para acabar destruyéndolas. Sin embargo, las células

sanas que rodean al tumor también pueden verse afectadas, por lo que esta terapia conlleva numerosos efectos secundarios en el paciente. Al igual que la quimioterapia, la radioterapia también suele usarse bien antes o después de la resección quirúrgica para facilitar la eliminación total del tumor [65-67]. Además, la radioterapia se puede usar en combinación con quimioterapia, en un régimen conocido como quimiorradioterapia.

Bioterapia: Bajo el término bioterapia se incluye a una serie de estrategias que se basan en el uso de sustancias biológicas, bien producidas por el organismo o sintetizadas en un laboratorio, con el objetivo de destruir las células cancerosas. Dentro de la bioterapia encontramos diferentes mecanismos por los que pueden actuar los agentes bioterapéuticos, como pueden ser la modulación de la respuesta inmunitaria, la regulación de los procesos tumorales de transformación y metástasis o la mejora de la respuesta frente a las diferentes terapias anticancerígenas. La inmunoterapia recoge aquellas estrategias que tratan de modificar la respuesta inmune del individuo frente al tumor, como el aumento de la defensa inmune con el uso de sustancias biológicas o sus derivados químicos que actúan como efectores o mediadores de la respuesta antitumoral; la regulación (aumento o disminución) de la respuesta inmune mediante fármacos inhibidores de puntos de control inmunitarios; o la estimulación de una mayor respuesta inmune o de la sensibilidad de las células tumorales mediante el uso de células tumorales modificadas o vacunas. Para evitar el crecimiento tumoral y metástasis, se pueden usar regímenes de bioterapia que disminuyan la transformación celular y/o aumentan la diferenciación de las células tumorales, así como disminuir o bloquear los factores de crecimiento y pro-angiogénicos producidos por el tumor. Por último, se puede mejorar la predisposición o tolerancia del paciente a las terapias citotóxicas aumentando tanto la capacidad de resistir los efectos adversos como la efectividad de la actividad antitumoral citostática y citopática de las terapias antitumorales [68]. Una parte muy importante de la bioterapia incluye a los anticuerpos monoclonales, anticuerpos hechos a partir de clones de una única célula B que, gracias a su capacidad de unirse específicamente a su región antigénica complementaria (epítipo), se pueden dirigir a la diana tumoral o inmune deseada desencadenando los mecanismos previamente explicados [69].

1.2.1. Terapia del cáncer de colon

En el caso del cáncer de colon, el primer paso cuando se detecta en etapas tempranas durante las pruebas de cribado es la extirpación de los pólipos (polipectomía) o adenomas. La polipectomía simple se puede realizar de manera sencilla con ayuda de un colonoscopio. En el caso de que la displasia no esté contenida dentro de un pólipo y el CCR se encuentre en etapas más avanzadas, extendido a lo largo del colon o recto e incluso a otros órganos, existen técnicas de cirugía más invasivas (laparotomía y laparoscopia) en las que se extirpa el segmento del intestino en el que se encuentra el tumor, así como los ganglios linfáticos regionales y las lesiones metastásicas si existen (resecciones estandarizadas) [58].

En estadios avanzados en los que el cáncer se ha extendido más allá de la submucosa intestinal, invadiendo la capa muscular intestinal e incluso los órganos que lo rodean, aunque la cirugía es el tratamiento principal, esta se suele combinar con quimioterapia o quimiorradioterapia, antes o después de la resección del tumor, bien para disminuir su tamaño y facilitar su eliminación o bien para evitar que reaparezca una vez extirpado. El tratamiento quimioterapéutico principal para el cáncer colorrectal son las fluoropirimidinas, entre las que destaca el 5-fluorouracilo (5-FU), que suelen administrarse junto con leucovorina (LV), un derivado del ácido fólico que interrumpe la síntesis de DNA y aumenta la eficiencia del 5-FU. Las fluoropirimidinas pueden administrarse en monoterapia o en politerapia, en combinación con otros fármacos. Los principales fármacos de poliquimioterapia son el irinotecán (IRI), la capecitabina (CAP) y el oxaliplatino (OX) [58] (figura 3).

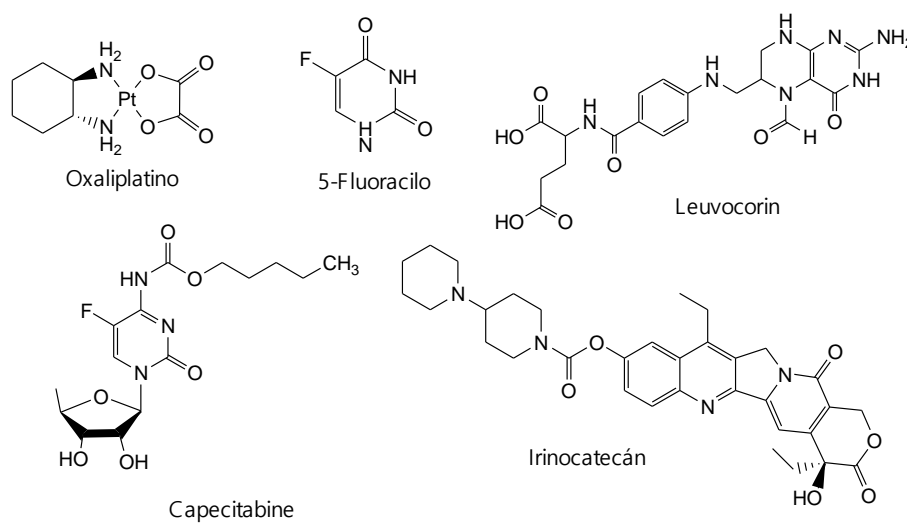


Figura 3. Estructura de los diferentes agentes quimioterápicos empleados en el CCR.

Para algunos casos muy avanzados en los que se considera que la extirpación de la metástasis es imposible se pueden optar por regímenes de bioterapia, normalmente en combinación con quimioterapia. Entre los principales agentes usados en bioterapia se encuentran bevacizumab, cetuximab, panitumumab, ramucirumab, aflibercept y regorafenib. Estos fármacos se tratan en su mayoría de anticuerpos monoclonales o proteínas recombinantes que se dirigen específicamente contra determinadas proteínas celulares como el EGFR o el VEGF (factor de crecimiento del endotelio vascular), inhibiendo el crecimiento celular y el desarrollo de los vasos sanguíneos que irrigan el tumor. En los últimos años la FDA ha aprobado el uso de nuevos fármacos de bioterapia como pembrolizumab, nivolumab, ipilimumab o encorafenib, muchos de los cuales se dirigen contra proteínas como PD-1 o CTLA-4 que activan la respuesta inmune mediada por células T, aunque su uso en clínica aún no está tan extendido [58,70,71].

Sin embargo, a pesar de todos estos tratamientos, como ya se ha explicado en el punto I.1.3.3., el impacto del cáncer de colon en la sociedad sigue siendo muy alto, no solo por su elevada incidencia, sino también por la ausencia de terapias más efectivas y/o seguras para el paciente. Por lo tanto, se deben destinar grandes esfuerzos a la búsqueda de nuevas estrategias que solucionen estos problemas y así lograr disminuir la mortalidad de los pacientes con CCR.

1.2.2. Uso de metales contra el cáncer

La aplicación farmacológica de iones metálicos para el tratamiento de diferentes enfermedades y dolencias ha estado presente desde tiempos antiguos, siendo común a todas las diferentes culturas y civilizaciones a lo largo de la historia de la medicina. El uso del mercurio, por ejemplo, está recogido en antiguos tratados médicos griegos, indios, persas, árabes y, sobre todo, chinos [72]. En Europa, las sales de mercurio (principalmente HgCl_2 y Hg_2Cl_2) se usaron desde el siglo XVI para el tratamiento de la sífilis, así como, a partir del siglo XVIII, diferentes compuestos de mercurio se usaron como diuréticos y laxantes, en píldoras para algunas enfermedades crónicas y en ungüentos y apósitos para lesiones cutáneas [73]. Otros metales, como el plomo [74] o el arsénico también han sido utilizados con diferentes propósitos desde la medicina tradicional de numerosas civilizaciones hasta la actualidad, en la que el trióxido de arsénico forma parte del tratamiento de la leucemia promielocítica aguda [75].

Las principales ventajas del empleo de los complejos metálicos en medicina son su diversidad biológica y química, de la que no suelen disponer las moléculas orgánicas puras. En primer lugar, poseen una gran diversidad de geometrías que incluyen plano cuadradas, trigonal piramidal, octaédricas entre otras dependiendo del centro metálico, que dotan a los complejos de una amplia gama de actividades en procesos biológicos. Además, los iones metálicos tienen características fisicoquímicas únicas, tales como la posibilidad de presentarse en varios estados de oxidación, que pueden hacer que presenten un comportamiento redox y muestren nuevos mecanismos de acción en los procesos biológicos [76,77]. Por otro lado, la existencia de complejos luminiscentes puede ejercer un potencial de diagnóstico con excelentes características ópticas [78,79]. De hecho, algunos complejos ya han sido empleados ampliamente como agentes de contraste en resonancia magnética (RM), tomografía por emisión de positrones (PET) y tomografía computarizada por emisión de fotón único (SPECT) [80,81].

Por otro lado, hay que tener en cuenta el papel que ejercen los ligandos unidos al centro metálico. De forma sinérgica, los ligandos también contribuyen considerablemente a las actividades farmacológicas de los metalofármacos, de modo que una modificación de los mismos puede cambiar además la termodinámica y cinética asociada al metal, en beneficio de su actividad biológica.

Uno de los metales más ampliamente usado como agente antiproliferativo es el platino. El primer derivado de este metal aprobado por la FDA (Food and Drug Administration) para su uso en terapia clínica fue el conocido como *cisplatino* ($\text{cis-}[\text{PtCl}_2(\text{NH}_3)_2]$; *cis*-diaminodicloroplatino(II)), cuya estructura se recoge en la figura 4. El cisplatino es capaz de inhibir el crecimiento de las células cancerosas debido a su capacidad para inhibir la síntesis y reparación del DNA por modificaciones de su estructura tridimensional. Se viene empleando para tratar el cáncer de testículos, útero y tumores genito-urinarios, pero presenta graves efectos secundarios tales como toxicidad renal, hepática y sordera [82].

A partir del cisplatino, se comenzó la búsqueda de compuestos metálicos alternativos con menor resistencia tumoral y menos efectos secundarios (mayor selectividad), mejorando sus

características anticancerígenas, farmacodinámicas y farmacocinéticas. Se desarrollaron así complejos de platino de segunda y tercera generación como el *carboplatino* (*cis*-diamino(ciclobitano-1,1-dicarboxilato-*O,O'*)platino(II)) o el *oxaliplatino* (*cis*-[oxalato(*trans*-1,1,2-diaminociclohexano)platino(II)]) [83], éste último empleado en el tratamiento del CCR en estadio avanzado, así como complejos de rutenio, titanio, galio, cobre, oro o plata con resultados prometedores [84-87].

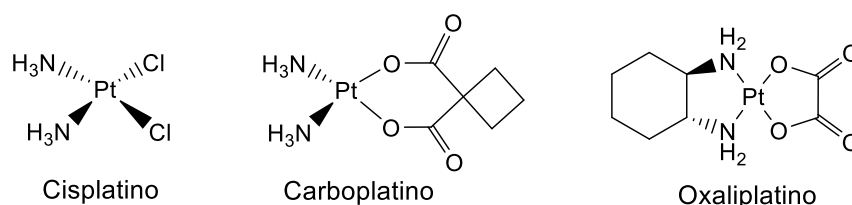


Figura 4. Estructuras de los complejos de platino empleados en quimioterapia.

1.2.2.1. Complejos de oro

Desde los inicios de la medicina, al oro se ha considerado un símbolo de longevidad e inmortalidad y se le han atribuido poderes curativos. El primer uso bien documentado de las propiedades terapéuticas del oro, a diferencia del uso en base en sus atribuciones místicas en antiguas civilizaciones como la india y la egipcia, data de alrededor del 2500 a.c. En ese momento, en la antigua China médicos y cirujanos usaban oro en polvo y otras preparaciones basadas en oro para el tratamiento de diversas afecciones, sobre todo cutáneas, como úlceras de piel, sarampión y viruela. Además, comenzaron a relacionar el uso del oro con la cura de dolencias respiratorias y articulares [88].

Sin embargo, no es hasta el siglo XX cuando la **crisoterapia** (uso de fármacos basados en oro para el tratamiento de enfermedades) se acepta como parte de la medicina moderna. En el siglo XIX el uso de sales de oro para el tratamiento de determinadas infecciones bacterianas era frecuente. En este marco, el descubrimiento de las propiedades bacteriostáticas del complejo de oro(III) $K[Au(CN)_2]$ frente a *Mycobacterium tuberculosis* hizo que el oro se instaurara en el tratamiento de la tuberculosis en la década de 1920. Posteriormente, a pesar de que la terapia con oro frente a la tuberculosis mostró ser ineficiente *in vivo*, los indicios que apuntaban al bacilo de la tuberculosis como un posible agente causante de la artritis reumatoide, hizo que se comenzara a usar la crisoterapia contra esta y otras enfermedades reumáticas. Los buenos resultados obtenidos con estos tratamientos hicieron que la crisoterapia se estableciera en la medicina como una opción adecuada frente a ciertas enfermedades [89].

El auranofin (AF) (2,3,4,6-tetra-6-acetil-1-tiol-β-D-glucopiranosato-S-trifenilfosfina oro(I)) (figura 5) es uno de los tres medicamentos antirreumáticos modificadores de la enfermedad o DMARDs (*Disease-Modifying Antirheumatic Drugs*) basados en oro utilizados actualmente y el único de los tres que es lipófilo y administrado oralmente [90]. A pesar de que la efectividad del AF frente a la artritis reumatoide viene dada principalmente de su efecto antiinflamatorio a través de diferentes mecanismos, numerosos estudios han hecho notar también un importante

efecto en la alteración del equilibrio redox de la célula a través de la inhibición de la tiorredoxina reductasa citoplasmática (TrxR1) y mitocondrial (TrxR2) [91]. La sobreexpresión de TrxR1 en varios tipos de cáncer, junto con un peor pronóstico en muchos de estos casos, llevó al ensayo del AF como anticancerígeno, arrojando buenos resultados *in vitro* y en diferentes estudios preclínicos [91].

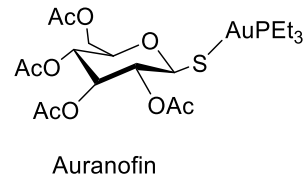


Figura 5. Estructura del complejo de oro(I) auranofin empleado contra la artritis reumatoide.

De esta manera, el AF ejerce su acción mediante la inhibición de una enzima que se encuentra sobreexpresada específicamente en células cancerosas, a diferencia de los análogos del *cisplatino*, que efectúan su actividad citotóxica de manera menos selectiva a través de interacciones con el DNA (presente en todas las células). El OX, en concreto, actúa como agente alquilante en el DNA, formando entrecruzamientos intra-hebra entre dos bases adyacentes guanina-guanina o guanina-adenina, lo que inhibe la síntesis de DNA. A pesar de que los efectos secundarios del OX son muchos menores que los del *cisplatino*, que cursa con graves problemas de neuro y nefrotoxicidad entre otros, la interacción con el DNA conlleva no solo citotoxicidad frente a células cancerígenas, sino un efecto sistémico que puede causar mielotoxicidad, neuropatía periférica, náuseas, vómitos y diarrea en pacientes con tratamiento por OX [92]. Además, el AF y sus derivados se podrían utilizar en cánceres resistentes a fármacos de platino, ya que diferentes estudios *in vitro* han demostrado una elevada citotoxicidad del AF frente a células extraídas de pacientes resistentes al cisplatino [91]. Por lo tanto, en la búsqueda de nuevos complejos metálicos que aumenten la eficacia y disminuyan los efectos adversos del *cisplatino*, los análogos del AF cobran relevancia, de modo que se han desarrollado un importante número de complejos de oro(I) y oro(III) con elevado potencial anticancerígeno.

El oro también se puede usar en la medicina y, en concreto, en la terapia contra el cáncer, en su forma no oxidada (Au^0). El oro metálico, gracias a sus propiedades fisicoquímicas, se puede usar como vehículo, en forma de nanopartículas de oro que pueden dirigir y liberar el fármaco en el lugar deseado y así ejercer su efecto citotóxico específicamente en el tumor. Las nanopartículas de oro también tienen potencial como agentes fototérmicos, acumulándose en el interior de las células tumorales para generar una hipertermia controlada tras la estimulación con rayos infrarrojos, así como en terapia fotodinámica como fotosensibilizadores. Por último, las nanopartículas de oro se podrían usar como terapia adyuvante de la radioterapia, actuando como radiosensibilizadores que aumentan la sensibilidad de las células tumorales a este tipo de terapia, permitiendo una dosis menor y reduciendo los efectos secundarios sistémicos. En el diagnóstico, las nanopartículas de oro también pueden usarse como agentes de contraste gracias a sus propiedades ópticas y su capacidad para dirigirse específicamente a células cancerosas [92].

Sin embargo, en cuanto a los complejos metálicos, a pesar de que puede adoptar los estados de oxidación desde -1 a +5, el oro está presente en dos estados de oxidación principales: Au(I) y Au(III). El estado de oxidación en el que se encuentre el átomo de oro influye en la geometría y la química del compuesto, así como en los ligandos que se pueden coordinar a ese centro metálico y, por tanto, en las propiedades anticancerígenas finales.

Oro(I): con una configuración electrónica d^{10} , tiende a estabilizar geometrías lineales con dos ligandos coordinados al átomo de oro. Aunque sean menos comunes también pueden encontrarse geometrías de coordinación trigonales (tres ligandos) y tetraédricas (cuatro ligandos). El oro(I) es un centro metálico blando, por lo que tiende a formar complejos estables con átomos dadores blandos (fácilmente polarizables) como el azufre, selenio o el fósforo [93].

Oro(III): a pesar de que la influencia del auranofin haya hecho de los complejos de oro(I) los más estudiados en la lucha contra el cáncer, la analogía que existe entre el oro(III) y el platino(II) (que son isoelectrónicos e isoestructurales) hace que los complejos de oro(III) sean de un gran interés como potenciales anticancerígenos. El oro(III), con una configuración electrónica d^8 , estabiliza geometrías plano-cuadradas [94]. Otra de las razones por las que el Au(III) ha sido olvidado hasta tiempos más recientes es su enorme reactividad, que ponía en entredicho su eficacia como fármacos anticancerígenos. Frecuentemente, los complejos de oro(I) se obtienen por descomposición térmica de compuestos de oro(III), de igual modo que en condiciones fisiológicas reductoras estos compuestos de oro(III) podrían reducirse a oro(I) u oro(0) debido a su elevado potencial redox y su baja estabilidad [95,96]. El oro(III), al contrario que el oro(I), se comporta como ácido duro, por lo que tiene preferencia a coordinarse a átomos dadores duros tales como el oxígeno o el nitrógeno [97].

1.2.2.2. Ligandos usados en los compuestos metálicos e influencias

A la hora de sintetizar los complejos metálicos, el átomo metálico se puede coordinar a distintos tipos de ligandos para estabilizar la molécula, lo que modulará sus propiedades químicas y, en última instancia, su capacidad anticancerígena. En función de los ligandos que acompañen al metal, la molécula se podrá dirigir a una proteína diferente, o variará su lipofilidad influyendo en su absorción e internalización celular, etc. Incluso en el mismo tipo de ligando, un pequeño cambio puede alterar por completo el modo de actuación del compuesto como se demostró en el trabajo desarrollado por Mármol et al. (2017) en el que participó el autor de la presente tesis doctoral [98]. En este trabajo se estudian las propiedades anticancerígenas y el mecanismo de acción de dos complejos de oro(I): $[Au(C\equiv CPh)(PTA)]$ y $[Au(C\equiv C-2-NC_5H_4)(PTA)]$. En los resultados se observa que la adición de un átomo de nitrógeno en el anillo bencénico del alquino impide que el complejo inhiba la enzima tioredoxina reductasa (TrxR), al contrario que el complejo homólogo sin el átomo de N, y entre en la mitocondria formando agregados en su interior. Además, también se modifica el tipo de muerte celular que se induce, ya que $[Au(C\equiv C-2-NC_5H_4)(PTA)]$ desencadena la muerte celular por necroptosis, mientras que $[Au(C\equiv CPh)(PTA)]$ lo hace por apoptosis.

Por lo tanto, existen una gran variedad de compuestos de oro(I) y oro(III) en función del tipo de los ligandos que presenten. Siguiendo las características químicas y estructurales del oro(I) y el oro(III) vistas anteriormente, los principales tipos de ligando que se encuentran coordinados a estos centros metálicos son los ligandos P-dadores (fosfinas), los ligandos S-dadores (ditiocarbamatos), los ligandos C-dadores (carbenos y alquinos), los ligandos O-dadores (hidroxo) y los ligandos N-dadores (porfirinas).

1.2.2.3. Principales derivados de oro(I)

El trabajo desarrollado por Mármol et al. [92], en el que participó el autor de la presente tesis, estudia las bondades del oro y su uso en quimioterapia como alternativa a los fármacos de platino. A lo largo de esta revisión se recogen los principales complejos de oro(I) con potencial anticancerígeno descritos en la bibliografía científica en el tratamiento del cáncer de colon (CCR). Algunos ejemplos de los mismos aparecen recogidos a continuación

Derivados de oro(I) con fosfinas: el fosfano o fosfina es un compuesto químico de fórmula PH_3 . Uno de los dos ligandos del AF es la trietilfosfina (PEt_3), que confiere al complejo un carácter lipofílico que le facilita la entrada a la célula a través de la membrana. A raíz del descubrimiento del carácter anticancerígeno del AF, el ligando tioglucosa se sustituyó por diferentes nucleófilos para obtener nuevos complejos de oro(I), manteniendo la fosfina PEt_3 que le otorgaba propiedades lipofílicas deseadas (figura 6). Estos compuestos derivados del AF arrojaron resultados prometedores a la hora de inhibir la TrxR y disminuir la proliferación de líneas celulares de cáncer de colon [99].

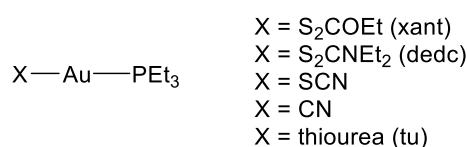


Figura 6. Complejos lineales de oro(I) similares al auranofin.

Aunque el carácter hidrófobo de las fosfinas como la Pet_3 ayuda a la internalización celular del fármaco, la lipofilidad también influye en el transporte y distribución de los fármacos en sangre [100,101], así como en la interacción con las dianas intracelulares. Por lo tanto, en determinados casos, un marcado carácter lipófilo puede comprometer la efectividad como agente quimioterápico. Con el objetivo de obtener complejos de oro con un equilibrio lipo-hidrofílico y una mayor biodisponibilidad, se han utilizado fosfinas solubles en agua derivadas de la fosfina 1,3,5-triaza-7-fosfaadamantano (PTA), obteniendo valores de IC_{50} muy bajos en células de cáncer de colon [102]. Algunos ejemplos de tales derivados se recogen en la figura 7.

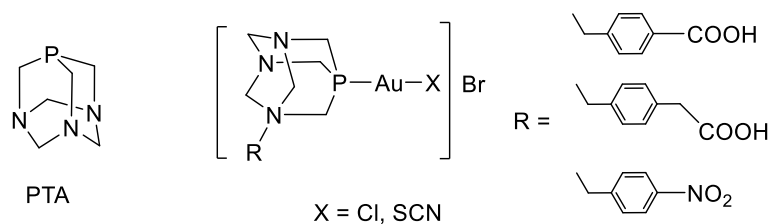


Figura 7. Complejos de oro(I) con fosfinas derivadas de PTA.

El empleo de fosfinas bidentadas del tipo 1,2-bis(difenilfosfina)etano y similares en complejos mononucleares catiónicos del tipo $[\text{Au}(\text{PP})_2]^+$, da lugar a complejos muy liposolubles que se almacenan en las mitocondrias, produciendo importantes efectos adversos. Sin embargo, si se reduce la liposolubilidad de los complejos empleando las fosfinas recogidas en la figura 8A, se consiguen excelentes resultados in vitro frente a diferentes líneas celulares de cáncer de colon [103]. El empleo de fosfinas bidentadas como ligandos puente a dos centros de oro(I) coordinados a moléculas del tipo imidazoles, pirazoles, triazoles y pirroles conduce igualmente a prometedores agentes antiproliferativos, cuya actividad depende de la longitud de la cadena de la difosfina (figura 8B) [104].

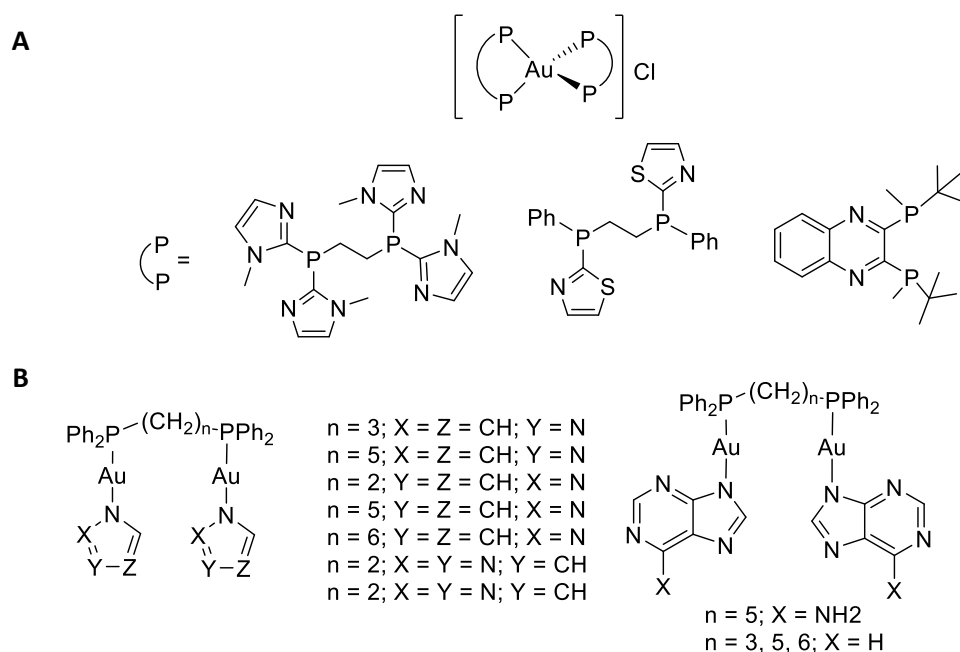


Figura 8. Estructuras de complejos mononucleares y dinucleares con difosfinas.

Además, la fosfina se puede utilizar como *linker* para unir otras moléculas que confieran a los complejos de oro una característica deseada, como hicieron Tasan et al. [105] al unir un isocianato derivado del 5,10,15-tris(*p*-sulfonatofenil)-20-(*p*-aminofenil) porfirina al [(2-(difenilfosfino)etilamino)-AuCl] (figura 9), añadiendo así la capacidad diagnóstica de la porfirina al complejo de oro final y obtener un fármaco con potencial teragnóstico.

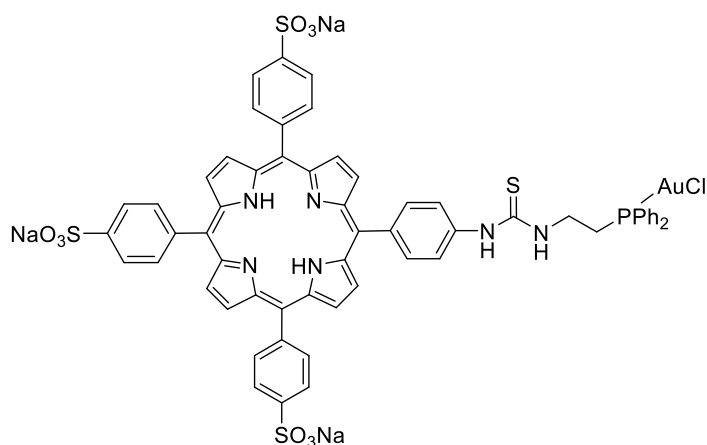


Figura 9. Complejo de oro(I) con un ligando fosfina derivada de porfirina.

Complejos de oro(I) con ligandos S-dadores: el S es un átomo dador blando, por lo que formará complejos estables con el Au(I). De este modo, los ligandos tiolato confieren una alta estabilidad a la molécula cuando ésta se encuentra en condiciones fisiológicas, lo que ayudaría a mejorar la efectividad citotóxica de los derivados de oro con este tipo de ligandos. Siguiendo la estabilidad que otorga el azufre, este átomo se puede usar para coordinar diferentes ligandos bioactivos y generar una gran variedad de complejos de oro(I) con potencial anticancerígeno. Entre estos ligandos se encuentran tetrazoles [106] y naftalimidias [107] (figura 10A), diferentes ligandos heterocíclicos con propiedades anti-inflamatorias y analgésicas (figura 10B) [108] y aril-tiosemicarbazonas [109] (figura 10B) que se han coordinado a unidades Au-fosfina para dar lugar a numerosos complejos de oro(I) con actividad citotóxica frente a diferentes líneas celulares de cáncer de colon.

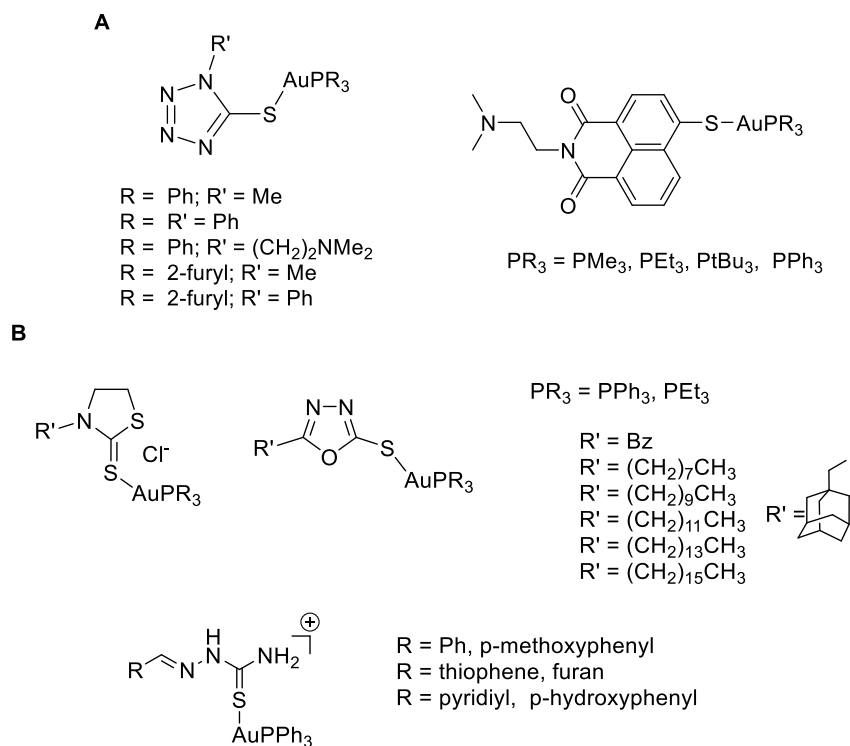


Figura 10. Complejos de oro(I) con ligandos S-dadores.

Los ditiocarbamatos son un tipo de ligandos S-dadores muy usados en oro sobretodo en oro(III), aunque también se conocen algunos ejemplos de oro(I), ya que estabilizan los complejos resultantes y permiten, de igual modo, coordinar al átomo metálico otras moléculas bioactivas como las sulfonamidas, obteniendo compuestos activos frente a células de cáncer de colon [110]. Complejos de oro(I) con estos ditiocarbamatos serán objeto de estudio en el capítulo IV.3.

Derivados carbenos N-heterocíclicos de oro(I): los carbenos N-heterocíclicos (NHCs) son especies neutras con un carbono divalente situado entre los dos átomos de nitrógeno. Se trata de σ -dadores fuertes capaces de formar enlaces con metales, a la vez que presentan resistencia a la oxidación y facilidad para su funcionalización. Por todo esto, este tipo de moléculas se consideran buenas alternativas a las fosfinas como ligandos no sólo para el Au. Por lo tanto, se han sintetizado una gran diversidad de complejos de oro(I) con ligandos NHCs, siendo la mayoría de ellos derivados del imidazol 1,3-disustituido (figura 11A) y 1,3,4,5-sustituido como la lepidilina (figura 11B). Al ser probados frente a diferentes líneas celulares de cáncer de colon, estos derivados metálicos arrojaron resultados citotóxicos prometedores [111-113].

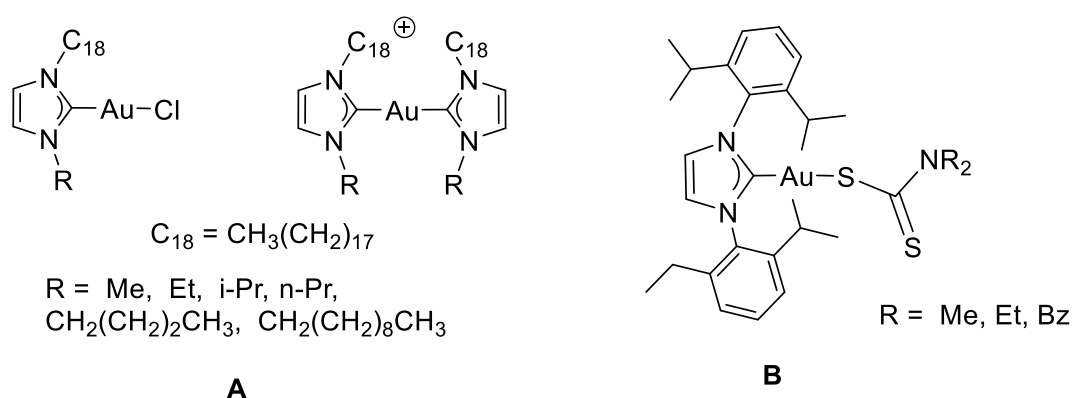


Figura 11. Complejos de oro(I) con ligandos carbeno N-heterocíclicos.

Derivados alquinilo de oro(I): los ligandos alquinilo actúan como ligandos σ - y π - dadores fuertes lo cual da lugar a complejos con una elevada estabilidad, de echo el enlace oro-carbono en los complejos de oro con alquinos es uno de los enlaces oro-ligando más fuertes que se conocen. Esta elevada estabilidad, incluso en condiciones fisiológicas, podría superar uno de los principales problemas en el desarrollo de nuevos derivados anticancerígenos basados en metales que es su tendencia a descomponer antes de llegar a la diana biológica, en presencia de los agentes reductores biológicos tales como los tioles. [114]. A pesar de estas ventajas, no fue hasta 2009 que se describieron los primeros estudios de alquil derivados de oro(I) como agentes antitumorales frente al cáncer de colon [115] (figura 12).

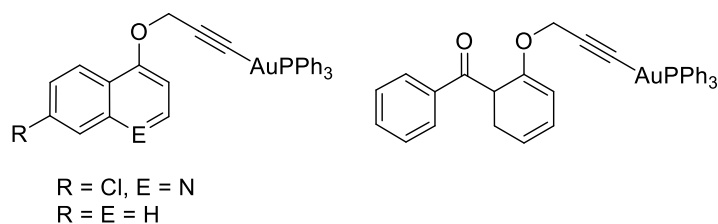


Figura 12. Primeros derivados de oro(I) con ligandos alquinilo estudiados frente al CCR.

1.2.2.4. Principales derivados de oro(III):

Dadas la alta reactividad y baja estabilidad del oro(III), en estos casos la elección de los ligandos que rodean al átomo central se vuelve incluso más relevante, ya que es de gran importancia obtener compuestos estables que no solo faciliten la síntesis, sino que mantengan su fiabilidad y eficacia en un ambiente biológico. Estos problemas se pueden solucionar coordinando al oro(III) ligandos muy rígidos que den como resultado compuestos muy estables con potencial anticancerígeno. El reciente trabajo de Gurba et al. [116] recoge los principales tipos de derivados de oro(III) con efecto citotóxico sobre células de cáncer de colon:

Derivados organometálicos de oro(III): A principio de siglo, Messori et al. consiguieron sintetizar compuestos organometálicos de oro(III) (figura 13A) estables bajo condiciones fisiológicas [117]. Sin embargo, los resultados antitumorales *in vitro* no mejoraron al cisplatino, por lo que desde entonces se ha trabajado en la obtención de nuevos derivados organometálicos de oro(III) con mejores características anticancerígenas [118] (figura 13B).

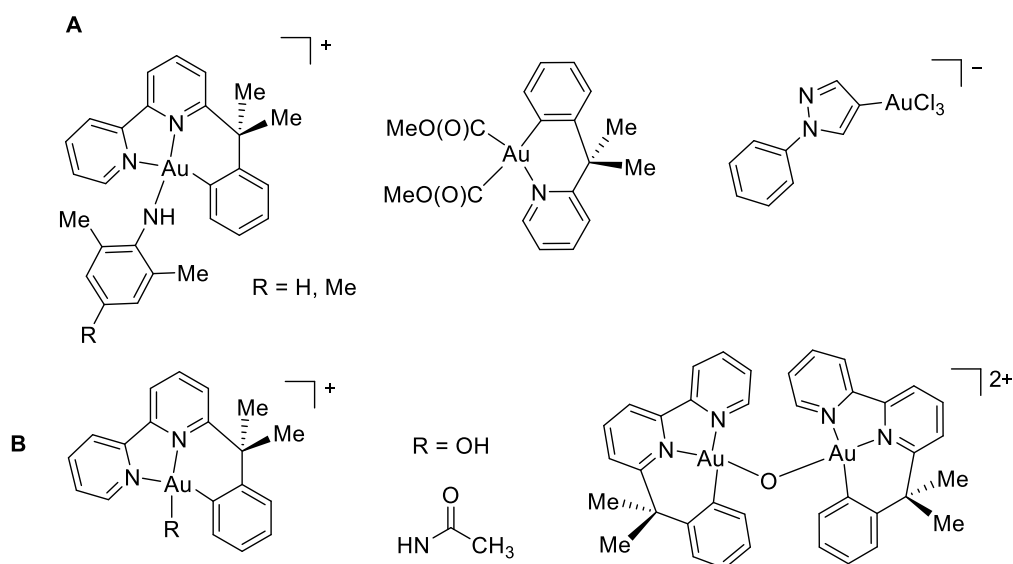


Figura 13. Complejos organometálicos de oro(III).

Las características químicas de los carbenos N-heterocíclicos NHCs les permiten coordinarse tanto a metales duros como blandos, por lo que, al igual que con el oro(I), también es común encontrar carbeno complejos de oro(III) capaces de comprometer la viabilidad de células de cáncer de colon [119,120] (figura 14).

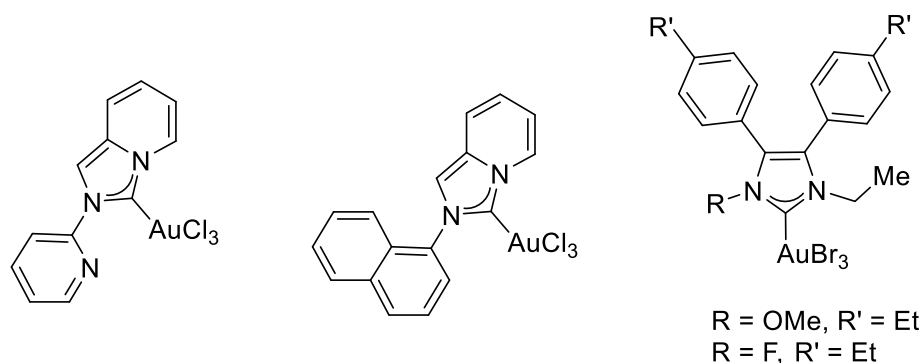


Figura 14. Carbeno complejos de oro(III).

Aunque el oro(III) sea fuerte y el azufre sea un átomo dador blando, los derivados ditiocarbamato de oro(III) son una buena elección a la hora de sintetizar nuevos complejos de oro con potencial anticancerígeno (figura 15), ya que el ligando ditiocarbamato tiene una gran tendencia a formar quelatos que confieren una gran estabilidad a los complejos metálicos, como demostraron por primera vez Ronconi et al. en 2005 [121]. En el capítulo IV.1 de la presente tesis estudiaremos ejemplos de complejos de oro(III) con ligandos ditiocarbamato activos frente a las células de cáncer de colon Caco-2.

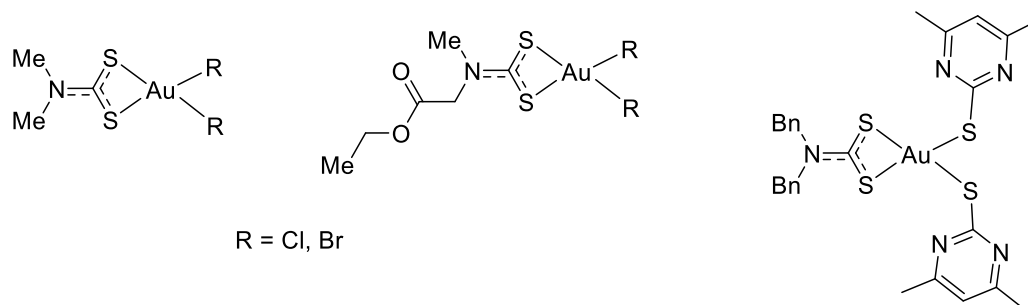


Figura 15. Ejemplos de ditiocarbamato complejos de oro(III) activos frente al CCR.

Complejos de porfirinas: el nitrógeno es un dador fuerte, por lo que al unirse al oro(III) genera enlaces N-Au(III) fuertes. Estudios sobre el enlace Au-N en complejos de oro(III) con heterociclos de nitrógeno confirman que la piridina y, probablemente, otros ciclos con nitrógeno, dan lugar a enlaces con un alto carácter electrostático, ya que la piridina y ligandos similares presentan un carácter σ dador fuerte y π aceptor débil [122]. Los ligandos que mejor estabilizan el enlace N-Au(III) son las porfirinas, que generan una estructura rígida en torno al átomo central estabilizando el ion Au(III) frente a la reducción en ambientes fisiológicos. De este modo se han sintetizado numerosos complejos porfirínicos de oro(III) capaces de disminuir la proliferación en cultivos de líneas celulares de cáncer de colon (figura16) [123,124].

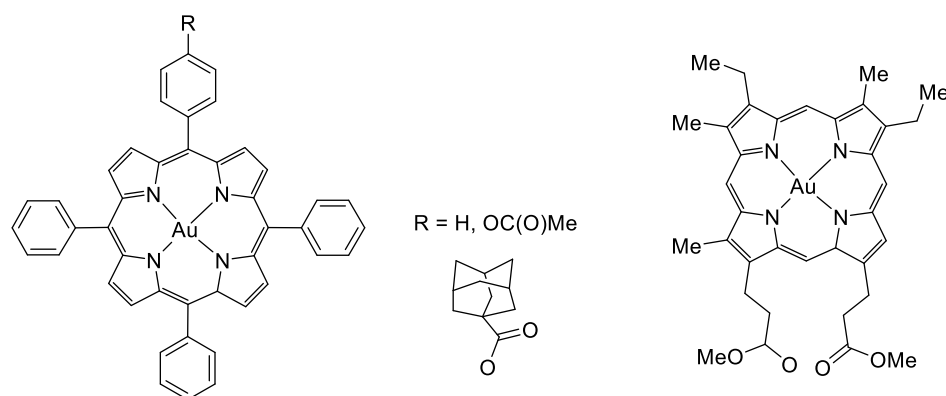


Figura 16. Ejemplos de complejos de oro(III) con anillos del tipo porfirina.

Complejos O-Au(III): debido a la alta reactividad del enlace Au-O, la mayoría de los derivados de este tipo (complejos hidroxilo, oxo y alcoxilo) no serán estables en medio fisiológico, aunque pueden jugar un papel relevante como intermedios en diversos procesos catalíticos importantes. Sin embargo, se ha visto que en determinados compuestos de oro(III) del tipo $[\text{Au}(\text{DMDT})\text{X}_2]$ ($\text{X} = \text{Cl}$ o Br , DMDT = ditiocarbamato de metilo), cuando se encuentran en medios fisiológicos, se hidroliza la unión Au(III)-halógeno, originando un derivado hidroxilo $[\text{Au}-(\text{DMDT})(\text{OH})_2]$ de mayor solubilidad y estabilidad en medio acuoso [95]. Por lo tanto, podría ser de gran interés explorar nuevas vías de síntesis que lleven a complejos hidroxilo de oro(III) que eviten los problemas de reactividad y estabilidad típicos de los complejos con enlaces Au-O, pero permitan obtener moléculas solubles en medios fisiológicos.

1.2.3. Hipertermia

La hipertermia, o tratamiento por hipertermia, es un tipo de terapia dirigida en la que un tejido se somete a un aumento de temperatura por encima de la fisiológica ($37\text{ }^\circ\text{C}$) con el objetivo de contrarrestar el crecimiento y progresión tumoral dañando en la menor medida posible el tejido sano. Normalmente, el aumento de temperatura se dirige a una región definida, en la que se encuentra el tumor, pudiendo incluir también parte del tejido circundante. A este tipo de terapia se le conoce como hipertermia local (en un área pequeña) o regional (sobre regiones de mayor tamaño) y la distribución de temperatura suele ser heterogénea, entre $39\text{ }^\circ\text{C}$ y $43\text{ }^\circ\text{C}$, en el área de aplicación en función del tamaño, localización, profundidad e irrigación del tumor [125] (figura 17). La hipertermia también puede aplicarse en el cuerpo entero cuando el cáncer se ha diseminado por todo el organismo.

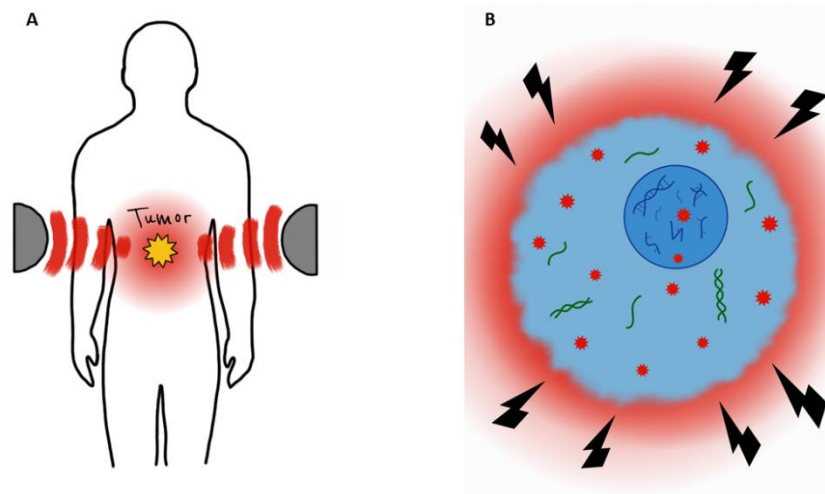


Figura17. Aplicación de hipertermia regional sobre una masa tumoral (A) como coadyuvante de la quimioterapia, o bien para activar un fármaco termosensible con el que se han tratado las células cancerígenas previamente (B).

Issels et al. (2016) [125] proponen 6 rasgos principales que contribuyen al efecto anticancerígeno de la hipertermia:

Bloqueo de la supervivencia celular: el aumento de temperatura provoca la muerte celular tanto de manera directa como mediante la activación de procesos de muerte celular como la apoptosis o la necrosis, dependiendo de la dosis de calor aplicada.

Inducción de la respuesta celular a estrés por calor: cuando la célula es sometida a altas temperaturas se induce la expresión de proteínas de choque térmico. Dentro de la célula, estas proteínas funcionan como chaperonas o como proteasas, de manera que ayudan a la recuperación del estrés bien reparando las proteínas dañadas por las altas temperaturas o bien degradándolas. Además, estas chaperonas moleculares inducidas por el choque térmico parecen funcionar como puntos de regulación clave en el control de la apoptosis.

Modulación de la respuesta inmune: las células sometidas a hipertermia sufren una regulación al alza y sobreexpresión de determinadas moléculas de superficie, así como la liberación extracelular de exosomas y proteínas de choque térmico. Todos estos elementos pueden transportar potenciales antígenos tumorales, activando la respuesta inmunitaria frente al tumor.

Cambios del microambiente tumoral: el aumento de temperatura conlleva numerosos cambios fisiológicos que afectan a la célula y su entorno (microambiente tumoral), incluyendo cambios en la vascularización tumoral, desequilibrio en la producción de ROS y alteraciones metabólicas.

Evasión de la reparación del DNA: la hipertermia puede sensibilizar a las células frente a daños en el DNA, además de inducir daño directo sobre el mismo. La hipertermia ejerce su actuación sobre distintas vías y niveles de los mecanismos de reparación del DNA. Entre estos, destaca la influencia en la activación de los puntos de control del ciclo celular, la

reparación por escisión de bases, la unión de extremos no homólogos y la recombinación homóloga [126].

Sensibilización a radio y quimioterapia: generalmente, la hipertermia es utilizada en combinación, como adyuvante en radioterapia o quimioterapia, ya que el aumento de temperatura es uno de los quimio y radio-sensibilizadores más estudiados. Diversos estudios han confirmado el aumento de la eficacia y selectividad de algunos agentes quimioterápicos cuando estos son usados en combinación con hipertermia [127-129]. Por lo tanto, en los últimos años se ha probado a unir agentes quimioterapéuticos clásicos a diferentes elementos termosensibles para que se activen en el tejido deseado cuando se aplica la hipertemia, así como a sistemas de entrega termosensibles que liberen al fármaco en el tumor como respuesta al aumento de temperatura [130-132]. Un ejemplo de esto son las nanopartículas de oro que, como se ha explicado previamente, por sus características fisicoquímicas, son termosensibles, además de poder usarse como vehículo de fármacos clásicos.

Por otro lado, también se están sintetizando moléculas potencialmente anticancerígenas que, sin necesidad de unirse a otras moléculas termosensibles, aumenten su actividad al ser sometidas a un aumento de temperatura, permitiendo una mayor efectividad y selectividad. En un primer intento de diseñar moléculas pequeñas destinadas a su uso en hipertermia se observó que dos complejos de rutenio(II) con fosfinas perfluoradas (figura 18A) aumentaban su actividad citotóxica sobre células cancerígenas cuando se sometían a hipertermia suave (42 °C) en lugar de a temperatura fisiológica (37 °C) [133]. A partir de este momento se profundizó en el estudio de la influencia de la unión de cadenas fluoradas a centros metálicos para modular la termosensibilidad de los complejos. Estudios comparativos con complejos de rutenio(II) (figura 18B) mostraron que la sustitución de cadenas hidrocarbonadas por cadenas fluoradas análogas aumentaba el efecto termoactivo de los complejos, incrementando su actividad anticancerígena cuando se someten a una hipertermia suave (41 °C) [134]. Por todo esto, en el capítulo IV.2. de la presente tesis se explorará la influencia de la hipertermia y de las cadenas fluoradas en la citotoxicidad de los complejos de oro(I) [135].

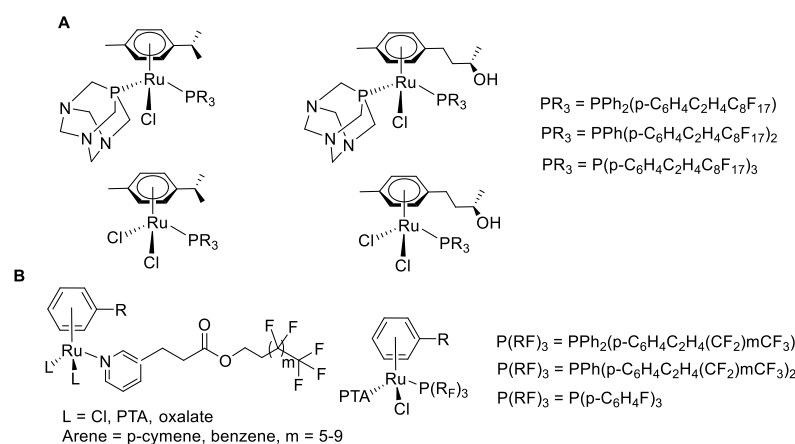


Figura 18. Ejemplos de complejos de rutenio empleados en condiciones de hipertermia.

1.2.4. Extractos vegetales

El uso de hierbas, plantas y productos provenientes de éstas con fines médicos es tan antiguo como la misma humanidad. Ya en tiempos prehistóricos se comenzó a buscar de manera instintiva fármacos presentes en la naturaleza con el objetivo de curar tanto las enfermedades propias de los humanos como las de los animales [136]. Por lo tanto, el uso de plantas aromáticas siempre ha estado presente en la medicina tradicional pudiendo rastrear su utilización desde escritos de las principales antiguas civilizaciones (Sumeria, China, Egipto, India y Grecia), hasta tratados de alquimistas de la edad media. En la edad moderna se produjo un nuevo salto en el uso de las plantas en medicina. La clasificación de muchas de las plantas conocidas hasta la fecha en el libro *Species Plantarum* de Linneo, junto a la capacidad para extraer y aislar compuestos de las plantas aromáticas pusieron en la palestra el uso de extractos vegetales, que a lo largo de los siglos XX-XIX evolucionaron hacia usos más innovadores como los **nutracéuticos** [137]. Un nutracéutico es un suplemento dietético concentrado, obtenido a partir de una sustancia natural bioactiva presente en los alimentos y que proporciona un efecto favorable sobre la salud, superior al que tendría el alimento normal. Otro concepto ampliamente empleado es el de los **alimentos funcionales**, aquellos que, más allá de aportar nutrientes, contienen componentes biológicamente activos que se ha demostrado científicamente que tienen un efecto positivo sobre el organismo, mejorando la salud y bienestar general del individuo y reduciendo el riesgo de desarrollar ciertas patologías.

Como se ha explicado en el apartado I.1.3.1.2, el consumo de dietas ricas en vegetales puede disminuir el riesgo de padecer cáncer de colon gracias al papel de la fibra. Además, debido a los altos niveles de inflamación y estrés oxidativo que caracterizan al ambiente tumoral [138], la capacidad antioxidante y antiinflamatoria de los diferentes fitoquímicos que contienen frutas y verduras también contribuyen a su papel preventivo. A esto, se unen otros efectos como el antimutagénico, el antiproliferativo y el inmunomodulador [139,140].

Además, diferentes estudios preclínicos muestran que estos compuestos de origen vegetal también pueden actuar frente a las células tumorales inhibiendo su proliferación una vez la transformación ha tenido lugar. Estudios clínicos posteriores confirman los beneficios de diferentes sustancias fitoquímicas en el tratamiento del cáncer, ya que ayudan a prevenir la recurrencia, aumentar la calidad de vida, disminuir efectos secundarios de la quimioterapia y potenciar la efectividad de fármacos quimioterapéuticos (revirtiendo resistencias e incrementando el efecto terapéutico por actuaciones sinérgicas) [141]. Por lo tanto, los efectos citotóxicos sobre células cancerosas, junto a su baja efectividad sobre células sanas, ha centrado la atención de estudios oncológicos en el uso de fitoquímicos, sobre todo como coadyuvantes de otros agentes quimioterápicos.

1.2.4.1. Polifenoles

Los polifenoles son metabolitos secundarios de las plantas y representan el mayor grupo de compuestos no energéticos en la comida de origen vegetal. Aunque en las plantas los polifenoles

ejercen funciones fisiológicas como la pigmentación o la polinización, su papel principal es el de actuar como protectores frente a estreses abióticos como heridas, patógenos, radiación UV, exceso de luz o estrés oxidativo [142]. Este efecto protector en las plantas se relacionó con un potencial efecto similar sobre los humanos, demostrando a través de diferentes estudios que la ingesta de polifenoles conlleva beneficios para la salud humana ya que gracias a sus características antioxidantes e inflamatorias ayuda, sobre todo, a la prevención y manejo de ciertas enfermedades crónicas [143].

Sin embargo, a día de hoy, muchos de los mecanismos que subyacen los efectos de los polifenoles sobre el organismo se desconocen. Por lo tanto, a pesar de la evidencia que demuestra que los polifenoles pueden ayudar a mejorar la salud humana, existen limitaciones en su uso y es necesario profundizar en el estudio de los mecanismo y dosis seguras para evitar efectos secundarios accidentales [143].

Aunque el conocimiento sobre los mecanismos moleculares que subyacen este fenómeno es limitado, los últimos estudios conducen a la conclusión de que los compuestos fenólicos aislados pueden perder efectividad frente a combinaciones de polifenoles. Los efectos sinérgicos de los diferentes polifenoles que componen una mezcla potencian los efectos quimiopreventivos. Del mismo modo, existen sinergias entre los polifenoles y otros fitoquímicos, así como con la matriz alimenticia y otros factores de la dieta [140]. Por lo tanto, es recomendable consumir los polifenoles en forma de mezclas, como es el caso de extractos vegetales, así como tener en cuenta el resto de componentes de la dieta, para obtener los mejores resultados para la salud.

El autor de la presente tesis participó en una revisión que recogía los últimos estudios sobre el impacto de una dieta rica en polifenoles en el manejo de las principales enfermedades de tipo neurodegenerativo, cardiovasculares, ópticas, cáncer o diabetes tipo 2 [144]. De entre los diversos trastornos de tipo degenerativo e inflamatorio para los que el consumo de polifenoles puede tener un efecto beneficioso, es de particular importancia para la presente tesis destacar el efecto sobre una enfermedad relacionada con el estrés oxidativo como es el cáncer.

1.2.4.2. Importancia de la economía circular

La industria agroalimentaria tiene un gran impacto medioambiental debido a diferentes factores destacando la utilización de recursos útiles como el agua, la tierra o la energía. Sin embargo, el principal de ellos es la generación de residuos económicamente poco interesantes y sin valor añadido que se generan y acumulan. Por lo tanto, la gestión adecuada de estos residuos es necesaria y su valorización puede ayudar a solventar este. En las operaciones de valorización, los residuos se destinan a una finalidad útil, sustituyendo a otros materiales que de otro modo se habrían utilizado para cumplir una función particular, o bien los residuos se preparan para cumplir esa función, en la instalación o en la economía en general [145]. Por lo tanto, la valorización de los subproductos agroalimentarios es sostenible, ya que se aprovechan residuos hasta ahora desechados, evitando la obtención de principios bioactivos de alimentos comestibles. Además, la revalorización ayuda a solventar la problemática medioambiental

mediante la reducción de los residuos totales acumulados, evitando que sean destinados a incineradoras.

En contraposición al modelo económico lineal tradicional, la economía circular es un modelo de producción y consumo que busca reducir al mínimo los desechos y extender el ciclo de vida de los productos. Para ello es necesario compartir, reducir, reutilizar, reparar, renovar y reciclar los productos y materiales ya existentes lo máximo posible [146]. En este marco, y como uno de los procesos de valorización para solucionar la acumulación de residuos de la industria agroalimentaria, actualmente se ha planteado el uso de los subproductos vegetales para la obtención de extractos que puedan ser redirigidos a las industrias farmacéutica y alimentaria en forma de fármacos, nutracéuticos, alimentos funcionales, piensos, fungicidas e incluso conservantes alimentarios.

Siguiendo esta línea, el autor de la presente tesis ha participado en varios trabajos que buscaban aprovechar los subproductos de industrias como la vinícola [147] o la oleica (almazaras) [148] mediante la obtención de diferentes extractos potencialmente destinados a la industria farmacológica. También se ha estudiado la vehiculización de extractos vegetales con el objetivo de aumentar la biodisponibilidad y preservar sus características físico-químicas y propiedades biológicas a la hora de ser utilizados en las industrias de destino [149]. Los extractos estudiados, ricos en polifenoles, presentan propiedades biológicas, inhibiendo la proliferación de líneas celulares cancerígenas y protegiendo las sanas frente a situaciones de estrés oxidativo e inflamación [147-151].

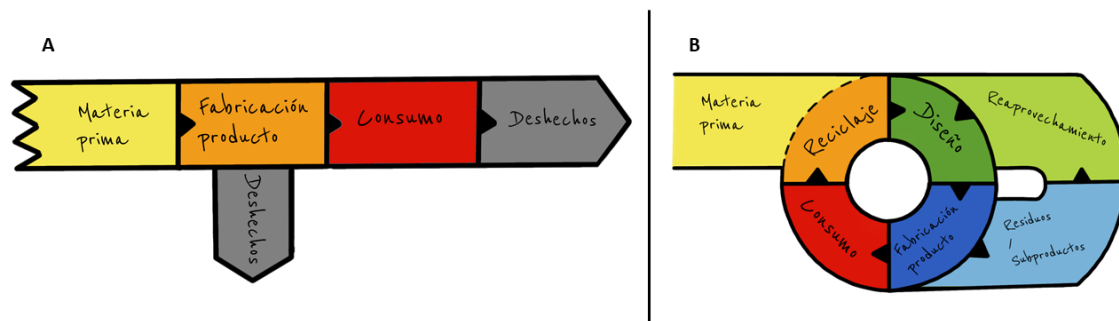


Figura 19. Modelo económico lineal tradicional (A), frente a modelo económico circular con reentrada de los residuos a la cadena de fabricación (B).

1.2.4.3. La uva

Además de la utilización de recursos útiles como agua, tierra y energía y la liberación de CO₂, entre los principales problemas de la industria vinícola se encuentra la generación de una gran cantidad de residuos económicamente poco interesantes y sin valor añadido. Para solucionar este problema se debe mirar a estos productos no como desechos, sino como subproductos aprovechables que puedan ser integrados en el sistema de economía circular. Los subproductos generados en esta industria son [152]:

Raspones: es el esqueleto del racimo de uvas y supone entre el 2% y el 8% de los residuos totales generados. Se caracteriza por un alto contenido en fibras de celulosa, lignina y hemicelulosa (xiloglucano), así como en compuestos fenólicos, tal y como se verá con detalle en el capítulo IV.4.

Hollejo: así se conoce a la mezcla sólida de pulpa, pieles y semillas que se obtiene tras el prensado de la uva. Presenta un alto contenido en hidratos de carbono simples, compuestos fenólicos, ácido tartárico y diferentes pigmentos.

Posos: es el nombre que reciben los residuos que aparecen en el fondo de los tanques una vez se ha realizado la fermentación y se caracteriza por la presencia de levaduras y bacterias.

Aguas residuales: los numerosos procesos de lavado que se realizan en las bodegas generan entre 3L y 4L de agua/kg de uva. Estas aguas contienen residuos orgánicos e inorgánicos que pueden ser contaminantes.

Estos subproductos se pueden aprovechar mediante procesos de valorización, destinándolos a alimentación animal, compostaje, uso como biosorbentes, conservantes alimentarios, medios de fermentación, obtención de energía (biodiésel y biogás) y la obtención de compuestos bioactivos [153]. En relación a esta última aplicación, estudios recientes han demostrado que diferentes extractos procedentes de las distintas partes de la uva pueden ejercer efectos beneficiosos sobre la salud humana, actuando como antiinflamatorios [154] y antioxidantes [155] frente a numerosas enfermedades entre las que destaca el cáncer [147,156].

1.2.4.4. Otros extractos vegetales (pino, aguacates, aceituna...)

Además de la uva, recientemente se ha estudiado el potencial beneficio sobre la salud de una gran variedad de extractos vegetales. En esta línea, el autor de la presente tesis ha participado en diferentes trabajos que estudian las propiedades biológicas *in vitro* de distintos extractos de origen vegetal:

El fenugreco es una planta usada en la medicina tradicional, por lo que se estudió el potencial nutracéutico que dos hidrolizados proteicos de esta planta podían tener en el manejo y tratamiento del cáncer de colon. Se observó que estos hidrolizados eran capaces de detener el ciclo celular en fase G₁ induciendo la muerte celular por apoptosis en células de cáncer de colon (Caco-2). Además, se observó un potencial antioxidante, ya que estos hidrolizados eran capaces de disminuir los niveles de ROS intracelulares cuando las células Caco-2 eran sometidas a un estrés oxidativo [157].

Además del fenugreco, también se analizaron las posibilidades nutracéuticas de extractos de corteza de tres especies diferentes de pino, obteniendo resultados similares a los del fenugreco. Los tres extractos de pino comprometían la proliferación de células Caco-2 usando concentraciones entre 50 mg/ml y 20 mg/ml, conduciendo a la apoptosis [150].

El estudio de valorización de subproductos procedentes de industrias alimentarias llevó a analizar el potencial terapéutico de extractos de residuos de manzana, melocotón, pimiento rojo y pepino. Aunque los resultados obtenidos eran prometedores, inhibiendo todos ellos la proliferación de células cancerígenas de colon (Caco-2), hígado (HepG2) y mama (MCF-7), no destacaban frente a los extractos de pinos. Sin embargo, se observó que la vehiculización de los extractos de residuos de frutas (encapsulación con maltodextrinas) mejoraba significativamente estos resultados [149].

La oleica es una industria importante en nuestro país, pero genera una gran cantidad de residuos como el alperujo. Con la idea de aprovechar dichos residuos (revalorización de los mismos) se estudiaron las posibilidades de estos residuos para ser reinsertados en un modelo de economía circular. Los resultados observados frente a células cancerígenas apoyaron un potencial terapéutico de los extractos de alperujo, ya que estos inhiben la proliferación celular e inducen la apoptosis. Sin embargo, los mejores resultados se obtuvieron al analizar su capacidad protectora como antioxidante, ya que se observó que los extractos de alperujo eran capaces de reducir los niveles de ROS intracelulares tras someter a un modelo de enterocito a un estrés oxidativo externo (H_2O_2) [148].

Por último, se analizaron los efectos antioxidante y antiproliferativo de tres extractos de semilla, piel y cáscara de aguacate. Todos ellos inhibieron la proliferación de células Caco-2 de manera dependiente del tiempo y la concentración en el rango de $\mu g/ml$. De nuevo, vuelve a destacar su papel como protector de la barrera intestinal, ya que los tres extractos eran capaces de revertir los niveles de ROS después de someter a un modelo de enterocito (Caco-2 diferenciadas) a un aumento de H_2O_2 [151].

1.3. Muerte celular

La muerte celular es un proceso fisiológico que se da en todos los organismos y juega un papel importante en el desarrollo embrionario, la renovación de los tejidos, el envejecimiento, la coordinación de la respuesta inmune y el mantenimiento de la homeostasis en el organismo. Por lo tanto, a aparición de errores en la regulación de los procesos de muerte celular pueden estar relacionados con el desarrollo de diferentes patologías [158]. Dado que el cáncer se caracteriza por la presencia de células que adquieren la capacidad de evadir los mecanismos de muerte celular y proliferar de manera descontrolada, la desregulación de estos procesos es clave para el desarrollo de la enfermedad. Por lo tanto, con terapias como la quimio o la radioterapia se persigue inducir la muerte de estas células inmortales para así erradicar la masa tumoral y evitar su diseminación o metástasis.

1.3.1. El ciclo celular

Se conoce como ciclo celular a la serie de eventos que se suceden para que la célula duplique su material genético y lo divida dando lugar a dos nuevas células hija. Es decir, el ciclo celular es el

responsable de la proliferación celular normal y, por lo tanto, también está estrechamente relacionado con la muerte celular.

El ciclo está compuesto por cuatro fases. Una primera fase de crecimiento y comprobación de la integridad celular (fase G_1), una fase de duplicación del DNA (fase S), una fase de asentamiento en la que se comprueba la integridad celular y del DNA (fase G_2) y, por último, la mitosis en la que se produce la división celular (fase M). A pesar de que estas 4 fases caracterizan el ciclo celular cuando la célula entra en división, existe una fase quiescente previa en la que la célula se desarrolla normalmente, ejerciendo las funciones propias del tejido en el que se encuentra (fase G_0) [159].

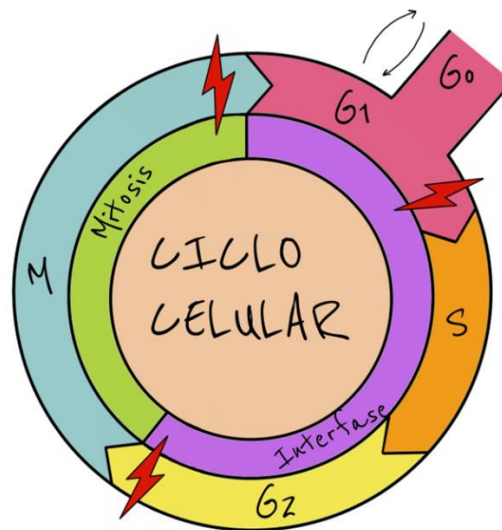


Figura 20. Transición entre las distintas fases del ciclo celular y principales puntos de control para la transición de una a otra: los complejos ciclina E/Cdk2 y ciclina D/Cdk4 regulan la transición a fase S, mientras que el complejo ciclina B/Cdk2 regula la transición a las fases M y G_1 .

La progresión a través del ciclo celular está controlada por puntos de control en las diferentes fases que impiden la transición de una a otra si se detecta algún fallo celular (figura 20). Algunos de estos puntos de control son la comprobación del tamaño celular, la presencia de respuestas de daño del DNA, la monitorización de la replicación del DNA, la dependencia S-M postreplicación y la comprobación del huso mitótico y la segregación de las cromátidas hermanas [160].

Las quinasas dependientes de ciclinas (CDKs por sus siglas en inglés) son el elemento principal que conduce la progresión del ciclo mediante una interacción controlada entre las ciclinas y las CDKs. Estas quinasas adoptan su configuración activa cuando se unen a la ciclina, mientras que son inhibidas mediante la unión de pequeñas proteínas inhibitoras (CKIs, por sus siglas en inglés), así como por la fosforilación de las tirosinas, ya que así se bloquea la transferencia de los grupos fosfato a los sustratos [160].

El principal regulador del ciclo celular es la proteína p53, un factor de transcripción cuya expresión se induce bajo diferentes condiciones de estrés como daño en el DNA o privación de nutrientes. Su activación conduce a la parada del ciclo celular en cualquiera de sus fases y, por último, a la entrada de la célula en mecanismos de muerte celular. Aunque puede interactuar con diferentes promotores, la regulación del ciclo celular por p53 viene mediada principalmente por la inducción de la transcripción de la proteína p21. Esta proteína es un CKI que se une a los complejos ciclina E/Cdk2 y ciclina D/Cdk4. La inhibición de Cdk2 y Cdk4 impide la fosforilación de pRb (proteína del retinoblastoma), por lo que pRb se unirá a E2F1 (factor de transcripción 1 E2F), impidiendo su acción como factor de transcripción sobre genes necesarios para la transición a fase S. Además, p21 también puede bloquear la replicación del DNA mediante la interacción con el antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA). El complejo ciclina B/Cdk2 también se puede inhibir por la unión a p21, lo que conduce a la parada del ciclo celular en las fases G2/M. Otro fuerte elemento regulador a través de p53 es el complejo DREAM. La inhibición de diferentes CDKs por p21 impide la fosforilación de p107 y p130 que se unirán a otras proteínas para formar el complejo DREAM regulando, mediante la unión al sitio promotor CHR (región homóloga de genes del ciclo celular), la transcripción de más de 250 genes en su mayoría involucrados en el ciclo celular [161,162].

1.3.2. Necrosis

La necrosis es el tipo de muerte celular no programada, es decir, que ocurre de forma accidental cuando las células se ven sometidas a condiciones de estrés externos repentinos, tales como temperaturas extremas, hipoxia, radiación o estímulos mecánicos y químicos, que sobrepasan las condiciones fisiológicas e impiden el mantenimiento de la homeostasis celular. Al tratarse de un fenómeno espontáneo, independiente de energía, no requiere de la síntesis *de novo* de proteínas. Sin embargo, la proteólisis inducida por calpaínas y catepsinas, dos proteínas constitutivas, juega un papel importante. Las calpaínas son proteasas (cisteína-peptidasas) no lisosomales dependientes de calcio, mientras que la acción de las catepsinas depende del pH. Por lo tanto, la necrosis está estrechamente ligada al aumento de Ca^{2+} intracelular, así como al aumento de ROS, que modificará el pH intracelular. Como resultado de estos procesos se genera un hinchamiento celular, morfología característica de la célula necrótica que presenta una dilatación de los orgánulos internos que conduce a la ruptura temprana de la membrana plasmática y la liberación del contenido intracelular al medio extracelular [158]. Debido a la liberación de ciertos componentes celulares que puede actuar como marcadores de peligro, el proceso necrótico suele generar inflamación en el tejido [163], por lo que se trata de evitar la muerte celular por necrosis en las terapias anticancerígenas que persiguen la eliminación de las células tumorales.

1.3.3. Apoptosis

La apoptosis es el principal mecanismo de muerte celular programada. Se trata de un proceso homeostático encargado de mantener el balance de la población celular en los tejidos. Sin embargo, además de ser un mecanismo fisiológico para conservar el equilibrio entre

proliferación y eliminación celular, la apoptosis también es un proceso patológico que se desencadena como defensa ante determinadas señales de daño celular.

Los efectores finales encargados de llevar a cabo el proceso apoptótico son las caspasas. Estas proteasas de cisteína con especificidad por aspartato se activan una vez la célula entra en apoptosis, iniciando una cascada de sucesos que provocan el colapso celular [164].

Al contrario que en la necrosis, con la actividad de las caspasas la célula se encoge y sufre picnosis (condensación de la cromatina) seguida de cariorrexis (fragmentación nuclear) y, finalmente, la célula se separa en fragmentos conocidos como cuerpos apoptóticos. En estos cuerpos apoptóticos los orgánulos se mantienen intactos en el citoplasma rodeados por una membrana plasmática que mantiene su integridad. En última instancia, los cuerpos apoptóticos son fagocitados por macrófagos, que además pueden producir citoquinas antiinflamatorias, por lo que no existe la liberación del contenido intracelular propia de la necrosis ni los procesos inflamatorios asociados [163,165]. Esto convierte a la apoptosis en un mecanismo de muerte celular deseado en la terapia contra el cáncer [166].

Existen dos vías principales a través de las cuales se pueden activar las caspasas: la vía extrínseca y la vía intrínseca.

En la **vía extrínseca** o ruta de los mensajeros mortales, la apoptosis se desencadena en base a señales extracelulares, es decir, diferentes mensajeros y citoquinas, en su mayoría producidos por células NK o macrófagos, que actúan como ligandos de unos receptores de membrana conocidos como receptores de muerte. Estos receptores de muerte se activan cuando se unen a sus ligandos, permitiéndoles activar una proteína activadora que será la que finalmente reclute al receptor la pro-caspasa-8. Una vez en el receptor, la pro-caspasa-8 se hidroliza a nivel del predominio dando lugar a la caspasa-8 (Cas8) completamente activa. Esta caspasa es la encargada de activar en último lugar a las caspasas ejecutoras como la caspasa-6 (Cas6), la caspasa-7 (Cas7) y la más importante, la caspasa-3 (Cas3) que llevarán a cabo la activación de endonucleasas, la destrucción de proteínas nucleares y del citoesqueleto y el entrecruzamiento de proteínas, conduciendo finalmente a la formación de cuerpos apoptóticos y fagocitosis por los macrófagos. Las principales parejas receptor/ligando en humanos son los siguientes: TNF receptor 1/TNF; CD95 (Fas)/CD95-Ligando (Fas-L); DR3/TLIA; TRAIL-R1 y TRAIL-R2 (DR4)/TRAIL (Apo2-L) [167].

En la **vía intrínseca** o mitocondrial la apoptosis no viene regulada por estímulos externos, sino que se induce por estímulos internos tales como hipoxia, daño en el DNA o estrés oxidativo y del retículo endoplasmático (RE). Esta vía está regulada por una familia de proteínas llamada Bcl (proteína de leucemia/linfoma de células B), que incluye una serie de proteínas pro y anti-apoptóticas que mantienen la integridad de la membrana mitocondrial en la que se encuentran. Las proteínas anti-apoptóticas son Bcl-2, Bcl-xl, Bcl-W, Mcl-1 y BFL-1/A1 e inhiben la acción de sus análogas mediante interacciones proteína-proteína. Las pro-apoptóticas están divididas en 2 grupos, el primero incluye a Bax, Bak y Bok y el segundo a las proteínas solo-BH3 (Bad, Bid, Bik, Bim, BMF, HRK, Noxa y PUMA).

Cuando el equilibrio entre las proteínas pro-apoptóticas y anti-apoptóticas se rompe se generan canales en la membrana mitocondrial, lo que desencadena una cascada de sucesos que conducen a la activación de caspasas y, finalmente, la apoptosis. En primer lugar, cuando se produce la despolarización mitocondrial como consecuencia del desequilibrio entre las proteínas Bcl pro y antiapoptóticas, el citocromo *c* (Cyt *c*) que se encuentra en el espacio intermembrana de las mitocondrias se libera al citoplasma a través de los canales transmembrana. Una vez en el citoplasma, el Cyt *c* se une a Apaf-1 (factor apoptótico 1 activador de proteasas), reclutando a la pro-caspasa-9 y formando un complejo conocido como apoptosoma. En el apoptosoma, la pro-caspasa-9 se hidroliza para generar la forma activa de la caspasa-9 (Cas9), que a su vez llevará a cabo la activación proteolítica de las caspasas ejecutoras (Cas3, Cas6 y Cas7) [168].

Además del citocromo *c*, con la despolarización mitocondrial también se liberan otros elementos que pueden inducir la apoptosis independiente de caspasas. Tal es el caso del factor de inducción de apoptosis (AIF, por sus siglas en inglés) o la endonucleasa B, dos proteínas mitocondriales que se translocan al núcleo para activar la muerte celular mediante la fragmentación del DNA [168].

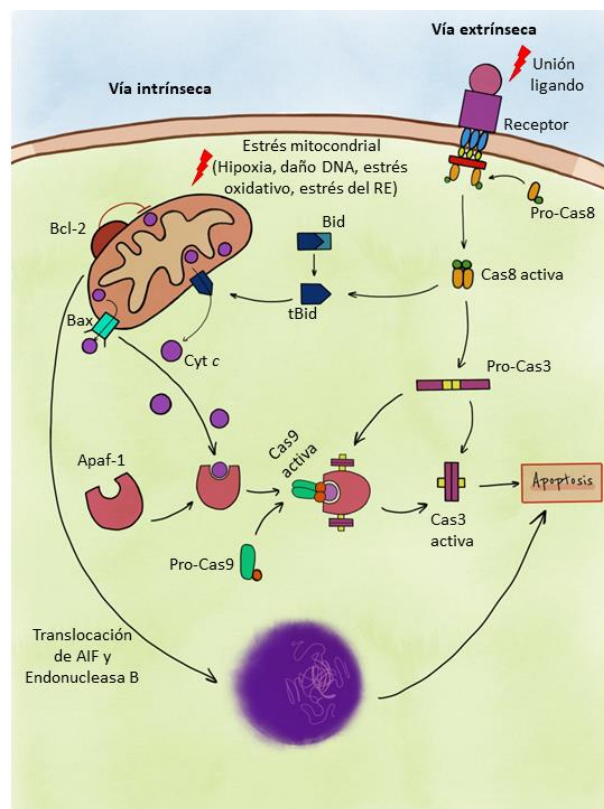


Figura 21. Esquema de las principales vías de apoptosis, con la cadena de eventos (cascadas de señalización) que inducen la unión de un ligando de muerte a su receptor (vía extrínseca) y el estrés y despolarización mitocondrial (vía intrínseca) y que derivan en la muerte celular.

Existe una vía de interacción entre las dos vías apoptóticas explicadas, ya que la ruta extrínseca puede desviarse y activar la ruta intrínseca como refuerzo. Como se observa en la figura 21, esto se hace mediante la proteína Bid (agonista de la muerte de dominio interactivo BH3) que sufre activación proteolítica por la Cas8. Una vez activa, tBid (la forma activa de Bid) se dirige a la mitocondria donde promueve la liberación del citocromo c, estimulando así la vía intrínseca de la apoptosis [168].

Existe una tercera vía, mediada por células T, en la que los linfocitos T citotóxicos (CTLs) segregan perforina, una proteína que genera poros transmembrana. Una vez abierto el poro, los CTLs liberan gránulos citoplasmáticos dentro de la célula diana a través de los poros. Los principales componentes de los gránulos secretados son dos proteasas de serina, la granzima A y la granzima B, que activan algunas caspasas como la caspasa-10 e inducen otras vías de apoptosis independientes de caspasas [169].

1.3.4. Otras formas de muerte celular

Existen otros mecanismos de muerte celular controlada o programada no apoptótica, entre los que destacan:

Necroptosis: se trata de una forma de muerte celular programada, pero que presenta características morfológicas propias de la necrosis. Este proceso es controlado y se activa mediante receptores de muerte como alternativa a la apoptosis cuando esta está impedida. El principal receptor involucrado es TNFR1, aunque también pueden inducir apoptosis TRAIL-R y Fas. Tras la activación del receptor de muerte por la unión a su ligando, este recluta a RIP1 (complejo pro-supervivencia I) poliubiquitinado. Tras desubiquitinarse, RIP1 queda libre en el citosol y recluta a RIP3 e induce la auto y trans-fosforilación. Posteriormente se recluta MLKL (*Mixed lineage kinase domain-like*) para terminar de formar el necrosoma. La fosforilación por RIP3 activa a la proteína MLKL, que migra a la membrana celular para permeabilizarla, conduciendo a la muerte por necroptosis [170].

Piroptosis: este tipo de muerte celular se inicia como respuesta a señales de daño o de patógenos intracelulares y se caracteriza por una morfología similar a la necrosis, con células hinchadas y poros en la membrana plasmática que termina rompiéndose y liberando el contenido citoplasmático con mediadores inflamatorios. La piroptosis está asociada a la inmunidad innata y se inicia con la activación de los receptores *Toll-like-4* (TLR4) que a su vez inducen la activación del NF- κ B, un factor de transcripción que potencia la transcripción de pro-caspasas y pro-interleuquinas (pro-IL). Posteriormente, unos complejos multiproteicos llamados inflasomas promueven la maduración de estas proteínas sobreexpresadas, dando lugar a las formas activas de IL-1 β , que induce un estado proinflamatorio, y de las caspasas-1 y -11, que activan por proteólisis la proteína gasdermina D (GSDMD). El dominio gasdermina-N de GSDMD migra a la membrana, donde forma poros provocando los fenómenos que conducen a la muerte celular [171,172].

Ferroptosis: este tipo de muerte celular se inicia por la peroxidación lipídica (ácidos grasos poliinsaturados) y la acumulación de ion ferroso (Fe^{2+}) y cursa con una morfología similar a la necrosis, además de presentar dismorfia mitocondrial con crestas reducidas, la membrana condensada y la membrana externa rota. Con la muerte celular se liberan patrones moleculares asociados al daño y alarminas, relacionados con la inflamación y la amplificación de la muerte celular, por lo que la ferroptosis tiene carácter inmunogénico [173]. La ferroptosis es un proceso regulado por muchos genes que comienza cuando el glutatión (GSH) intracelular disminuye o se agota, lo que impide que los peróxidos lipídicos se metabolicen por la acción de la glutatión peroxidasa 4 (GPX4), mientras que estos lípidos serán oxidados por el Fe^{2+} a través de la reacción de Fenton, generando un estrés oxidativo mediante la acumulación de ROS lipídico [174].

Autofagia: es un mecanismo con la particularidad de tener la doble función tanto de proteger como de matar células estresadas. Durante este proceso los diferentes componentes celulares que van desde proteínas aisladas hasta orgánulos dañados enteros o regiones completas de la célula se encapsulan en vesículas de doble membrana llamadas autofagosomas en el caso de la macroautofagia. Posteriormente, estas vesículas se fusionan con lisosomas formando el autofagolisosoma, en el que las proteasas que ahí se encuentran degradan su contenido. Aunque la función principal de la autofagia es digerir el contenido autofagolisosomal y reutilizarlo para generar nuevas estructuras celulares u obtener energía, también puede causar la muerte celular, hecho relacionado con la eliminación de células envejecidas o neoplásicas [175,176].

1.4. Dianas intracelulares

A la hora de inducir la muerte celular de las células cancerígenas, existen una gran variedad de dianas intracelulares a las que dirigir los fármacos. Generalmente, se trata de proteínas sobreexpresadas en células cancerosas, o que desarrollan una función clave a la hora de mantener el metabolismo acelerado y la continua proliferación de estas células. Esta estrategia permite dirigir la terapia de forma selectiva a las células cancerosas, disminuyendo los efectos secundarios sobre los tejidos sanos.

Existe por lo tanto un sinfín de dianas y rutas a las que atacar para eliminar las células cancerosas. Diferentes proteínas que mantienen el balance del estrés oxidativo como las integrantes del sistema glutatión, que incluye la glutatión reductasa (GSR), la glutatión peroxidasa (GPX) y la glutatión-s-transferasa (GST), que neutralizan el exceso de ROS generado en el tejido canceroso, son dianas habituales en muchos quimioterápicos [177].

También es frecuente dirigir fármacos contra proteínas o puntos de control del ciclo celular, inhibiendo la proliferación e induciendo la muerte celular, generalmente por apoptosis. Tal es el caso del NF- κ B [178], un factor de transcripción que regula la transcripción de una multitud de genes, la mayoría de ellos relacionados con la regulación del ciclo y la supervivencia celular.

El receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) es otro mediador de rutas de señalización celular involucradas en la supervivencia. Se trata de una glicoproteína *trans-*

membrana cuya activación desencadena cascadas de señalización relacionadas con la proliferación y la apoptosis, la angiogénesis y la metástasis, por lo que el uso de inhibidores de EGFR es otra de las estrategias contra el cáncer [179].

La ciclooxigenasa (COX) es la enzima encargada de la síntesis de prostaglandinas, por lo que está estrechamente relacionada con los procesos de inflamación y neoplasia. Aunque la isoforma COX-1 se expresa constitutivamente en muchos tejidos y regula procesos fisiológicos, la isoforma COX-2 suele ser inducida bajo una respuesta inflamatoria y está más relacionada con procesos patológicos como la carcinogénesis y la resistencia a quimio y radioterapia. Por lo tanto, la COX-2 es otra de las dianas de determinados fármacos potencialmente anticancerígenos [180].

Junto a todas estas, existen muchas otras dianas a las que dirigir los fármacos quimioterapéuticos. Sin embargo, para la presente tesis doctoral son de particular importancia la tiorredoxina reductasa (TrxR), el proteasoma y la anhidrasa carbónica (AC).

1.4.1. La Tiorredoxina Reductasa

La TrxR es una selenoproteína monomérica que incluye un grupo prostético FAD, un sitio de unión a NADPH y un centro activo redox muy conservado (-Cys-Val-Asn-Val-Gly-Cys-) caracterizado por la presencia de un grupo disulfuro entre las Cys. Esta enzima forma parte del sistema tiorredoxina (Trx) y cataliza la reducción dependiente de NADPH de la Trx oxidada para mantener la homeostasis redox en el interior celular. Sin embargo, en la región C-terminal presenta un segundo centro activo propio de la TrxR de mamíferos (-Gly-Cys-SeCys-Gly-) caracterizado por la presencia de la selenocisteína (SeCys), lo que le confiere la posibilidad de reducir una gran variedad de sustratos además de la Trx. Existen dos isoformas principales de la TrxR humana, la TrxR1 con localización citosólica y la TrxR2, que presenta un dominio de importación a la mitocondria en la región N-terminal [181].

Como se observa en la figura 22, la forma reducida de la Trx es catalíticamente activa y permite mantener el balance redox al activar peroxidasas que disminuyen los niveles de ROS (concretamente H₂O₂) intracelulares. Además, la Trx también regula vías de transducción de señales que controlan la proliferación y diferenciación celular, impidiendo la apoptosis al inhibir, en su forma reducida, a la proteína pro-apoptótica ASK1 (quinasa 1 reguladora de la señal de apoptosis), y juega un papel importante en la acción de la ribonucleótido reductasa en la síntesis del DNA. Por último, está involucrada en la regulación de la expresión génica mediante la interacción con diferentes factores de transcripción como el NF-κB, el factor inducido por hipoxia-1α (HIF-1α), o la proteína p53 [182,183].

Como resultado de las anomalías metabólicas, la disfunción mitocondrial, o la pérdida de función de p53, muchas células tumorales sufren un aumento en los niveles de ROS intracelulares. Aunque un incremento leve del ROS puede favorecer la proliferación de las células tumorales al inducir mutaciones del DNA y activar vías de señalización cancerígenas, el exceso de ROS afecta a componentes celulares como las proteínas y los lípidos, causando un

daño severo a la célula cancerosa. Como respuesta a este aumento de ROS, las células cancerosas suelen potenciar la síntesis de enzimas antioxidantes que aumenten la capacidad antioxidante celular para protegerse del daño oxidativo regulando los niveles de ROS [184].

En muchas células tumorales se ha observado una sobreexpresión de TrxR1 relacionada con la tumorigénesis y un peor pronóstico de la enfermedad. Esta sobreexpresión se da por la estimulación de la ruta de señalización Nrf2-Keap1 (factor nuclear (derivado de eritroide 2) similar al 2)-(proteína 2 asociada a ECH tipo Kelch) que se activa por el estrés oxidativo y finaliza con la translocación al núcleo del factor de transcripción Nrf2. Una vez en el núcleo Nrf2 activa la transcripción de genes regulados por elementos de respuesta antioxidante (AREs), entre los que se encuentra TrxR1 [185]. Por todo estos, la inhibición de la TrxR es una buena estrategia para acabar con estas células tumorales, ya que no solo dependen de la sobreexpresión del sistema TrxR/Trx para disminuir el estrés oxidativo tumoral, sino que son más sensibles a la inhibición de este sistema que las células sanas.

Tras el descubrimiento de la inhibición de la TrxR como uno de los mecanismos principales por los que el auranofin ejerce su acción anticancerígena, se desarrollaron nuevos complejos de oro dirigidos contra este enzima para eliminar las células tumorales. Esta inhibición es consecuencia de la capacidad de interacción del residuo de selenocisteína del centro activo de la TrxR con iones blandos como el oro(I), lo que provoca la desactivación selectiva de la enzima [186].

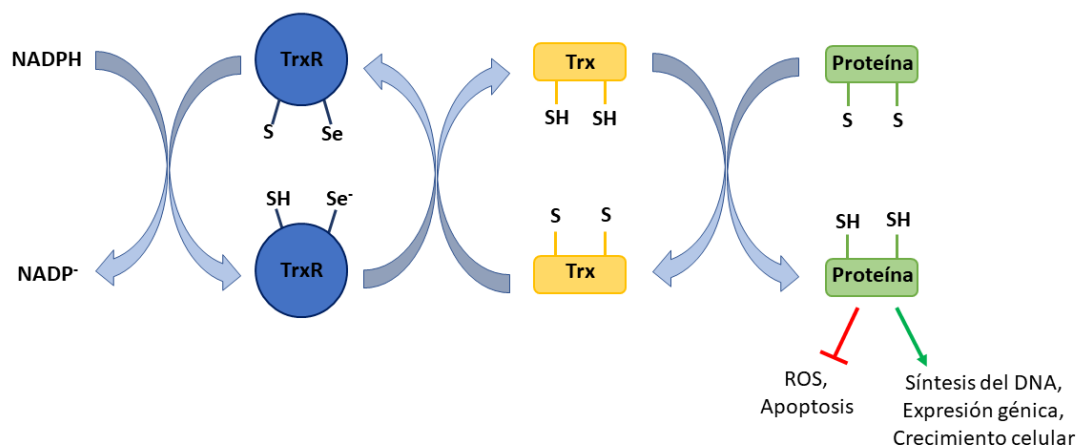


Figura 22. Mecanismo de acción por el que la TrxR reduce a la Trx. A su vez, la Trx(SH)₂ es capaz de reducir otras proteínas como la peroxidasas, el NF-κB, o la ribonucleótido reductasa. Por lo tanto, la acción de la TrxR permite, en última instancia, la reducción de los niveles de ROS, la correcta síntesis del DNA y la inducción de la expresión de genes anti-apoptóticos y proliferantes.

1.4.2. El Proteasoma

La degradación de las proteínas en las células puede ocurrir en diferentes compartimentos como el citosol, los lisosomas, el retículo endoplasmático e incluso la membrana. Las proteínas pueden ser destinadas a su degradación citosólica en función de diferentes factores como la presencia de secuencias específicas o determinados residuos del aminoácido N-terminal, la exposición de regiones hidrófobas en las proteínas envejecidas y, la más importante, modificaciones

postraduccionales. Estas modificaciones postraduccionales son clave para la principal vía de proteólisis citosólica en eucariotas: el sistema ubiquitin-proteasoma (UPS) [187].

El UPS se basa en la unión covalente de ubiquitina (Ub), una proteína de 76 aminoácidos, a diferentes residuos de lisina de la proteína que es marcada para su degradación en el proteasoma. La ubiquitinación es un proceso enzimático en el que, en primer lugar, la Ub se activa por la enzima E1 (Ub-activadora) y transferida a la enzima portadora E2 (Ub-conjugadora), que finalmente transfiere la Ub a la proteína diana con ayuda de la enzima E3 (Ub-ligasa) [187].

El proteasoma es un complejo enzimático (proteasoma 26S) cuyo centro activo proteolítico reside en el interior de una cámara con forma de barril que corresponde al núcleo peptidasa 20S (figura 23). El acceso a este núcleo catalítico está controlado por las regiones reguladoras 19S en cada uno de los extremos del proteasoma 20S, impidiendo la entrada de proteínas plegadas o péptidos desplegados muy largos. Sin embargo, canaliza las proteínas apropiadas al interior del núcleo peptidasa después de ser debidamente desubiquitinadas y desplegadas. Esta región reguladora está compuesta por varias subunidades con diferentes actividades entre las que destacan ATPasas, subunidades de reconocimiento y unión a ubiquitina, desubiquitininasas y chaperonas reversas [188].

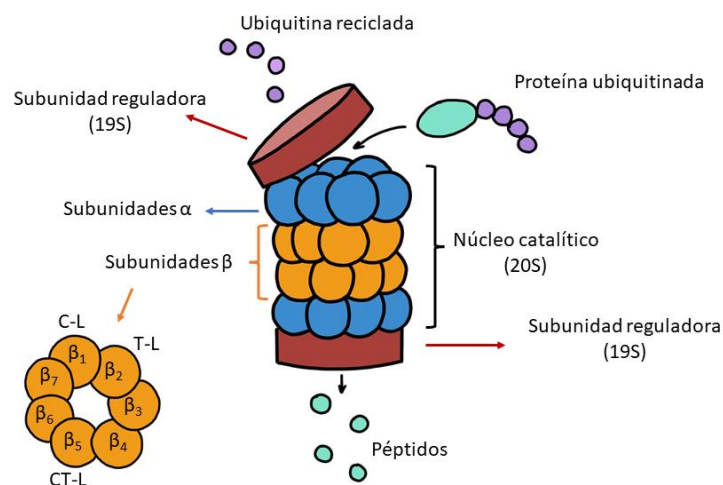


Figura 23. Esquema de la estructura del proteasoma, con los 4 anillos heptaméricos del núcleo catalítico (proteasoma 20S). Las subunidades reguladoras 19S controlan, junto a los anillos exteriores (subunidades α), el paso de las proteínas a los anillos interiores. Éstos, con las subunidades β , poseen la actividad proteasa (β_1 actividad C-L, β_2 actividad T-L y β_5 actividad CT-L) para hidrolizar las proteínas en péptidos pequeños (< 50 aminoácidos).

El proteasoma 20S es un complejo altamente conservado formado por 4 anillos heptaméricos apilados. Los dos anillos exteriores están formados por 7 subunidades α , mientras que los dos anillos interiores los componen 7 subunidades β . Mientras los anillos α controlan el paso de los sustratos, sobre todo a través de una extensión peptídica N-terminal de la subunidad α_3 , las subunidades β contienen los centros activos proteolíticos. De las siete subunidades β , tres de ellas mantienen la actividad proteolítica: β_1 con actividad tipo caspasa (actividad C-L, o PGPH -

peptidilglutamil péptido hidrolasa-), $\beta 2$ con actividad tipo tripsina (actividad T-L) y $\beta 5$ con actividad tipo quimotripsina (actividad CT-L) [189].

Tanto las células normales como las células tumorales necesitan del proteasoma para su correcto funcionamiento, ya que la vía de degradación UPS controla la actividad y expresión de proteínas involucradas en el control del ciclo y la muerte celular. Sin embargo, las células transformadas suelen presentar desregulaciones en el UPS, lo que conlleva variaciones en la degradación de proteínas que contribuyen a la oncogénesis. Estas modificaciones pueden disminuir los niveles de proteínas supresoras de tumores como la p53 o el inhibidor de quinasas dependientes de ciclina 1B (p27), así como estimular la activación de proteínas oncogénicas como NF- κ B [190].

Por lo tanto, la inhibición del proteasoma puede ser una estrategia a seguir para inducir la muerte por apoptosis en células cancerosas. Se ha postulado que la apoptosis puede inducirse mediante la inhibición de la degradación del inhibidor de NF- κ B (I κ B), lo que impide la translocación de NF- κ B al núcleo para ejercer su función. Además la inhibición del proteasoma también puede alterar el ciclo celular por la inhibición de la degradación de proteínas reguladoras, alteración del equilibrio entre proteínas pro y anti-apoptóticas, inducción de estrés del retículo endoplasmático e inhibición de la angiogénesis y de la reparación del DNA [190].

Muchos ensayos preclínicos han mostrado la capacidad de moléculas pequeñas para inducir la apoptosis en líneas celulares y modelos murinos de cáncer mediante la inhibición del proteasoma, principalmente de la actividad CT-L de la subunidad $\beta 5$, como es el caso del bortezomib. En los últimos años se han desarrollado complejos metálicos con ligandos ditiocarbamato capaces de inhibir la subunidad $\beta 5$, comprometiendo la proliferación de células cancerosas *in vitro* [191]. Por lo tanto, el proteasoma se considera una posible diana para los complejos de oro, sobre todo para aquellos con ligandos ditiocarbamato [192,193].

1.4.3. La anhidrasa carbónica

La anhidrasa carbónica (AC) es una enzima ubicua extendida por todos los animales, plantas y bacterias. Aunque existen 5 familias genéticas diferentes de AC sin relación evolutiva, solo la α se encuentra en animales y, por lo tanto, en humanos. En humanos existen 15 isoformas distintas, de las cuales solo 12 son catalíticamente activas gracias a la presencia de un centro metálico de Zn^{2+} coordinado a tres residuos de histidina en disposición tetraédrica y una molécula de agua coordinada a él. Estas enzimas están estrechamente relacionadas con la homeostasis del pH, ya que cataliza la hidratación del CO_2 para generar HCO_3^- y H^+ [194,195].

De las 15 isoformas son de relevancia para el cáncer la AC IX y la AC XII, dos isoformas de superficie celular. Mientras que la AC XII se encuentra presente en las células de manera constitutiva, estando su expresión incrementada en algunos tumores, la isoforma IX es exclusiva de determinados tumores como el de mama, riñón o colon. La condición de hipoxia bajo la que se encuentran de manera habitual las células cancerosas permite la activación del HIF-1 que ejerce su actividad como factor de transcripción promoviendo la transcripción de AC IX [196].

Este aumento de la expresión de determinadas isoformas de ACs es necesario para la supervivencia de las células tumorales, ya que les permite mantener el pH intracelular a la vez que acidifica el microambiente tumoral, perjudicando a las células sanas circundantes y favoreciendo la metástasis [197].

Todo esto sugiere que la inhibición de estas enzimas podría comprometer la viabilidad de las células cancerosas. En concreto, el desarrollo de nuevos fármacos dirigidos específicamente a la AC IX sería de gran utilidad, ya que esta isoforma es propia de las células cancerosas y su inhibición no afectaría a las células sanas.

Las sulfonamidas son inhibidores selectivos de las ACs y en concreto el inhibidor de la AC IX U-140, derivado basado en sulfonamidas, se encuentra en ensayos preclínicos como quimioterápico [195]. Por lo tanto, en el capítulo IV.3. se evaluará la influencia de ligandos ditiocarbamatos derivados de sulfonamidas en el efecto anticancerígeno de los complejos de oro(I) y su capacidad para inhibir la AC IX.

REFERENCIAS:

1. Hanahan, D.; Weinberg, R.A. The hallmarks of cancer. *Cell* **2000**, *100*, 57-70, doi:Doi 10.1016/S0092-8674(00)81683-9.
2. Sung, H.; Ferlay, J.; Siegel, R.L.; Laversanne, M.; Soerjomataram, I.; Jemal, A.; Bray, F. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *Ca-Cancer J Clin* **2021**, *71*, 209-249, doi:10.3322/caac.21660.
3. Odes, E.J.; Randolph-Quinney, P.S.; Steyn, M.; Throckmorton, Z.; Smilg, J.S.; Zipfel, B.; Augustine, T.N.; de Beer, F.; Hoffman, J.W.; Franklin, R.D.; et al. Earliest hominin cancer: 1.7-million-year-old osteosarcoma from Swartkrans Cave, South Africa. *S Afr J Sci* **2016**, *112*, 100-104, doi:ARTN 2015-0471 10.17159/sajs.2016/20150471.
4. Chene, G.; Lamblin, G.; Le Bail-Carval, K.; Beaufils, E.; Chabert, P.; Gaucherand, P.; Mellier, G.; Coppens, Y. Le(s) cancer(s) de Lucy: une origine préhistorique? *Gynecologie Obstetrique et Fertilité* **2016**, *44*, 690-700.
5. Ekhtiari, S.; Chiba, K.; Popovic, S.; Crowther, R.; Wohl, G.; Wong, A.K.O.; Tanke, D.H.; Dufault, D.M.; Geen, O.D.; Parasu, N.; et al. History of Medicine First case of osteosarcoma in a dinosaur: a multimodal diagnosis. *Lancet Oncol* **2020**, *21*, 1021-1022.
6. Rothschild, B.M.; Tanke, D.; Hershkovitz, I.; Schultz, M. Mesozoic neoplasia: origins of haemangioma in the Jurassic age. *Lancet* **1998**, *351*, 1862-1862, doi:Doi 10.1016/S0140-6736(05)78809-7.
7. Breasted, J.H. *The Edwin Smith Surgical Papyrus, Volume 1: Hieroglyphic Transliteration, Translation, and Commentary*; The University of Chicago Press: Chicago, 1930.
8. Ebbel, B. *The papyrus Ebers: the greatest Egyptian medical document*; Copenhagen : Levin & Munksgaard: 1937.
9. Hajdu, S.I. A Note From History: Landmarks in History of Cancer, Part 2. *Cancer-Am Cancer Soc* **2011**, *117*, 2811-2820, doi:10.1002/cncr.25825.
10. Hajdu, S.I.; Darvishian, F. A Note from History: Diagnosis and Treatment of Tumors by Physicians in Antiquity. *Ann Clin Lab Sci* **2010**, *40*, 386-390.
11. Sudhakar, A. History of Cancer, Ancient and Modern Treatment Methods. *J Cancer Sci Ther* **2009**, *1*, 1-4, doi:10.4172/1948-5956.100000e2.
12. Carbone, A. Cancer Classification at the Crossroads. *Cancers (Basel)* **2020**, *12*, doi:10.3390/cancers12040980.
13. Bertero, L.; Massa, F.; Metovic, J.; Zanetti, R.; Castellano, I.; Ricardi, U.; Papotti, M.; Cassoni, P. Eighth Edition of the UICC Classification of Malignant Tumours: an overview of the changes in the pathological TNM classification criteria-What has changed and why? *Virchows Arch* **2018**, *472*, 519-531, doi:10.1007/s00428-017-2276-y.
14. Labianca, R.; Beretta, G.D.; Kildani, B.; Milesi, L.; Merlin, F.; Mosconi, S.; Pessi, M.A.; Prochilo, T.; Quadri, A.; Gatta, G.; et al. Colon cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* **2010**, *74*, 106-133, doi:10.1016/j.critrevonc.2010.01.010.
15. Sanabria, M.C.; Umaña, A.; Serrano, M.L.; Sánchez, M.; Mesa, J.; Hernández, G.A. Vías de carcinogénesis colorrectal y sus implicaciones clínicas. *Revista Colombiana de Cancerología* **2012**, *16*, 170-181.
16. Carvalho, B.; Sillars-Hardebol, A.H.; Postma, C.; Mongera, S.; Droste, J.T.S.; Obulkasim, A.; van de Wiel, M.; van Criekeing, W.; Ylstra, B.; Fijneman, R.J.A.; et al. Colorectal adenoma to carcinoma progression is accompanied by changes in gene expression associated with ageing, chromosomal instability, and fatty acid metabolism. *Cell Oncol* **2012**, *35*, 53-63, doi:10.1007/s13402-011-0065-1.
17. Fearon, E.R. Molecular genetics of colorectal cancer. *Annu Rev Pathol* **2011**, *6*, 479-507, doi:10.1146/annurev-pathol-011110-130235.

18. Komiya, Y.; Habas, R. Wnt signal transduction pathways. *Organogenesis* **2008**, *4*, 68-75, doi:10.4161/org.4.2.5851.
19. Nakayama, M.; Oshima, M. Mutant p53 in colon cancer. *J Mol Cell Biol* **2019**, *11*, 267-276, doi:10.1093/jmcb/mjy075.
20. Porru, M.; Pompili, L.; Caruso, C.; Biroccio, A.; Leonetti, C. Targeting KRAS in metastatic colorectal cancer: current strategies and emerging opportunities. *J Exp Clin Cancer Res* **2018**, *37*, 57, doi:10.1186/s13046-018-0719-1.
21. Cox, A.D.; Fesik, S.W.; Kimmelman, A.C.; Luo, J.; Der, C.J. Drugging the undruggable RAS: Mission possible? *Nat Rev Drug Discov* **2014**, *13*, 828-851, doi:10.1038/nrd4389.
22. Sullivan, K.M.; Kozuch, P.S. Impact of KRAS Mutations on Management of Colorectal Carcinoma. *Patholog Res Int* **2011**, *2011*, 219309, doi:10.4061/2011/219309.
23. Li, Z.N.; Zhao, L.; Yu, L.F.; Wei, M.J. BRAF and KRAS mutations in metastatic colorectal cancer: future perspectives for personalized therapy. *Gastroenterol Rep (Oxf)* **2020**, *8*, 192-205, doi:10.1093/gastro/goaa022.
24. Zhu, G.; Pei, L.; Xia, H.; Tang, Q.; Bi, F. Role of oncogenic KRAS in the prognosis, diagnosis and treatment of colorectal cancer. *Mol Cancer* **2021**, *20*, 143, doi:10.1186/s12943-021-01441-4.
25. Papadatos-Pastos, D.; Rabbie, R.; Ross, P.; Sarker, D. The role of the PI3K pathway in colorectal cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* **2015**, *94*, 18-30, doi:10.1016/j.critrevonc.2014.12.006.
26. Allevato, M.; Bolotin, E.; Grossman, M.; Mane-Padros, D.; Sladek, F.M.; Martinez, E. Sequence-specific DNA binding by MYC/MAX to low-affinity non-E-box motifs. *PLoS One* **2017**, *12*, e0180147, doi:10.1371/journal.pone.0180147.
27. He, W.L.; Weng, X.T.; Wang, J.L.; Lin, Y.K.; Liu, T.W.; Zhou, Q.Y.; Hu, Y.; Pan, Y.; Chen, X.L. Association Between c-Myc and Colorectal Cancer Prognosis: A Meta-Analysis. *Front Physiol* **2018**, *9*, 1549, doi:10.3389/fphys.2018.01549.
28. Slattery, M.L.; Herrick, J.S.; Mullany, L.E.; Samowitz, W.S.; Sevens, J.R.; Sakoda, L.; Wolff, R.K. The co-regulatory networks of tumor suppressor genes, oncogenes, and miRNAs in colorectal cancer. *Genes Chromosomes Cancer* **2017**, *56*, 769-787, doi:10.1002/gcc.22481.
29. Mármol, I.; Quero, J.; Rodríguez-Yoldi, M.J. Modifiable and Non-Modifiable Risk Factors of Colorectal Cancer. In *Advances in Health and Disease*, Duncan, L.T., Ed.; Nova Science Publishers, Inc: New York, 2018; Volume 7.
30. Mármol, I.; Sánchez-de-Diego, C.; Pradilla-Dieste, A.; Cerrada, E.; Rodríguez-Yoldi, M.J. Colorectal Carcinoma: A General Overview and Future Perspectives in Colorectal Cancer. *International Journal of Molecular Sciences* **2017**, *18*, 197.
31. Ryan, E.; Sheahan, K.; Creavin, B.; Mohan, H.M.; Winter, D.C. The current value of determining the mismatch repair status of colorectal cancer: A rationale for routine testing. *Crit Rev Oncol Hematol* **2017**, *116*, 38-57, doi:10.1016/j.critrevonc.2017.05.006.
32. Bulow, S. Results of national registration of familial adenomatous polyposis. *Gut* **2003**, *52*, 742-746, doi:10.1136/gut.52.5.742.
33. Fodde, R. The APC gene in colorectal cancer. *Eur J Cancer* **2002**, *38*, 867-871, doi:10.1016/s0959-8049(02)00040-0.
34. Calva-Cerqueira, D.; Chinnathambi, S.; Pechman, B.; Bair, J.; Larsen-Haidle, J.; Howe, J.R. The rate of germline mutations and large deletions of SMAD4 and BMPR1A in juvenile polyposis. *Clin Genet* **2009**, *75*, 79-85, doi:10.1111/j.1399-0004.2008.01091.x.
35. Schumacher, V.; Vogel, T.; Leube, B.; Driemel, C.; Goecke, T.; Moslein, G.; Royer-Pokora, B. STK11 genotyping and cancer risk in Peutz-Jeghers syndrome. *J Med Genet* **2005**, *42*, 428-435, doi:10.1136/jmg.2004.026294.
36. Marsh Durban, V.; Jansen, M.; Davies, E.J.; Morsink, F.H.; Offerhaus, G.J.; Clarke, A.R. Epithelial-specific loss of PTEN results in colorectal juvenile polyp formation and invasive cancer. *Am J Pathol* **2014**, *184*, 86-91, doi:10.1016/j.ajpath.2013.10.003.

37. Herreros de Tejada, A.; Gonzalez-Lois, C.; Santiago, J. Serrated lesions and serrated polyposis syndrome. *Rev Esp Enferm Dig* **2017**, *109*, 516-526, doi:10.17235/reed.2017.4065/2015.
38. Luo, C.; Zhang, H. The Role of Proinflammatory Pathways in the Pathogenesis of Colitis-Associated Colorectal Cancer. *Mediators Inflamm* **2017**, *2017*, 5126048, doi:10.1155/2017/5126048.
39. Kim, E.R.; Chang, D.K. Colorectal cancer in inflammatory bowel disease: the risk, pathogenesis, prevention and diagnosis. *World J Gastroenterol* **2014**, *20*, 9872-9881, doi:10.3748/wjg.v20.i29.9872.
40. Allen-Vercoe, E.; Jobin, C. Fusobacterium and Enterobacteriaceae: important players for CRC? *Immunol Lett* **2014**, *162*, 54-61, doi:10.1016/j.imlet.2014.05.014.
41. Kyro, C.; Skeie, G.; Loft, S.; Overvad, K.; Christensen, J.; Tjonneland, A.; Olsen, A. Adherence to a healthy Nordic food index is associated with a lower incidence of colorectal cancer in women: the Diet, Cancer and Health cohort study. *Br J Nutr* **2013**, *109*, 920-927, doi:10.1017/S0007114512002085.
42. O'Keefe, S.J.; Li, J.V.; Lahti, L.; Ou, J.; Carbonero, F.; Mohammed, K.; Posma, J.M.; Kinross, J.; Wahl, E.; Ruder, E.; et al. Fat, fibre and cancer risk in African Americans and rural Africans. *Nat Commun* **2015**, *6*, 6342, doi:10.1038/ncomms7342.
43. Steppeler, C.; Sodring, M.; Egelanddal, B.; Kirkhus, B.; Oostindjer, M.; Alvseike, O.; Gangsei, L.E.; Hovland, E.M.; Pierre, F.; Paulsen, J.E. Effects of dietary beef, pork, chicken and salmon on intestinal carcinogenesis in A/J Min/+ mice. *PLoS One* **2017**, *12*, e0176001, doi:10.1371/journal.pone.0176001.
44. Loke, Y.L.; Chew, M.T.; Ngeow, Y.F.; Lim, W.W.D.; Peh, S.C. Colon Carcinogenesis: The Interplay Between Diet and Gut Microbiota. *Front Cell Infect Microbiol* **2020**, *10*, 603086, doi:10.3389/fcimb.2020.603086.
45. Young, G.P.; Hu, Y.; Le Leu, R.K.; Nyskohus, L. Dietary fibre and colorectal cancer: a model for environment--gene interactions. *Mol Nutr Food Res* **2005**, *49*, 571-584, doi:10.1002/mnfr.200500026.
46. Guerin, A.; Mody, R.; Fok, B.; Lasch, K.L.; Zhou, Z.; Wu, E.Q.; Zhou, W.; Talley, N.J. Risk of developing colorectal cancer and benign colorectal neoplasm in patients with chronic constipation. *Aliment Pharmacol Ther* **2014**, *40*, 83-92, doi:10.1111/apt.12789.
47. Kim, G.W.; Gocevski, G.; Wu, C.J.; Yang, X.J. Dietary, metabolic, and potentially environmental modulation of the lysine acetylation machinery. *Int J Cell Biol* **2010**, *2010*, 632739, doi:10.1155/2010/632739.
48. Moore, S.C.; Lee, I.M.; Weiderpass, E.; Campbell, P.T.; Sampson, J.N.; Kitahara, C.M.; Keadle, S.K.; Arem, H.; Berrington de Gonzalez, A.; Hartge, P.; et al. Association of Leisure-Time Physical Activity With Risk of 26 Types of Cancer in 1.44 Million Adults. *JAMA Intern Med* **2016**, *176*, 816-825, doi:10.1001/jamainternmed.2016.1548.
49. Chen, J.; Guo, Y.; Gui, Y.; Xu, D. Physical exercise, gut, gut microbiota, and atherosclerotic cardiovascular diseases. *Lipids Health Dis* **2018**, *17*, 17, doi:10.1186/s12944-017-0653-9.
50. Huang, R.; Ho, S.Y.; Lo, W.S.; Lam, T.H. Physical activity and constipation in Hong Kong adolescents. *PLoS One* **2014**, *9*, e90193, doi:10.1371/journal.pone.0090193.
51. Nunez, C.; Nair-Shalliker, V.; Egger, S.; Sitas, F.; Bauman, A. Physical activity, obesity and sedentary behaviour and the risks of colon and rectal cancers in the 45 and up study. *BMC Public Health* **2018**, *18*, 325, doi:10.1186/s12889-018-5225-z.
52. Bagnardi, V.; Rota, M.; Botteri, E.; Tramacere, I.; Islami, F.; Fedirko, V.; Scotti, L.; Jenab, M.; Turati, F.; Pasquali, E.; et al. Alcohol consumption and site-specific cancer risk: a comprehensive dose-response meta-analysis. *Br J Cancer* **2015**, *112*, 580-593, doi:10.1038/bjc.2014.579.
53. Ordonez-Mena, J.M.; Schottker, B.; Mons, U.; Jenab, M.; Freisling, H.; Bueno-De-Mesquita, B.; O'Doherty, M.G.; Scott, A.; Kee, F.; Stricker, B.H.; et al. Quantification of

- the smoking-associated cancer risk with rate advancement periods: meta-analysis of individual participant data from cohorts of the CHANCES consortium. *Bmc Med* **2016**, *14*, doi:ARTN 6210.1186/s12916-016-0607-5.
54. Elamin, E.; Masclee, A.; Troost, F.; Dekker, J.; Jonkers, D. Activation of the epithelial-to-mesenchymal transition factor snail mediates acetaldehyde-induced intestinal epithelial barrier disruption. *Alcohol Clin Exp Res* **2014**, *38*, 344-353, doi:10.1111/acer.12234.
 55. Seitz, H.K.; Stickel, F. Acetaldehyde as an underestimated risk factor for cancer development: role of genetics in ethanol metabolism. *Genes Nutr* **2010**, *5*, 121-128, doi:10.1007/s12263-009-0154-1.
 56. <https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-colon-o-recto/deteccion-diagnostico-clasificacion-por-etapas/deteccion.html> Available online: (accessed on January 28, 2022).
 57. Salas Caudevilla, A. Evaluación de la displasia en las enfermedades digestivas. *Gastroenterología y Hepatología* **2007**, *30*, 602-611, doi:10.1157/13112598.
 58. *Cáncer colorrectal: una guía para pacientes*. Fundación Contra el Cáncer: 2016.
 59. *Guía de práctica clínica: Diagnóstico y prevención del cáncer colorrectal*. Asociación Española de Gastroenterología y Sociedad Española de Medicina de Familia y Comunitaria: Madrid, 2018.
 60. Global Health Estimates 2020: Deaths by cause, age, sex, by country and by region, 2000-2019. <https://www.who.int/data/gho/data/themes/mortality-and-global-health-estimates/ghe-leading-causes-of-death>. Available online: (accessed on February 10, 2022).
 61. Van der Jeught, K.; Xu, H.C.; Li, Y.J.; Lu, X.B.; Ji, G. Drug resistance and new therapies in colorectal cancer. *World J Gastroenterol* **2018**, *24*, 3834-3848, doi:10.3748/wjg.v24.i34.3834.
 62. Rieder, E.; Swanstrom, L.L. Advances in cancer surgery: Natural orifice surgery (NOTES) for oncological diseases. *Surg Oncol* **2011**, *20*, 211-218, doi:10.1016/j.suronc.2010.07.005.
 63. DeVita Jr, V.T.; Chu, E. A history of cancer chemotherapy. *Cancer Research* **2008**, *68*, 8643-8653.
 64. Nygren, P. What is cancer chemotherapy? *Acta Oncologica* **2001**, *40*, 166-174.
 65. Baskar, R.; Yap, S.P.; Chua, K.L.M.; Itahana, K. The diverse and complex roles of radiation on cancer treatment: therapeutic target and genome maintenance. *Am J Cancer Res* **2012**, *2*, 372-382.
 66. Mohan, G.; Ayisha-Hamna, T.P.; Jijo, A.J.; Saradha-Devi, K.M.; Narayanasamy, A.; Vellingiri, B. Recent advances on radiotherapy and its associated side effects in cancer-a review. *The Journal of Basic and Applied Zoology* **2019**, *80*, 14.
 67. Baskar, R.; Lee, K.A.; Yeo, R.; Yeoh, K.W. Cancer and radiation therapy. Current advances and future directions. *International Journal of Medical Sciences* **2012**, *9*, 193-199.
 68. Oldham, R.K. Cancer Biotherapy: More Than Immunotherapy. *Cancer Biother Radio* **2017**, *32*, 111-114, doi:10.1089/cbr.2017.28999.old.
 69. Zahavi, D.; Weiner, L. Monoclonal Antibodies in Cancer Therapy. *Antibodies* **2020**, *9*, doi:ARTN 3410.3390/antib9030034.
 70. Modest, D.P.; Pant, S.; Sartore-Bianchi, A. Treatment sequencing in metastatic colorectal cancer. *European Journal of Cancer* **2019**, *109*, 70-83.
 71. Biller, L.H.; Schrag, D. Diagnosis and Treatment of Metastatic Colorectal Cancer: A Review. *JAMA* **2021**, *325*, 669-685, doi:10.1001/jama.2021.0106.
 72. Wujastyk, m.D. Histories of Mercury in Medicine across Asia and Beyond. *Asiatische Studien* **2015**, *69*, 819-830.
 73. Norn, S.; Permin, H.; Kruse, E.; Kruse, P.R. Mercury--a major agent in the history of medicine and alchemy. *Dan Medicinhist Arbog* **2008**, *36*, 21-40.

74. Karri, S.K.; Saper, R.B.; Kales, S.N. Lead encephalopathy due to traditional medicines. *Curr Drug Saf* **2008**, *3*, 54-59, doi:10.2174/157488608783333907.
75. Kulik-Kupka, K.; Koszowska, A.; Bronczyk-Puzon, A.; Nowak, J.; Gwizdek, K.; Zubelewicz-Szkodzinska, B. [Arsenic - Poison or medicine?]. *Med Pr* **2016**, *67*, 89-96, doi:10.13075/mp.5893.00322.
76. Graf, N.; Lippard, S.J. Redox activation of metal-based prodrugs as a strategy for drug delivery. *Adv Drug Deliver Rev* **2012**, *64*, 993-1004, doi:10.1016/j.addr.2012.01.007.
77. Romero-Canelon, I.; Sadler, P.J. Next-Generation Metal Anticancer Complexes: Multitargeting via Redox Modulation. *Inorganic Chemistry* **2013**, *52*, 12276-12291, doi:10.1021/ic400835n.
78. Ma, D.L.; Chan, D.S.H.; Leung, C.H. Group 9 Organometallic Compounds for Therapeutic and Bioanalytical Applications. *Accounts Chem Res* **2014**, *47*, 3614-3631, doi:10.1021/ar500310z.
79. Heffern, M.C.; Matosziuk, L.M.; Meade, T.J. Lanthanide Probes for Bioresponsive Imaging. *Chem Rev* **2014**, *114*, 4496-4539, doi:10.1021/cr400477t.
80. Caravan, P.; Ellison, J.J.; McMurry, T.J.; Lauffer, R.B. Gadolinium(III) chelates as MRI contrast agents: Structure, dynamics, and applications. *Chem Rev* **1999**, *99*, 2293-2352, doi:DOI 10.1021/cr980440x.
81. Bartholoma, M.D.; Louie, A.S.; Valliant, J.F.; Zubieta, J. Technetium and Gallium Derived Radiopharmaceuticals: Comparing and Contrasting the Chemistry of Two Important Radiometals for the Molecular Imaging Era. *Chem Rev* **2010**, *110*, 2903-2920, doi:10.1021/cr1000755.
82. Ghosh, S. Cisplatin: The first metal based anticancer drug. *Bioorg Chem* **2019**, *88*, doi:ARTN 10292510.1016/j.bioorg.2019.102925.
83. Kostova, I. Platinum complexes as anticancer agents. *Recent Pat Anti-Canc* **2006**, *1*, 1-22, doi:Doi 10.2174/157489206775246458.
84. Marmol, I.; Montanel-Perez, S.; Royo, J.C.; Gimeno, M.C.; Villacampa, M.D.; Rodriguez-Yoldi, M.J.; Cerrada, E. Gold(I) and Silver(I) Complexes with 2-Anilinopyridine-Based Heterocycles as Multitarget Drugs against Colon Cancer. *Inorg Chem* **2020**, *59*, 17732-17745, doi:10.1021/acs.inorgchem.0c02922.
85. Ndagi, U.; Mhlongo, N.; Soliman, M.E. Metal complexes in cancer therapy - an update from drug design perspective. *Drug Des Dev Ther* **2017**, *11*, 599-616, doi:10.2147/Dddt.S119488.
86. Pedrosa, P.; Carvalho, A.; Baptista, P.V.; Fernandes, A.R. Inorganic coordination chemistry: where we stand in cancer treatment? In *Basic Concepts Viewed from Frontier in Inorganic Coordinatino Chemistry [Internet]*, Akitsu, T., Ed.; IntechOpen: London, 2018.
87. Paprocka, R.; Wiese-Szadkowska, M.; Janciauskiene, A.; Komalski, T.; Kulik, M.; Helmin-Basa, A. Latest developments in metal complexes as anticancer agents. *Coordination Chemistry Reviews* **2022**, *452*, 214307.
88. Zhao, H.Z.; Ning, Y.T. China's ancient gold drugs. *Gold Bull* **2001**, *34*, 24-29.
89. Fricker, S.P. Medical Uses of Gold Compounds: Past, Present and Future. *Gold Bull* **1996**, *29*, 53-60.
90. Yamashita, M. Auranofin: Past to Present, and repurposing. *Int Immunopharmacol* **2021**, *101*, doi:ARTN 10827210.1016/j.intimp.2021.108272.
91. Abdalbari, F.H.; Telleria, C.M. The gold complex auranofin: new perspectives for cancer therapy. *Discov Oncol* **2021**, *12*, doi:ARTN 4210.1007/s12672-021-00439-0.
92. Marmol, I.; Quero, J.; Rodriguez-Yoldi, M.J.; Cerrada, E. Gold as a Possible Alternative to Platinum-Based Chemotherapy for Colon Cancer Treatment. *Cancers* **2019**, *11*, doi:ARTN 78010.3390/cancers11060780.
93. Yeo, C.I.; Ooi, K.K.; Tiekink, E.R.T. Gold-Based Medicine: A Paradigm Shift in Anti-Cancer Therapy? *Molecules* **2018**, *23*, doi:ARTN 141010.3390/molecules23061410.

94. Nobili, S.; Mini, E.; Landini, I.; Gabbiani, C.; Casini, A.; Messori, L. Gold Compounds as Anticancer Agents: Chemistry, Cellular Pharmacology, and Preclinical Studies. *Med Res Rev* **2010**, *30*, 550-580.
95. Ronconi, L.; Marzano, C.; Zanello, P.; Corsini, M.; Miolo, G.; Macca, 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*, 1648-1657, doi:10.1021/jm0509288.
96. Aguilar-Cuevas, O.; Castro-Ramírez, R.; Sánchez-García, J.J.; López-Sandoval, H.; Barba-Behrens, N. Química inorgánica medicinal: vanadio, platino, oro. *Educación Química* **2012**, *23*, 33-40.
97. Tiekink, E.R.T. Gold derivatives for the treatment of cancer. *Crit Rev Oncol Hemat* **2002**, *42*, 225-248, doi:10.1016/S1040-8428(01)00216-5.
98. Marmol, I.; Virumbrales-Munoz, M.; Quero, J.; Sanchez-De-Diego, C.; Fernandez, 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, doi:10.1016/j.jinorgbio.2017.08.020.
99. Gandin, V.; Fernandes, A.P.; Rigobello, M.P.; Dani, B.; Sorrentino, F.; Tisato, F.; Bjornstedt, M.; Bindoli, A.; Sturaro, A.; Rella, R.; et al. Cancer cell death induced by phosphine gold(I) compounds targeting thioredoxin reductase. *Biochem Pharmacol* **2010**, *79*, 90-101, doi:10.1016/j.bcp.2009.07.023.
100. Laznicek, M.; Laznickova, A. The Effect of Lipophilicity on the Protein-Binding and Blood-Cell Uptake of Some Acidic Drugs. *J Pharmaceut Biomed* **1995**, *13*, 823-828, doi:10.1016/0731-7085(95)01504-E.
101. Zhivkova, Z. Quantitative Structure - Pharmacokinetics Relationships for Plasma Protein Binding of Basic Drugs. *J Pharm Pharm Sci* **2017**, *20*, 349-359, doi:10.18433/J33633.
102. Atrian-Blasco, E.; Gascon, S.; Rodriguez-Yoldi, M.J.; Laguna, M.; Cerrada, E. Synthesis of Gold(I) Derivatives Bearing Alkylated 1,3,5-Triaza-7-phosphadadamantane as Selective Anticancer Metallodrugs. *Eur J Inorg Chem* **2016**, 2791-2803, doi:10.1002/ejic.201600177.
103. Wang, Y.L.; Liu, M.Y.; Cao, R.; Zhang, W.B.; Yin, M.; Xiao, X.H.; Liu, Q.H.; Huang, N. A Soluble Bis-Chelated Gold(I) Diphosphine Compound with Strong Anticancer Activity and Low Toxicity. *J Med Chem* **2013**, *56*, 1455-1466, doi:10.1021/jm3009822.
104. Horvath, U.E.I.; Dobrzanska, L.; Strasser, C.E.; Bouwer, W.; Joone, G.; van Rensburg, C.E.J.; Cronje, S.; Raubenheimer, H.G. Amides of gold(I) diphosphines prepared from N-heterocyclic sources and their in vitro and in vivo screening for anticancer activity. *J Inorg Biochem* **2012**, *111*, 80-90, doi:10.1016/j.jinorgbio.2012.02.026.
105. Tasan, S.; Licon, C.; Doulain, P.E.; Michelin, C.; Gros, C.P.; Le Gendre, P.; Harvey, P.D.; Paul, C.; Gaidon, C.; Bodio, E. Gold-phosphine-porphyrin as potential metal-based theranostics. *J Biol Inorg Chem* **2015**, *20*, 143-154, doi:10.1007/s00775-014-1220-8.
106. Serebryanskaya, T.V.; Lyakhov, A.S.; Ivashkevich, L.S.; Schur, J.; Frias, C.; Prokop, A.; Ott, I. Gold(I) thiotetrazolates as thioredoxin reductase inhibitors and antiproliferative agents. *Dalton T* **2015**, *44*, 1161-1169, doi:10.1039/c4dt03105a.
107. Bagowski, C.P.; You, Y.; Scheffler, H.; Vlecken, D.H.; Schmitza, D.J.; Ott, I. Naphthalimide gold(I) phosphine complexes as anticancer metallodrugs. *Dalton T* **2009**, 10799-10805, doi:10.1039/b912378d.
108. de Almeida, A.M.; de Oliveira, B.A.; de Castro, P.P.; de Mendonca, C.C.; Furtado, R.A.; Nicolella, H.D.; da Silva, V.L.; Diniz, C.G.; Tavares, D.C.; Silva, H.; et al. 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*, 841-857, doi:10.1007/s10534-017-0046-6.
109. Tavares, T.T.; Azevedo, G.C.; Garcia, A.; Carpanez, A.G.; Lewer, P.M.; Paschoal, D.; Muller, B.L.; Dos Santos, H.F.; Matos, R.C.; Silva, H.; et al. Gold(I) complexes with aryl-

- thiosemicarbazones: Molecular modeling, synthesis, cytotoxicity and TrxR inhibition. *Polyhedron* **2017**, *132*, 95-104, doi:10.1016/j.poly.2017.05.004.
110. Quero, J.; Royo, J.C.; Fodor, B.; Gimeno, M.C.; Osada, J.; Rodriguez-Yoldi, M.J.; Cerrada, E. Sulfonamide-Derived Dithiocarbamate Gold(I) Complexes Induce the Apoptosis of Colon Cancer Cells by the Activation of Caspase 3 and Redox Imbalance. *Biomedicines* **2022**, *10*, doi:ARTN 143710.3390/biomedicines10061437.
111. Curran, D.; Dada, O.; Muller-Bunz, H.; Rothemund, M.; Sanchez-Sanz, G.; Schobert, R.; Zhu, X.M.; Tacke, M. Synthesis and Cytotoxicity Studies of Novel NHC*-Gold(I) Complexes Derived from Lepidiline A. *Molecules* **2018**, *23*, doi:ARTN 203110.3390/molecules23082031.
112. Seliman, A.A.A.; Altaf, M.; Odewunmi, N.A.; Kawde, A.N.; Zierkiewicz, W.; Ahmad, S.; Altuwaijri, S.; Isab, A.A. Synthesis, X-ray structure, DFT calculations and anticancer activity of a selenourea coordinated gold(I)-carbene complex. *Polyhedron* **2017**, *137*, 197-206, doi:10.1016/j.poly.2017.08.003.
113. Seliman, A.A.A.; Altaf, M.; Onawole, A.T.; Ahmad, S.; Ahmed, M.Y.; Al-Saadi, A.A.; Altuwaijri, S.; Bhatia, G.; Singh, J.; Isab, A.A. Synthesis, X-ray structures and anticancer activity of gold(I)-carbene complexes with selenones as co-ligands and their molecular docking studies with thioredoxin reductase. *J Organomet Chem* **2017**, *848*, 175-183, doi:10.1016/j.jorganchem.2017.07.034.
114. Cerrada, E.; Fernandez-Moreira, V.; Gimeno, M.C. Gold and platinum alkynyl complexes for biomedical applications. *Adv Organomet Chem* **2019**, *71*, 227-258, doi:10.1016/bs.adomc.2019.01.001.
115. Schuh, E.; Valiahdi, S.M.; Jakupec, M.A.; Keppler, B.K.; Chiba, P.; Mohr, F. Synthesis and biological studies of some gold(I) complexes containing functionalised alkynes. *Dalton T* **2009**, 10841-10845, doi:10.1039/b911234k.
116. Gurba, A.; Taciak, P.; Sacharczuk, M.; Mlynarczuk-Bialy, I.; Bujalska-Zadrozny, M.; Fichna, J. Gold (III) Derivatives in Colon Cancer Treatment. *International Journal of Molecular Sciences* **2022**, *23*, doi:ARTN 724 10.3390/ijms23020724.
117. Messori, L.; Marcon, G.; Cinellu, M.A.; Coronello, M.; Mini, E.; Gabbiani, C.; Orioli, P. Solution chemistry and cytotoxic properties of novel organogold(III) compounds. *Bioorgan Med Chem* **2004**, *12*, 6039-6043, doi:10.1016/j.bmc.2004.09.014.
118. Massai, L.; Cirri, D.; Michelucci, E.; Bartoli, G.; Guerri, A.; Cinellu, M.A.; Cocco, F.; Gabbiani, C.; Messori, L. Organogold(III) compounds as experimental anticancer agents: chemical and biological profiles. *Biometals* **2016**, *29*, 863-872, doi:10.1007/s10534-016-9957-x.
119. Samanta, T.; Munda, R.N.; Roymahapatra, G.; Nandy, A.; Das Saha, K.; Al-Deyab, S.S.; Dinda, J. Silver(I), Gold(I) and Gold(III)-N-Heterocyclic carbene complexes of naphthyl substituted annelated ligand: Synthesis, structure and cytotoxicity. *J Organomet Chem* **2015**, *791*, 183-191, doi:10.1016/j.jorganchem.2015.05.049.
120. Fung, S.K.; Zou, T.T.; Cao, B.; Lee, P.Y.; Fung, Y.M.E.; Hu, D.; Lok, C.N.; Che, C.M. Cyclometalated Gold(III) Complexes Containing N-Heterocyclic Carbene Ligands Engage Multiple Anti-Cancer Molecular Targets. *Angew Chem Int Edit* **2017**, *56*, 3892-3896, doi:10.1002/anie.201612583.
121. Ronconi, L.; Giovagnini, L.; Marzano, C.; Bettio, F.; Graziani, R.; Pilloni, G.; Fregona, D. Gold dithiocarbamate derivatives as potential antineoplastic agents: Design, spectroscopic properties, and in vitro antitumor activity. *Inorganic Chemistry* **2005**, *44*, 1867-1881, doi:10.1021/ic048260v.
122. Radenkovic, S.; Antic, M.; Savic, N.D.; Glisic, B.D. The nature of the Au-N bond in gold(III) complexes with aromatic nitrogen-containing heterocycles: the influence of Au(III) ions on the ligand aromaticity. *New J Chem* **2017**, *41*, 12407-12415, doi:10.1039/c7nj02634j.
123. Tu, S.P.; Sun, R.W.Y.; Lin, M.C.M.; Cui, J.T.; Zou, B.; Gu, Q.; Kung, H.F.; Che, C.M.; Wong, B.C.Y. Gold (III) Porphyrin Complexes Induce Apoptosis and Cell Cycle Arrest and Inhibit

- Tumor Growth in Colon Cancer. *Cancer-Am Cancer Soc* **2009**, *115*, 4459-4469, doi:10.1002/cncr.24514.
124. Tong, K.C.; Lok, C.N.; Wan, P.K.; Hu, D.; Fung, Y.M.E.; Chang, X.Y.; Huang, S.; Jiang, H.B.; Che, C.M. An anticancer gold(III)-activated porphyrin scaffold that covalently modifies protein cysteine thiols. *P Natl Acad Sci USA* **2020**, *117*, 1321-1329, doi:10.1073/pnas.1915202117.
125. Issels, R.; Kampmann, E.; Kanaar, R.; Lindner, L.H. Hallmarks of hyperthermia in driving the future of clinical hyperthermia as targeted therapy: translation into clinical application. *Int J Hyperther* **2016**, *32*, 89-95, doi:10.3109/02656736.2015.1119317.
126. Oei, A.L.; Vriend, L.E.M.; Crezee, J.; Franken, N.A.P.; Krawczyk, P.M. Effects of hyperthermia on DNA repair pathways: one treatment to inhibit them all. *Radiat Oncol* **2015**, *10*, doi:ARTN 165 10.1186/s13014-015-0462-0.
127. Issels, R.D.; Lindner, L.H.; Verweij, J.; Wessalowski, R.; Reichardt, P.; Wust, P.; Ghadjar, P.; Hohenberger, P.; Angele, M.; Salat, C.; et al. Effect of Neoadjuvant Chemotherapy Plus Regional Hyperthermia on Long-term Outcomes Among Patients With Localized High-Risk Soft Tissue Sarcoma The EORTC 62961-ESHO 95 Randomized Clinical Trial. *Jama Oncol* **2018**, *4*, 483-492, doi:10.1001/jamaoncol.2017.4996.
128. Killock, D. SARCOMA Local hyperthermia improves survival. *Nat Rev Clin Oncol* **2018**, *15*, doi:10.1038/nrclinonc.2018.38.
129. Colombo, R. Long-Term Outcomes of a Randomized Controlled Trial Comparing Thermochemotherapy with Mitomycin-C Alone as Adjuvant Treatment for Non-Muscle-Invasive Bladder Cancer (Nmibc) Reply. *Bju Int* **2011**, *107*, 1685-1686, doi:10.1111/j.1464-410X.2011.10310_2.x.
130. Huang, S.K.; Stauffer, P.R.; Hong, K.; Guo, J.W.; Phillips, T.L.; Huang, A.; Papahadjopoulos, D. Liposomes and hyperthermia in mice: increased tumor uptake and therapeutic efficacy of doxorubicin in sterically stabilized liposomes. *Cancer Res* **1994**, *54*, 2186-2191.
131. Clavel, C.M.; Nowak-Sliwinska, P.; Paunescu, E.; Griffioen, A.W.; Dyson, P.J. In vivo evaluation of small-molecule thermoresponsive anticancer drugs potentiated by hyperthermia. *Chem Sci* **2015**, *6*, 2795-2801, doi:10.1039/c5sc00613a.
132. Seynhaeve, A.L.B.; Amin, M.; Haemmerich, D.; van Rhoon, G.C.; ten Hagen, T.L.M. Hyperthermia and smart drug delivery systems for solid tumor therapy. *Adv Drug Deliver Rev* **2020**, *163*, 125-144, doi:10.1016/j.addr.2020.02.004.
133. Renfrew, A.K.; Scopelliti, R.; Dyson, P.J. Use of Perfluorinated Phosphines to Provide Thermomorphic Anticancer Complexes for Heat-Based Tumor Targeting. *Inorganic Chemistry* **2010**, *49*, 2239-2246, doi:10.1021/ic9020433.
134. Clavel, C.M.; Paunescu, E.; Nowak-Sliwinska, P.; Dyson, P.J. Thermoresponsive organometallic arene ruthenium complexes for tumour targeting. *Chem Sci* **2014**, *5*, 1097-1101, doi:10.1039/c3sc53185f.
135. Quero, J.; Ruighi, F.; Osada, J.; Gimeno, M.C.; Cerrada, E.; Rodriguez-Yoldi, M.J. Gold(I) Complexes Bearing Alkylated 1,3,5-Triaza-7-phosphaadamantane Ligands as Thermoresponsive Anticancer Agents in Human Colon Cells. *Biomedicines* **2021**, *9*, doi:10.3390/biomedicines9121848.
136. Petrovska, B.B. Historical review of medicinal plants' usage. *Pharmacognosy Reviews* **2012**, *6*, 1-5.
137. Giannenas, I.; Sidiropoulou, E.; Bonos, E.; Christaki, E.; Florou-Paneri, P. The history of herbs, medicinal and aromatic plants, and their extracts: past, current situation and future perspectives. *Feed Additives: Aromatic Plants and Herbs in Animal Nutrition and Health* **2020**, 1-18, doi:10.1016/B978-0-12-814700-9.00001-7.
138. Salazar-Ramiro, A.; Ramirez-Ortega, D.; de la Cruz, V.P.; Hernandez-Pedro, N.Y.; Gonzalez-Esquivel, D.F.; Sotelo, J.; Pineda, B. Role of Redox Status in Development of Glioblastoma. *Front Immunol* **2016**, *7*, doi:ARTN 156 10.3389/fimmu.2016.00156.

139. Zamora-Ros, R.; Not, C.; Guino, E.; Lujan-Barroso, L.; Garcia, R.M.; Biondo, S.; Salazar, R.; Moreno, V. Association between habitual dietary flavonoid and lignan intake and colorectal cancer in a Spanish case-control study (the Bellvitge Colorectal Cancer Study). *Cancer Cause Control* **2013**, *24*, 549-557, doi:10.1007/s10552-012-9992-z.
140. de Kok, T.M.; van Breda, S.G.; Manson, M.M. Mechanisms of combined action of different chemopreventive dietary compounds. *Eur J Nutr* **2008**, *47*, 51-59, doi:10.1007/s00394-008-2006-y.
141. Choudhari, A.S.; Mandave, P.C.; Deshpande, M.; Ranjekar, P.; Prakash, O. Phytochemicals in Cancer Treatment: From Preclinical Studies to Clinical Practice. *Front Pharmacol* **2020**, *10*, doi:ARTN 1614 10.3389/fphar.2019.01614.
142. 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, doi:10.1016/j.envexpbot.2013.09.012.
143. Cory, H.; Passarelli, S.; Szeto, J.; Tamez, M.; Mattei, J. The Role of Polyphenols in Human Health and Food Systems: A Mini-Review. *Front Nutr* **2018**, *5*, doi:ARTN 87 10.3389/fnut.2018.00087.
144. Quero, J.; Marmol, I.; Cerrada, E.; Rodriguez-Yoldi, M.J. Insight into the potential application of polyphenol-rich dietary intervention in degenerative disease management. *Food Funct* **2020**, *11*, 2805-2825, doi:10.1039/d0fo00216j.
145. Directiva 2008/98/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 19 de noviembre de 2008, sobre los residuos y por la que se derogan determinadas Directivas. <https://www.boe.es/buscar/doc.php?id=DOUE-L-2008-82319>. Available online: (accessed on 5th September 2022).
146. Circular economy: definition, importance and benefits. <https://www.europarl.europa.eu/news/en/headlines/economy/20151201STO05603/circular-economy-definition-importance-and-benefits>. Available online: (accessed on July 11).
147. Quero, J.; Jimenez-Moreno, N.; Esparza, I.; Osada, J.; Cerrada, E.; Ancin-Azpilicueta, C.; Rodriguez-Yoldi, M.J. Grape Stem Extracts with Potential Anticancer and Antioxidant Properties. *Antioxidants-Basel* **2021**, *10*, doi:ARTN 243 10.3390/antiox10020243.
148. Quero, J.; Ballesteros, L.F.; Ferreira-Santos, P.; Velderrain-Rodriguez, G.R.; Rocha, C.M.R.; Pereira, R.N.; Teixeira, J.A.; Martin-Belloso, O.; Osada, J.; Rodriguez-Yoldi, M.J. Unveiling the Antioxidant Therapeutic Functionality of Sustainable Olive Pomace Active Ingredients. *Antioxidants-Basel* **2022**, *11*, doi:ARTN 828 10.3390/antiox11050828.
149. Marmol, I.; Quero, J.; Ibarz, R.; Ferreira-Santos, P.; Teixeira, J.A.; Rocha, C.M.R.; Perez-Fernandez, M.; Garcia-Juiz, S.; Osada, J.; Martin-Belloso, O.; et al. Valorization of agro-food by-products and their potential therapeutic applications. *Food Bioprod Process* **2021**, *128*, 247-258, doi:10.1016/j.fbp.2021.06.003.
150. Gascon, S.; Jimenez-Moreno, N.; Jimenez, S.; Quero, J.; Rodriguez-Yoldi, M.J.; Ancin-Azpilicueta, C. Nutraceutical composition of three pine bark extracts and their antiproliferative effect on Caco-2 cells. *J Funct Foods* **2018**, *48*, 420-429, doi:10.1016/j.jff.2018.07.040.
151. Velderrain-Rodriguez, G.R.; Quero, J.; Osada, J.; Martin-Belloso, O.; Rodriguez-Yoldi, M.J. Phenolic-Rich Extracts from Avocado Fruit Residues as Functional Food Ingredients with Antioxidant and Antiproliferative Properties. *Biomolecules* **2021**, *11*, doi:ARTN 977 10.3390/biom11070977.
152. Maicas, S.; Mateo, J.J. Sustainability of Wine Production. *Sustainability-Basel* **2020**, *12*, doi:ARTN 559 10.3390/su12020559.
153. Nerantzis, E.T.; Tataridis, P. Integrated enology-utilization of winery by-products into high added value products. *e-Journal of Science & Technology* **2006**, *1*.
154. Calabriso, N.; Massaro, M.; Scoditti, E.; Verri, T.; Barca, A.; Gerardi, C.; Giovino, G.; Carluccio, M.A. Grape Pomace Extract Attenuates Inflammatory Response in Intestinal

- Epithelial and Endothelial Cells: Potential Health-Promoting Properties in Bowel Inflammation. *Nutrients* **2022**, *14*, doi:ARTN 1175 10.3390/nu14061175.
155. Manca, M.L.; Casula, E.; Marongiu, F.; Bacchetta, G.; Sarais, G.; Zaru, M.; Escribano-Ferrer, E.; Peris, J.E.; Usach, I.; Fais, S.; et al. From waste to health: sustainable exploitation of grape pomace seed extract to manufacture antioxidant, regenerative and prebiotic nanovesicles within circular economy. *Sci Rep-Uk* **2020**, *10*, doi:ARTN 14184 10.1038/s41598-020-71191-8.
 156. Mendonca, P.; Darwish, A.G.; Tsoleva, V.; El-Sharkawy, I.; Soliman, K.F.A. The Anticancer and Antioxidant Effects of Muscadine Grape Extracts on Racially Different Triple-negative Breast Cancer Cells. *Anticancer Res* **2019**, *39*, 4043-4053, doi:10.21873/anticancer.13560.
 157. Allaoui, A.; Gascon, S.; Benomar, S.; Quero, J.; Osada, J.; Nasri, M.; Rodriguez-Yoldi, M.J.; Boualga, A. Protein Hydrolysates from Fenugreek (*Trigonella foenum graecum*) as Nutraceutical Molecules in Colon Cancer Treatment. *Nutrients* **2019**, *11*, doi:ARTN 724 10.3390/nu11040724.
 158. Carranza-Aguilar, C.J.; Ruiz-Quiñonez, A.K.; González-Espinosa, C.; Cruz-Martin-del-Campo, S.L. Tipos de muerte celular y sus implicaciones clínicas. *El Residente* **2020**, *15*, 97-112.
 159. Coffman, J.A. Cell cycle development. *Dev Cell* **2004**, *6*, 321-327, doi:Doi 10.1016/S1534-5807(04)00067-X.
 160. Barnum, K.J.; O'Connell, M.J. Cell Cycle Regulation by Checkpoints. *Methods Mol Biol* **2014**, *1170*, 29-40, doi:10.1007/978-1-4939-0888-2_2.
 161. Chen, J.D. The Cell-Cycle Arrest and Apoptotic Functions of p53 in Tumor Initiation and Progression. *Csh Perspect Med* **2016**, *6*, doi:ARTN a026104 10.1101/cshperspect.a026104.
 162. Engeland, K. Cell cycle arrest through indirect transcriptional repression by p53: I have a DREAM. *Cell Death Differ* **2018**, *25*, 114-132, doi:10.1038/cdd.2017.172.
 163. Rock, K.L.; Kono, H. The inflammatory response to cell death. *Annu Rev Pathol-Mech* **2008**, *3*, 99-126, doi:10.1146/annurev.pathmechdis.3.121806.151456.
 164. Van Opdenbosch, N.; Lamkanfi, M. Caspases in Cell Death, Inflammation, and Disease. *Immunity* **2019**, *50*, 1352-1364, doi:10.1016/j.immuni.2019.05.020.
 165. Xu, X.B.; Lai, Y.Y.; Hua, Z.C. Apoptosis and apoptotic body: disease message and therapeutic target potentials. *Bioscience Rep* **2019**, *39*, doi:ArtN Bsr20180992 10.1042/Bsr20180992.
 166. Carneiro, B.A.; El-Deiry, W.S. Targeting apoptosis in cancer therapy. *Nat Rev Clin Oncol* **2020**, *17*, 395-417, doi:10.1038/s41571-020-0341-y.
 167. D'Arcy, M.S. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biol Int* **2019**, *43*, 582-592, doi:10.1002/cbin.11137.
 168. Kashyap, D.; Garg, V.K.; Goel, N. Intrinsic and extrinsic pathways of apoptosis: Role in cancer development and prognosis. *Adv Protein Chem Str* **2021**, *125*, 73-120, doi:10.1016/bs.apcsb.2021.01.003.
 169. Elmore, S. Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* **2007**, *35*, 495-516, doi:10.1080/01926230701320337.
 170. Wang, H.; Sun, L.; Su, L.; Rizo, J.; Liu, L.; Wang, L.F.; Wang, F.S.; Wang, X. Mixed lineage kinase domain-like protein MLKL causes necrotic membrane disruption upon phosphorylation by RIP3. *Mol Cell* **2014**, *54*, 133-146, doi:10.1016/j.molcel.2014.03.003.
 171. Shi, J.; Gao, W.; Shao, F. Pyroptosis: Gasdermin-Mediated Programmed Necrotic Cell Death. *Trends Biochem Sci* **2017**, *42*, 245-254, doi:10.1016/j.tibs.2016.10.004.
 172. Fang, Y.; Tian, S.; Pan, Y.; Li, W.; Wang, Q.; Tang, Y.; Yu, T.; Wu, X.; Shi, Y.; Ma, P.; et al. Pyroptosis: A new frontier in cancer. *Biomed Pharmacother* **2020**, *121*, 109595, doi:10.1016/j.biopha.2019.109595.

173. Su, Y.; Zhao, B.; Zhou, L.; Zhang, Z.; Shen, Y.; Lv, H.; AlQudsy, L.H.H.; Shang, P. Ferroptosis, a novel pharmacological mechanism of anti-cancer drugs. *Cancer Lett* **2020**, *483*, 127-136, doi:10.1016/j.canlet.2020.02.015.
174. Li, J.; Cao, F.; Yin, H.L.; Huang, Z.J.; Lin, Z.T.; Mao, N.; Sun, B.; Wang, G. Ferroptosis: past, present and future. *Cell Death Dis* **2020**, *11*, 88, doi:10.1038/s41419-020-2298-2.
175. Onorati, A.V.; Dyczynski, M.; Ojha, R.; Amaravadi, R.K. Targeting autophagy in cancer. *Cancer-Am Cancer Soc* **2018**, *124*, 3307-3318, doi:10.1002/cncr.31335.
176. Mizushima, N.; Komatsu, M. Autophagy: renovation of cells and tissues. *Cell* **2011**, *147*, 728-741, doi:10.1016/j.cell.2011.10.026.
177. Sang, J.; Li, W.; Diao, H.J.; Fan, R.Z.; Huang, J.L.; Gan, L.; Zou, M.F.; Tang, G.H.; Yin, S. Jolkinolide B targets thioredoxin and glutathione systems to induce ROS-mediated paraptosis and apoptosis in bladder cancer cells. *Cancer Lett* **2021**, *509*, 13-25, doi:10.1016/j.canlet.2021.03.030.
178. Gaptulbarova, K.A.; Tsyganov, M.M.; Pevzner, A.M.; Ibragimova, M.K.; Litviakov, N.V. NF- κ B as a potential prognostic marker and a candidate for targeted therapy of cancer. *Exp Oncol* **2020**, *42*, 263-269, doi:10.32471/exp-oncology.2312-8852.vol-42-no-4.15414.
179. Ayati, A.; Moghimi, S.; Salarinejad, S.; Safavi, M.; Pouramiri, B.; Foroumadi, A. A review on progression of epidermal growth factor receptor (EGFR) inhibitors as an efficient approach in cancer targeted therapy. *Bioorg Chem* **2020**, *99*, doi:ARTN 103811 10.1016/j.bioorg.2020.103811.
180. Goradel, N.H.; Najafi, M.; Salehi, E.; Farhood, B.; Mortezaee, K. Cyclooxygenase-2 in cancer: A review. *J Cell Physiol* **2019**, *234*, 5683-5699, doi:10.1002/jcp.27411.
181. Mustacich, D.; Powis, G. Thioredoxin reductase. *Biochem J* **2000**, *346 Pt 1*, 1-8.
182. Jia, J.J.; Geng, W.S.; Wang, Z.Q.; Chen, L.; Zeng, X.S. The role of thioredoxin system in cancer: strategy for cancer therapy. *Cancer Chemoth Pharm* **2019**, *84*, 453-470, doi:10.1007/s00280-019-03869-4.
183. Bian, M.; Fan, R.; Zhao, S.; Liu, W. Targeting the Thioredoxin System as a Strategy for Cancer Therapy. *J Med Chem* **2019**, *62*, 7309-7321, doi:10.1021/acs.jmedchem.8b01595.
184. Moloney, J.N.; Cotter, T.G. ROS signalling in the biology of cancer. *Semin Cell Dev Biol* **2018**, *80*, 50-64, doi:10.1016/j.semcdb.2017.05.023.
185. Narayanan, D.; Ma, S.; Ozcelik, D. Targeting the Redox Landscape in Cancer Therapy. *Cancers (Basel)* **2020**, *12*, doi:10.3390/cancers12071706.
186. Zhang, J.; Li, X.; Han, X.; Liu, R.; Fang, J. Targeting the Thioredoxin System for Cancer Therapy. *Trends Pharmacol Sci* **2017**, *38*, 794-808, doi:10.1016/j.tips.2017.06.001.
187. Nandi, D.; Tahiliani, P.; Kumar, A.; Chandu, D. The ubiquitin-proteasome system. *J Biosciences* **2006**, *31*, 137-155, doi:Doi 10.1007/Bf02705243.
188. 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, doi:10.1146/annurev-biochem-062917-011931.
189. Budenholzer, L.; Cheng, C.L.; Li, Y.J.; Hochstrasser, M. Proteasome Structure and Assembly. *J Mol Biol* **2017**, *429*, 3500-3524, doi:10.1016/j.jmb.2017.05.027.
190. Manasanch, E.E.; Orłowski, R.Z. Proteasome inhibitors in cancer therapy. *Nat Rev Clin Oncol* **2017**, *14*, 417-433, doi:10.1038/nrclinonc.2016.206.
191. Buac, D.; Schmitt, S.; Ventro, G.; Kona, F.R.; Dou, Q.P. Dithiocarbamate-based coordination compounds as potent proteasome inhibitors in human cancer cells. *Mini-Rev Med Chem* **2012**, *12*, 1193-1201, doi:Doi 10.2174/138955712802762040.
192. Adokoh, C.K. Therapeutic potential of dithiocarbamate supported gold compounds. *RSC Adv* **2020**, *10*, 2975-2988, doi:10.1039/c9ra09682e.
193. Nardon, C.; Schmitt, S.M.; Yang, H.; Zuo, J.; Fregona, D.; Dou, Q.P. Gold(III)-dithiocarbamate peptidomimetics in the forefront of the targeted anticancer therapy:

- preclinical studies against human breast neoplasia. *PLoS One* **2014**, *9*, e84248, doi:10.1371/journal.pone.0084248.
194. Lindskog, S. Structure and mechanism of carbonic anhydrase. *Pharmacol Ther* **1997**, *74*, 1-20, doi:10.1016/s0163-7258(96)00198-2.
195. Carta, F.; Supuran, C.T.; Scozzafava, A. Sulfonamides and their isosters as carbonic anhydrase inhibitors. *Future Med Chem* **2014**, *6*, 1149-1165, doi:10.4155/fmc.14.68.
196. Benej, M.; Pastorekova, S.; Pastorek, J. Carbonic anhydrase IX: regulation and role in cancer. *Subcell Biochem* **2014**, *75*, 199-219, doi:10.1007/978-94-007-7359-2_11.
197. Mboge, M.Y.; Mahon, B.P.; McKenna, R.; Frost, S.C. Carbonic Anhydrases: Role in pH Control and Cancer. *Metabolites* **2018**, *8*, doi:10.3390/metabo8010019.

II. OBJETIVOS

Dado los numerosos estudios previos recogidos en la introducción que postulan a los complejos de oro(I) y oro(III) y a los extractos vegetales como potenciales agentes anticancerígenos, los objetivos planteados en esta investigación fueron los siguientes:

1. Estudiar el efecto citotóxico sobre diferentes líneas celulares cancerígenas humanas de diferentes complejos de oro(I) y oro(III), así como de extractos de raspones de la uva ricos en polifenoles, centrándose en la capacidad para inhibir la proliferación celular, principalmente en la línea de cáncer de colon (Caco-2/TC7).
2. Determinar las dianas intracelulares a través de las cuales ejercen su poder citotóxico tanto los complejos de oro como el extracto de raspones.
3. Evaluar la influencia de los distintos ligandos en la capacidad antiproliferativa y en las dianas terapéuticas de los complejos de oro.
4. Determinar las vías de muerte celular inducidas por los complejos de oro y el extracto de raspones.
5. Explorar las posibles diferencias entre lo que supondría la aplicación terapéutica de complejos de oro y los componentes orgánicos de los extractos vegetales.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

III.1. Material biológico

Para llevar a cabo los objetivos planteados en la investigación es crucial el uso de modelos de cáncer sobre las que probar el efecto de los complejos de oro y los extractos vegetales. Aunque los modelos animales presentan ciertas ventajas, la creciente preocupación por el bienestar animal y los diferentes conflictos éticos derivados de éste hacen que el uso de animales en investigación se haya reducido en los últimos años. Por otro lado, los modelos celulares permiten el mantenimiento de células procedentes de diversos tejidos, con las características deseadas para cada estudio, bajo un control absoluto de las condiciones sin interferencias nerviosas y/o hormonales. Por todo ello, y con el objetivo de realizar un primer estudio de cribado para el que no es necesario recurrir a modelos animales, en el desarrollo de esta tesis se ha elegido usar modelos celulares para el estudio de las propiedades biológicas *in vitro* de complejos de oro y extractos vegetales.

III.1.1. Líneas celulares eucariotas

El cultivo celular es el mantenimiento de células en crecimiento en un medioambiente artificial favorable, permitiendo el uso de sistemas modelo para el estudio de la biología de las células, para el cribado y desarrollo de fármacos, o para la producción a gran escala de biofármacos.

III.1.1.1. Línea celular Caco-2/TC7

Las células Caco-2 son células humanas procedentes de cáncer de colon, aisladas por primera vez en 1977 de un varón caucásico de 72 años de edad. Aunque existen diferentes clones de esta línea celular, en la presente tesis se utilizó el clon TC7, obtenido a partir de pasajes tardíos (pasaje 198) de la línea celular parental Caco-2 por lo que presenta mayor estabilidad y homogeneidad [1].

A pesar de ser células cancerosas que sirven como modelo celular para el cáncer de colon, las Caco-2/TC7 poseen la particularidad de que cuando alcanzan la confluencia se diferencian, adquiriendo la morfología y características bioquímicas de enterocitos del intestino delgado. Este cambio morfológico tras la diferenciación se puede comprobar por microscopía óptica como se observa en la figura 1, donde las células pasan de estar aisladas con morfología circular (figura 1A) a juntarse entre sí, pudiendo diferenciar los bordes entre ellas y adquiriendo formas poliédricas más características de los enterocitos (figura 1B). Por lo tanto, esta línea celular puede usarse no solo para el ensayo de fármacos potencialmente anticancerígenos, sino también como modelo de enterocito para el estudio de absorción y mecanismo intestinal, o la formación de las uniones ocluyentes de la barrera intestinal [2,3]. Esta característica se ha aprovechado en el presente trabajo para estudiar la selectividad de los tratamientos ensayados,

ya que permite conocer la citotoxicidad tanto en un modelo celular tumoral como en un modelo celular sano.

Las células Caco-2/TC7 utilizadas durante el desarrollo de la presente tesis fueron cedidas generosamente por la Dra. Edith Brot Laroche (Université Pierre et Marie Curie-Paris 6, UMR S 872, Les Cordeliers, Francia).

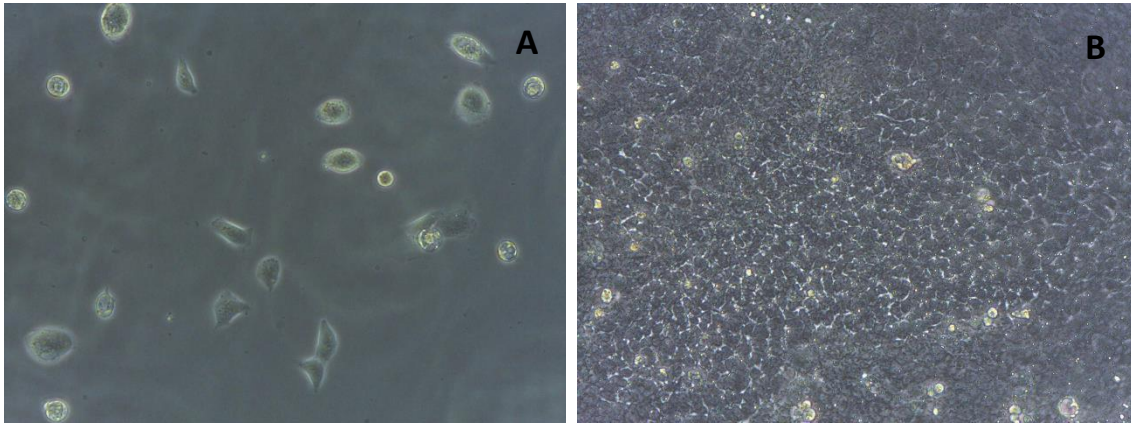


Figura 1. Imagen de microscopía óptica de un cultivo celular de células Caco-2/TC7 indiferenciadas, pasadas 24 horas de la siembra **(A)** y diferenciadas, pasados 10 días tras la siembra **(B)**. Se pueden observar las diferencias morfológicas entre las células cancerígenas y las células diferenciadas con morfología enterocítica.

III.1.1.2. Línea celular MCF-7

Las células MCF-7 se aislaron de la efusión pleural de una paciente de 69 años con un adenocarcinoma de mama y se ha convertido en el modelo celular de cáncer de mama más estudiado en el mundo [4].

Estas células mantienen la morfología y muchas de las características del epitelio mamario. Se caracteriza por ser una de las pocas líneas celulares de cáncer de mama que expresan el receptor de estrógenos alfa (ER- α), lo que permite utilizar este modelo para estudiar el efecto de diferentes fármacos estrogénicos sobre aquellos cánceres de mama que expresen ER- α . Además expresan receptores de andrógenos, progesterona y glucocorticoides [5].

Las células MCF-7 utilizadas durante el desarrollo de la presente tesis fueron cedidas generosamente por la Dra. Cristina Sánchez de Diego (Departamento de Fisiología II, Universidad de Barcelona, España).

III.1.1.3. Línea celular MDA-MB-231

Al igual que las MCF-7, las células MDA-MB-231 provienen de una efusión pleural de una paciente caucásica de 51 años con un adenocarcinoma de mama. Se trata de una línea celular epitelial de cáncer de mama que, al contrario que las MCF-7, carece de receptores de estrógenos y de progesterona. Además, también se caracteriza por no presentar un aumento en la expresión del receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2) [6,7]. Esto permite

usar esta línea celular en contraste con la línea MCF-7 y observar si la presencia de estos receptores puede jugar un papel importante en la eficacia de los tratamientos ensayados.

Las células MDA-MB-231 utilizadas durante el desarrollo de la presente tesis fueron cedidas generosamente por la Dra. Cristina Sánchez de Diego (Departamento de Fisiología II, Universidad de Barcelona, España).

III.1.1.4. Fibroblastos humanos

Los fibroblastos son unas células presentes en el tejido conectivo y cuya principal función es la de secretar colágeno para el mantenimiento estructural de los tejidos y órganos que soporta y conecta. Se trata por lo tanto de un tipo celular distribuido a lo largo de todo el organismo, por lo que se pueden aislar y cultivar fácilmente, sobre todo a partir de la piel [8]. Por lo tanto, en esta tesis se han utilizado dos tipos de fibroblastos epiteliales de bebé y de adulto como modelo de tejido sano para estudiar la selectividad de los tratamientos ensayados.

Los fibroblastos humanos aislados de un paciente de 1 mes utilizados durante el desarrollo de la presente tesis fueron cedidos generosamente por el Dr. Julio Montoya (Departamento de Bioquímica, Universidad de Zaragoza, España).

Los fibroblastos NHDF-Ad (Lonza®) utilizados durante el desarrollo de la presente tesis fueron cedidos generosamente por la Dra. Gracia Mendoza (Centro de Investigación Biomédica de Aragón).

III.1.2. Cultivo celular

La manipulación y trabajo con las células se realizó en una campana de flujo laminar para mantener las condiciones de asepsia y esterilidad en todo momento.

III.1.2.1. Mantenimiento de las células en cultivo

Todas las líneas celulares se mantuvieron en crecimiento en una estufa a 37 °C y atmósfera humidificada del 5% de CO₂. El medio de cultivo para el mantenimiento y crecimiento de todas las líneas celulares era medio DMEM (medio esencial Eagle modificado por Dulbecco) suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 20%, aminoácidos no esenciales al 1%, penicilina/estreptomicina al 1%, anfotericina al 1% y L-glutamina al 2%. El cultivo se lleva a cabo en frascos de plástico para cultivo celular de 25 cm² con tapón roscado de 2 posiciones, añadiendo 5 ml del medio de cultivo previamente detallado.

III.1.2.2. Tripsinización de células adherentes

Una vez las células estaban cercanas a alcanzar la confluencia (aproximadamente cada 7 días), se procede a la separación e individualización de las mismas mediante el método de la tripsinización. Para ello se retira el medio de cultivo y se lavan las células con 5 ml de PBS X1 para posteriormente añadir 2 ml de una disolución de tripsina en agua (50 ml de agua destilada,

5,5 ml de PBS X10, 7,7 ml de tripsina X10 y 7,7 ml de EDTA 10 mM) e incubar durante 10 minutos en la estufa.

Pasado ese tiempo se recoge la tripsina con las células ya despegadas del fondo de la botella y se añade a 10 ml de medio DMEM para su centrifugación a 3.900 rpm durante 5 minutos. Tras dicha centrifugación se retira el sobrenadante y se resuspenden las células del pellet en medio de cultivo para nuevo mantenimiento.

Por último, para conocer la densidad celular se procede al contaje de las células en una cámara de Neubauer. Para ello se mezclan 20 μ l de la disolución celular con 100 μ l de azul Trypan y se procede al contaje de las células vivas (las no teñidas por el azul Trypan) en cada cuadrante de la cámara de Neubauer (0,1 μ l) para determinar el número de células/ml.

III.1.2.3. Siembra de las células

Con el objetivo de mantener en continuo crecimiento la línea celular, tras cada tripsinización se debe subcultivar parte de las células en lo que se conoce como un nuevo pasaje. Para cada subcultivo se siembran 300.000 células en 5 ml de medio de cultivo en un nuevo frasco de 25 cm².

Las células destinadas a ensayos se siembran o bien en placas de 96 pocillos o en frascos de 25 cm² o 75 cm², en función de la confluencia con la que se quiera comenzar el experimento. En el caso de las placas de 96 pocillos se siembran 4.000 células por pocillo en un volumen final de 100 μ l. En el caso de los frascos tanto para los de 75 cm² como para los de 25 cm², se siembran 500.000 células por frasco en un volumen final de 15 ml y 5 ml, respectivamente.

III. 1.2.4. Tratamiento de las células

Pasadas 24 horas, las células pueden ser tratadas, para lo que se utiliza el mismo medio de cultivo DMEM, pero en este caso suplementado exclusivamente con penicilina/estreptomicina al 1% y aminoácidos no esenciales al 1%, para así evitar que el resto de los componentes del medio interactúen con los diferentes tratamientos. En el caso de los fibroblastos, sin embargo, sí que es necesario suplementar el medio de tratamiento con SFB al 20% ya que si no las células no crecen adecuadamente.

En el caso de los complejos de oro se parte de una disolución *stock* o madre de concentración entre 5 y 20 mM en DMSO. A partir de esta disolución *stock* y mediante las correspondientes diluciones, se preparan las disoluciones de tratamiento a la concentración deseada en el medio de cultivo.

Los raspones se pesan y disuelven directamente en el medio de tratamiento a la concentración deseada justo antes de ser utilizados.

Para el tratamiento se retira el medio de cultivo de cada uno de los pocillos de la placa, o del recipiente en el que se han cultivado, y se añade el mismo volumen de la disolución de tratamiento previamente preparada.

III.1.2.5. Inducción de hipertermia

Con el objetivo de estudiar la influencia de la hipertermia en la actividad citotóxica de determinados complejos de oro, las células se someten a un aumento de temperatura. Para ello, inmediatamente después de añadir el medio con el tratamiento (complejos de oro específicos) a las células, estas se incuban en una estufa a 40°C durante una hora. A continuación, se procede con la incubación a 37°C durante el tiempo que se requiera hasta realizar el ensayo pertinente.

III.1.2.6. Congelación de células

Para el mantenimiento de las células fuera de cultivo durante un tiempo prolongado, se procede a la criopreservación. Mediante esta técnica, las células se conservan a temperaturas inferiores a los -80 °C, deteniendo su metabolismo y manteniendo su integridad.

El primer paso es la tripsinización del cultivo celular, tras la cual, el *pellet* celular se resuspende en SFB. Una vez conocida la densidad celular, se añaden alrededor de 1.000.000 de células a un criotubo. Para mantener la integridad física de las células es necesario añadir un criopreservante, en este caso DMSO. Se añade por tanto gota a gota entre un 10% y un 15% de DMSO y se completa hasta 1 ml con SFB. Por último, se transfiere el criotubo a un contenedor con isopropanol y se conservan a -80 °C durante 24 horas. Pasadas las primeras 24 h las células se transfieren a un contenedor de nitrógeno líquido (-196 °C) para ser almacenadas por largos periodos de tiempo.

III.1.2.7. Listado de materiales

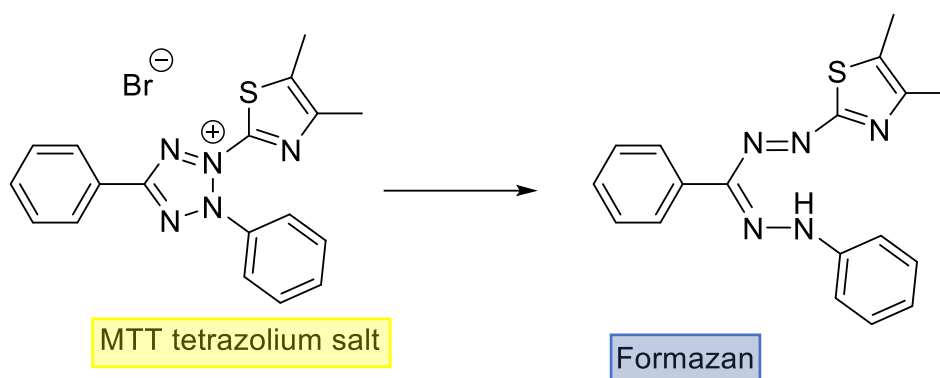
- Gibco™ Medio DMEM GlutaMAX™ suplementado con 4,5g/l D-glucosa, L-glutamina (41965-039, Thermo Fisher Scientific)
- Gibco™ Suero fetal bovino (10270-106, Thermo Fisher Scientific)
- Gibco™ Penicilina (10.000 U/ml) / Estreptomina y (10.000 µg/ml) (15140-122, Thermo Fisher Scientific)
- Gibco™ Anfotericina B, 250 µg/ml (15290-026, Thermo Fisher Scientific)
- Gibco™ L-Glutamina, 200 mM (100X) (25030-024, Thermo Fisher Scientific)
- Gibco™ MEM Aminoácidos no esenciales, 100X (11140-035, Thermo Fisher Scientific)
- Gibco™ Tripsina, 2,5% (10X) (15090-046, Thermo Fisher Scientific)
- Gibco™ Tampón fosfato salino de Dulbecco, DPBS X10 (14200-067, Thermo Fisher Scientific)
- Gibco™ Colorante Azul trypan, 0,4% (15250-061, Thermo Fisher Scientific)
- Dimetilsulfóxido ReagentPlus® (D5879, Sigma-Aldrich®, Merck)
- TC-Placas de 96 pocillos, Cell+, F (Sarstedt)
- TC-Frascos de cultivo celular T-25 y T-75; tapón roscado de 2 posiciones (Sarstedt)
- Pipetas de 2 ml, 5ml, 10 ml y 25 ml (Sarstedt)
- 5100 Cryo 1 °C Freezing Container, Mr. Frosty
- Incubador de CO₂ (MCO-170AICUV-PE, PHCbi)

III.2. Ensayos de citotoxicidad

Con el objetivo de determinar la capacidad que tienen los complejos de oro y los raspones a la hora de comprometer la supervivencia y división de las células, se llevaron a cabo diferentes ensayos que permiten conocer la proliferación de las células a lo largo del tiempo.

III.2.1. Evaluación de la proliferación celular mediante MTT

Este ensayo se basa en la capacidad de la enzima deshidrogenasa mitocondrial para reducir el 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazolio bromuro (MTT) a formazán (ecuación 1), lo que supone un cambio de color amarillo a azul, por lo que esta reacción de reducción se puede seguir por espectrofotometría. De este modo, cuanto mayor sea el número de células viables con la actividad deshidrogenasa mitocondrial intacta, mayor será la cantidad de MTT reducido y la absorbancia a 560 nm correspondiente a formazán.



Ecuación 1. Reducción de MTT a formazán por la enzima deshidrogenasa mitocondrial.

III.2.1.1. Procedimiento

Tras sembrar las células en placas de 96 pocillos y, pasadas 24 horas, tratarlas durante el tiempo deseado, se añaden a cada pocillo 10 μ l de MTT (5mg/ml) y se incuba en estufa a 37 °C entre 2 y 3 horas. Tras este tiempo aparecen en el fondo de los pocillos los cristales de formazán y se retira el medio por inversión. Por último, se añaden 100 μ l de DMSO a cada pocillo para disolver dichos cristales y se procede a medir la absorbancia a 560 nm en un lector de placas de absorbancia.

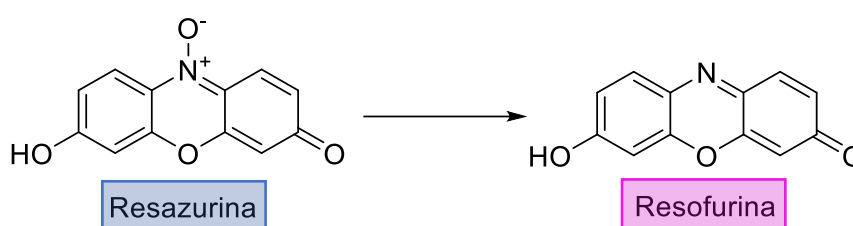
III.2.1.2. Listado de materiales

- Dimetilsulfóxido ReagentPlus® (D5879, Sigma-Aldrich®, Merck)
- Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (M5655, Sigma-Aldrich®, Merck)
- Espectrómetro de placas SPECTROstar Nano (BMG Labtech)

III.2.2. Evaluación de la proliferación celular mediante Resazurina

Para el estudio de la citotoxicidad de los raspones se ha buscado una alternativa al MTT, ya que ensayos previos mostraron interferencias de los extractos de plantas y los fitoestrógenos con este ensayo, arrojando falsos positivos [9].

La resazurina es un compuesto permeable a la membrana celular que, bajo el poder reductor citosólico de las células viables, se transforma en resofurina (ecuación 2). La reducción de la resazurina no solo conlleva un cambio de color (absorbancia), sino que además la resofurina, al contrario que su forma oxidada, es altamente fluorescente. Por lo tanto, midiendo la aparición de resofurina por un método colorimétrico o fluorimétrico, se puede estimar la proliferación de una población celular.



Ecuación 2. Reducción de resazurina a resofurina por oxidoreductasas que se encuentran en la mitocondria de células viables.

III.2.2.1. Procedimiento

En primer lugar, en placas de 96 pocillos, se siembran y tratan las células con el rango de concentraciones deseado durante 48 h y 72 h. Pasado el tiempo de tratamiento, se retira el medio y se añaden 100 µl de la disolución de trabajo de resazurina (1:10, v/v, en DMEM) a cada pocillo. Se incuban las células en la estufa a 37 °C y atmósfera de CO₂ (5%) durante 2 horas. Por último, se mide la fluorescencia en un lector de placa con una longitud de onda de excitación a 544 nm y emisión a 590 nm.

III.2.2.2. Listado de materiales

- Resazurina, sal de sodio (R12204, Sigma-Aldrich®, Merck)
- Lector multimodo de filtros FLUOstar Omega (BMG Labtech)

III.2.3. Determinación del valor IC₅₀

Para comparar los diferentes tratamientos entre sí y evaluar la efectividad de cada uno de ellos se calcula el IC₅₀. Este valor corresponde con la concentración a la cual se ve comprometida la viabilidad del 50% de las células, es decir, la cantidad de complejo (o raspones) a la cual la proliferación es del 50% respecto al 100% del control sin tratamiento.

El valor de absorbancia/fluorescencia obtenido para cada pocillo es proporcional al número de células vivas (viables), por lo que estableciendo el valor de absorbancia del control como referencia (100% de proliferación) se puede conocer el porcentaje de proliferación celular para

cada una de las concentraciones ensayadas. A partir de estos datos se representa una recta con los puntos (concentración/proliferación), tal y como se observa en la figura 2, y se calcula con ella la concentración correspondiente al 50% de proliferación, es decir, el valor IC_{50} .

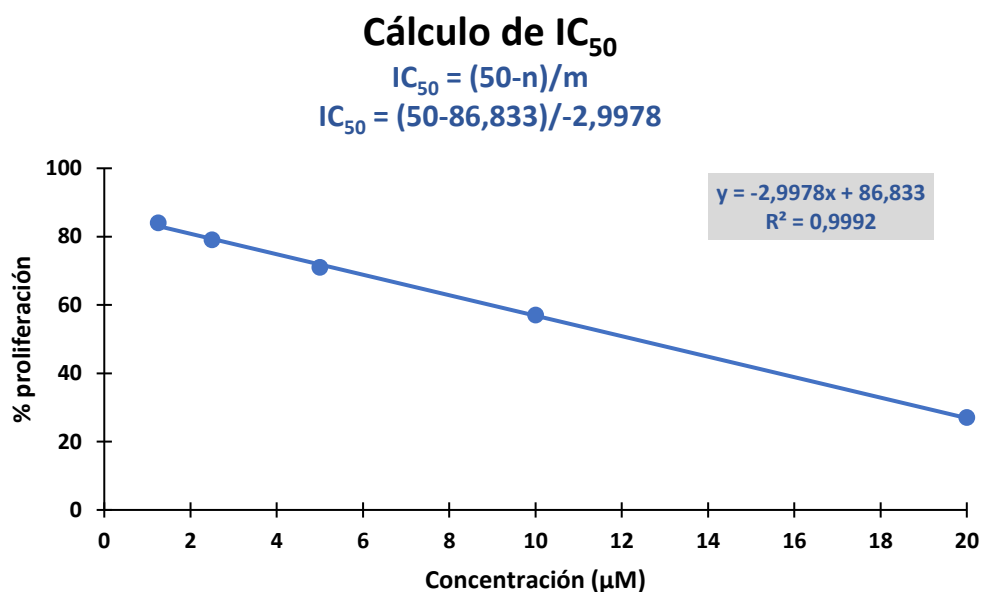


Figura 2. Obtención de la recta (concentración - % proliferación) para el cálculo del valor IC_{50} : se representa en el gráfico la ecuación de la recta donde se sustituye la y por el valor 50 (mitad de la proliferación que el control) para calcular la concentración que equivale a este 50% de proliferación.

III.3. Ensayos de actividad enzimática

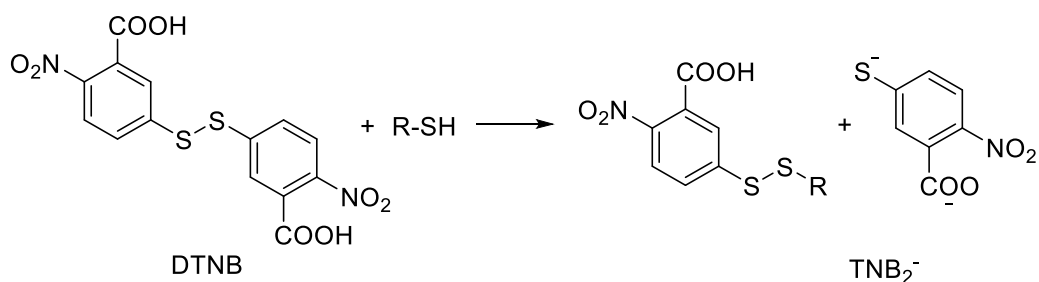
Una de las estrategias para estudiar las dianas intracelulares, a través de las cuales ejercen su acción los complejos de oro y los raspones, es la determinación de su actividad, en caso de que sean enzimas. Si ambos tipos de sustancias interactúan con las enzimas estudiadas, su actividad se verá comprometida, lo cual se puede apreciar mediante la monitorización de las reacciones catalizadas por dichas proteínas.

III.3.1. Actividad TrxR

Para la enzima tioredoxina reductasa (TrxR) se ha estudiado la interacción directa entre los complejos de oro y la proteína recombinante purificada. Sin embargo, en algunos casos también se ha estudiado si los complejos son capaces de comprometer la actividad TrxR en las células con el resto de los componentes celulares presentes.

Para monitorizar la actividad de esta enzima se utiliza el 5,5'-Ditiobis-(ácido 2-nitrobenzoico) (DTNB), un reactivo capaz de interactuar con aniones tiolato (RS^-), como los de la TrxR, para reducirse a 2-nitro-5-tiobenzoato (TNB^{2-}) (ecuación 3). El TNB^{2-} tiene un alto coeficiente de absorción molar, por lo que se puede medir la absorbancia entre 405 nm y 412 nm y así conocer

la cantidad de DTNB que se está reduciendo y, por tanto, la actividad reductasa (relativa a los grupos tioles de las proteínas presentes).



Ecuación 3. Reacción de DTNB con un grupo tiol (R-SH, R = proteína) para formar el anión TNB²⁻.

III.3.1.1. Actividad de la TrxR recombinante *in vitro*

En una placa de 96 pocillos se incuban, por duplicado, los complejos de oro a la concentración deseada con la TrxR1 recombinante humana en un tampón de trabajo (PBS y EDTA) a pH fisiológico. Pasado el tiempo de incubación (5-45 minutos) se añade el tampón de trabajo con NADPH (250 μM) y se da comienzo a la reacción añadiendo DTNB (20mM en etanol puro o 100 mM en DMSO). Inmediatamente después se procede a monitorizar la reacción midiendo la absorbancia a 405 nm cada 10 o 30 segundos durante un mínimo de 6 minutos y un máximo de 22 minutos con un lector de placas de absorbancia.

Los resultados se expresan como porcentaje de la actividad TrxR con respecto al control (la TrxR sin ningún tipo de inhibidor potencial).

III.3.1.2. Actividad reductasa de la célula

Para conocer la actividad TrxR en células es necesario obtener un lisado celular con la TrxR accesible para interactuar con el DTNB y así poder monitorizar la actividad total. Por lo tanto, tras sembrar las células en placas de 96 pocillos y tratarlas durante el tiempo deseado, se procede a retirar el medio y añadir 25 μl del tampón de lisis (50mM Tris-HCl pH 7,5; 150 mM NaCl; 2mM EDTA; 1% tritón X-100; 1% SDS; inhibidor de proteasas) e incubar a temperatura ambiente durante 30 minutos.

Dado que el DTNB no es un sustrato específico de la TrxR, sino que puede reducirse con la actividad de otras oxidoreductasas dependientes de NADPH, para determinar específicamente la actividad TrxR en un lisado celular es necesario usar un inhibidor específico de esta enzima (auranofin). De este modo se puede restar la absorbancia correspondiente a la actividad inespecífica (la de los pocillos con inhibidor de TrxR) a la absorbancia total (pocillos sin inhibidor de TrxR), consiguiendo así la absorbancia correspondiente al TNB²⁻ obtenido a partir de la TrxR. Por lo tanto, tras la obtención de los lisados celulares, se añaden a cada pocillo 25 μl de auranofin (inhibidor de la TrxR) o PBS, según corresponda, y se incuba 20 minutos a 37 °C.

A partir de este momento, se procede igual que el caso de la TrxR recombinante, añadiendo 25 μl del tampón de trabajo con NADPH (2mM) y 25 μl de DTNB (20mM en etanol puro) para

comenzar la reacción. Se monitoriza la reducción de DTNB midiendo la absorbancia a 405 nm durante 6 minutos.

Para normalizar la actividad TrxR según la cantidad de proteína se lleva a cabo un ensayo de Bradford (apartado III.3.4.) para cada condición ensayada. Los resultados se expresan como porcentaje de actividad TrxR respecto al control (células sin tratar).

III.3.1.3. Listado de materiales

- Enzima TrxR1 recombinante humana (SRP6081, Sigma-Aldrich®, Merck)
- Kit de ensayo de actividad de tiorredoxina reductasa (CS0170, Sigma-Aldrich®, Merck)
- NADPH, sal tetrasódica (481973, Millipore®, Merck)
- 5,5'-Ditiobis-(ácido 2-nitrobenzoico) (D8130, Sigma-Aldrich®, Merck)
- Auranofin (A6733, Sigma-Aldrich®, Merck)
- Espectrómetro de placas SPECTROstar Nano (BMG Labtech)

III.3.2. Actividad quimotripsina del proteasoma

El ensayo se basa en el N-Suc-LLVY-AMC, un sustrato de la subunidad $\beta 5$ del proteasoma que presenta una sonda AMC (7-amino-4-metilcumarinil) de manera que, tras su proteólisis, se libera este grupo AMC pudiendo medir su fluorescencia. Por lo tanto, se puede considerar que la fluorescencia emitida es proporcional a la cantidad de sustrato hidrolizado y, por tanto, a la actividad del proteasoma.

III.3.2.1. Procedimiento

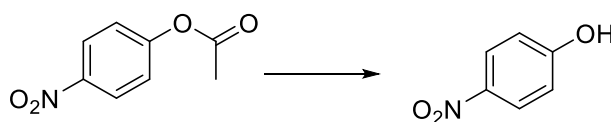
En primer lugar, se siembran las células en frascos T—25 y se tratan durante el tiempo deseado. Posteriormente se procede a la tripsinización y lisado de las células con un tampón de lisis con detergente. En una placa de 96 pocillos, se añade, por duplicado, la cantidad de lisado correspondiente a 10 μg de proteína en cada pocillo, para lo que previamente se realiza un ensayo de Bradford para cada una de las condiciones. Posteriormente, se añade el sustrato III del proteasoma (20 μM) y se completa con un tampón fisiológico (Tris-HCl o PBS) hasta 100 μl para incubar en oscuridad durante 30 minutos. Pasado este tiempo, se realiza una medida puntual de la fluorescencia con parámetros de excitación y emisión a 365 nm y 460 nm, respectivamente. Los resultados se expresan en porcentaje de actividad tipo quimotripsina respecto al control (células sin tratamiento).

III.3.2.2. Listado de materiales

- Sustrato III del proteasoma, N-Suc-LLVY-AMC (S6510, Sigma-Aldrich®, Merck)
- Kit de ensayo de actividad del proteasoma 20S (MAK172, Sigma-Aldrich®, Merck)
- Lector multimodo de filtros FLUOstar Omega (BMG Labtech)

III.3.3. Actividad Anhidrasa Carbónica

El ensayo para determinar la actividad de la anhidrasa carbónica se basa en la transformación del sustrato 4-paranitrofenilacetato (4-NPA) a nitrofenol (ecuación 4) por la actividad esterasa de la anhidrasa carbónica. El nitrofenol presenta absorbancia a 405 nm y, con ayuda de un espectrofotómetro, se puede seguir esta reacción y así determinar la actividad de la AC.



Ecuación 4. Reducción de 4-NPA a nitrofenol por la actividad esterasa de la anhidrasa carbónica.

III.3.3.1. Procedimiento

En una placa de 96 pocillos se incuban 4 μ l de los compuestos a la concentración deseada con 4 μ l de la isoforma AC IX de la enzima anhidrasa carbónica (50 μ g/ml). Se completa el volumen con PBS hasta los 90 μ l y se incuban a temperatura ambiente durante 5 minutos. Por último, se añaden 10 μ l de 4-NPA (0,5 mM en metanol) para dar comienzo a la reacción y se inicia la monitorización de la reacción inmediatamente, midiendo la absorbancia a 405 nm cada 30 s durante 1 hora.

Como estándar de referencia se utiliza el indisulam (figura 3), un inhibidor de las isoformas IX y XII de la AC.

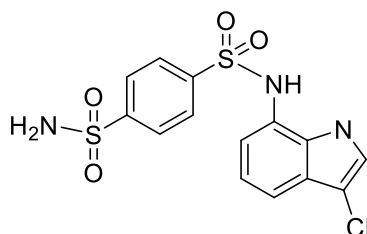


Figura 3. Indisulam (N-(3-cloro-1H-indol-7-il)benzeno-1,4-disulfonamida).

III.3.3.2. Listado de materiales

- Anhidrasa Carbónica IX humana recombinante (SRP6483, Sigma-Aldrich®, Merck)
- 4-nitrofenilacetato (N8130, Sigma-Aldrich®, Merck)
- Indisulam (SML1225, Sigma-Aldrich®, Merck)
- Espectrómetro de placas SPECTROstar Nano (BMG Labtech)

III.3.4. Ensayo de Bradford

El método de Bradford es un ensayo colorimétrico que permite conocer la concentración proteica de una muestra gracias a un reactivo (colorante Coomassie Brilliant Blue G-250) que cambia de color al unirse a determinados residuos de las proteínas, principalmente de aminoácidos básicos.

III.3.4.1. Procedimiento

En una placa de 96 pocillos se añaden 2 μl de la muestra o 2 μl de agua destilada (blanco) y 100 μl del reactivo de Bradford (1 parte de reactivo de Bradford y 8 partes de dH_2O) a cada pocillo. Se incuba la mezcla durante 5 minutos a temperatura ambiente y se procede a medir la absorbancia a 595 nm en un lector de placas.

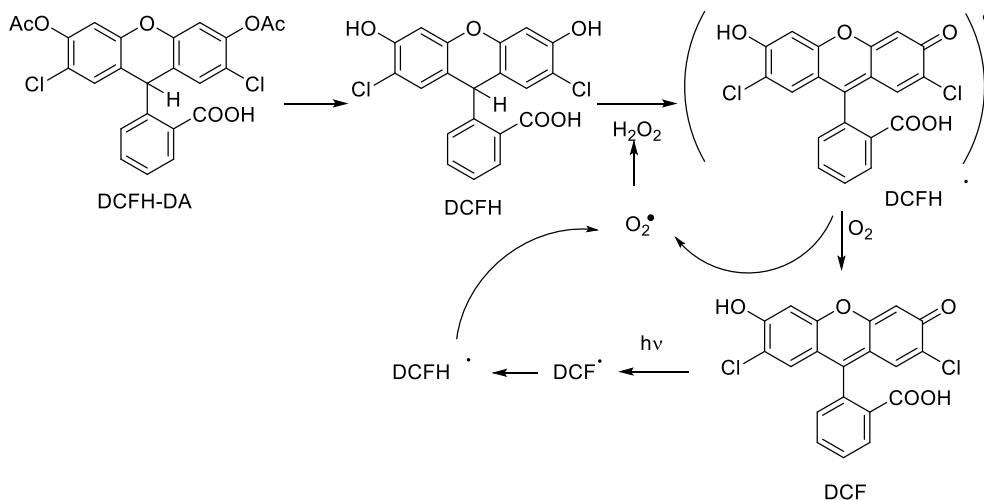
Para conocer la concentración a la que corresponde el valor de absorbancia obtenido es necesario realizar una recta patrón de BSA. Para ello se realiza el procedimiento anterior para 10 diluciones de BSA de concentración conocida y se representa un gráfico con los valores ($[\text{mg/ml}]/\text{Abs}$).

III.3.4.2. Listado de materiales

- Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate (500-0006, Bio-Rad)
- Albúmina sérica bovina (A8806, Sigma-Aldrich®, Merck)
- Espectrómetro de placas SPECTROstar Nano (BMG Labtech)

III.4. Ensayos de determinación de los niveles de ROS intracelulares

Para conocer el estrés oxidativo que los tratamientos causan en las células, se utiliza un ensayo que permite conocer los niveles intracelulares de H_2O_2 , como representación de los niveles de ROS (especies reactivas de oxígeno) intracelulares y, por lo tanto, del estado oxidativo de las células. La base de este ensayo es que 2',7'-diclorodihidrofluoresceína 3',6'-diacetato (DCFH-DA) es capaz de penetrar la membrana celular para hidrolizarse en su interior, dando lugar a DCFH que, en presencia de H_2O_2 , se oxida a 7,5-diclorodihidrofluoresceína (DCF) (Esquema 1), un producto fluorescente. Por lo tanto, monitorizando la aparición de DCF mediante una técnica fluorimétrica, se puede estimar indirectamente los niveles intracelulares de H_2O_2 .



Esquema 1. Mecanismo intracelular y ciclo redox que experimenta DCFH-DA.

III.4.1. Estudio del efecto sobre la producción de ROS

Tras sembrar las células en una placa de 96 pocillos y tratarlas con los complejos de oro o los extractos vegetales, durante el tiempo deseado (1-24 h), se retira el medio de cultivo con tratamiento y se lava con PBS. Se añaden a cada pocillo 100 µl de DCFH-DA (20 µM en DMEM o PBS) y se incuban en oscuridad durante 20 minutos a 37 °C. Pasado este tiempo se monitoriza la fluorescencia con parámetros de emisión y excitación de 520 nm y 485 nm, respectivamente, durante 1 hora en un lector de placas a 37 °C. Los resultados se expresan como porcentaje de niveles de ROS respecto al control (células sin tratamiento).

III.4.2. Estudio del efecto protector frente a un estrés oxidativo

Para conocer si los raspones, debido a la capacidad antioxidante de los polifenoles, son capaces de prevenir frente a un estrés oxidativo externo, se induce un estrés añadiendo H₂O₂ a las células pretratadas con los potenciales fármacos.

Se procede igual que en el caso anterior y, tras el tratamiento durante el tiempo deseado, se retira el medio y se añade a cada pocillo 100 µl de H₂O₂ (80 mM en DMEM) durante 20 minutos. Tras retirar el H₂O₂ pasados los 20 minutos se lava con PBS y se añaden 100 µl de DCFH-DA para continuar a partir de este punto de igual modo que en el apartado III.4.1.

III.4.3. Listado de materiales

- 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato (D6883, Sigma-Aldrich®, Merck)
- Peróxido de hidrógeno, 30% (w/w) en H₂O (H1009, Sigma-Aldrich®, Merck)
- Lector multimodo de filtros FLUOstar Omega (BMG Labtech)

III.5. Ensayos de citometría de flujo

La citometría de flujo permite, mediante la utilización de un haz láser sobre un flujo de células, medir y analizar parámetros celulares de forma individual (célula a célula). Si se tienen células marcadas con algún tipo de fluorescencia (por ejemplo, con anticuerpos fluorescentes o con sondas permeables a determinadas membranas) esta se puede detectar, analizando e identificando diversas poblaciones en la suspensión celular de manera automática y multiparamétrica.

III.5.1. Medida de la apoptosis

Para estudiar el tipo de muerte celular inducida por los tratamientos, se recurre a una tinción doble con Anexina V conjugada al fluorocromo FITC (Anexina V-FITC) y yoduro de propidio (PI).

La Anexina V es capaz de unirse a la fosfatidilserina (PS), un fosfolípido de la monocapa lipídica interior que se transloca a la cara externa cuando la célula se encuentra en estado de apoptosis.

Esto permite conocer las células apoptóticas, que emitirán la fluorescencia del FITC conjugado a la Anexina V que se encuentra unida a la PS.

Por otro lado, el PI, que presenta fluorescencia intrínseca, es capaz de atravesar aquellas membranas cuya integridad se haya visto comprometida, llegando al núcleo de estas células donde interacciona con el DNA. Así, se va a obtener una segunda señal de fluorescencia correspondiente a este PI de las células cuya membrana está dañada, es decir, células que se encuentran en etapas avanzadas de apoptosis, o en proceso de necrosis u otras muertes celulares que cursen con ruptura de membrana.

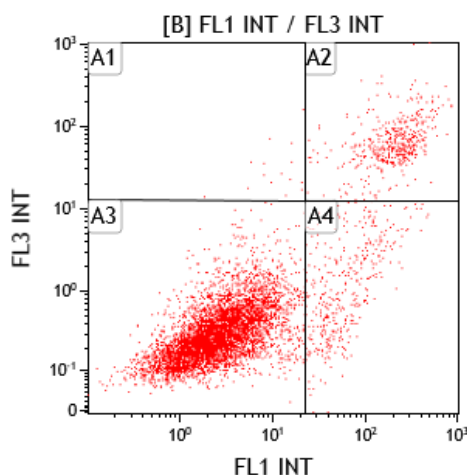


Figura 4. Histograma bivariado en el que se analizan dos parámetros: la fluorescencia relativa a la Anexina V-FITC en el eje de abscisas y la fluorescencia del PI en el eje de ordenadas. Cada uno de los puntos del histograma corresponde a un evento (célula). De este modo se puede conocer el número de células con tinción doble, sólo Anexina V/PI o sin tinción y, por lo tanto, el porcentaje de células apoptóticas, necróticas y vivas.

III.5.1.1. Procedimiento

Tras sembrar las células en botellas T-25 o T-75 y tratarlas durante el tiempo deseado, las células se recogen y se transfieren a un tubo de citometría donde se lavan 2 veces con PBS. A continuación, se resuspenden las células en 100 μ l de buffer de unión a Anexina V (10 mM HEPES/NaOH pH 7,4, 140 mM NaCl, 2,5 mM CaCl₂) y se añaden la Anexina V-FITC (5 μ l) y el PI (5 μ l) dejando incubar la suspensión celular en oscuridad y a temperatura ambiente durante 15 minutos. Por último, se añaden 400 μ l del buffer de unión a Anexina V y se procede a la medida por citometría de flujo durante 1 hora. Los datos se analizan con el BD FACSDiva™ software.

III.5.1.2. Listado de materiales

- Anexina V-FITC apoptosis detection kit (ANXVKF7-100T, Immunostep)
- Ioduro de propidio
- Citómetro de flujo BD FACSAria™ (BD Biosciences) en los capítulos IV.1. y IV.2.
- Citómetro de flujo Beckman Coulter Gallios en los capítulos IV.3. y IV.4.

III.5.2. Tinción con Ioduro de propidio para analizar el ciclo celular

Dado que el PI se une al DNA, la fluorescencia emitida por cada célula es proporcional a la cantidad de DNA que posee y, por lo tanto, se puede estimar en qué fase del ciclo se encuentra. Aquellas células con una fluorescencia X se encontrarán en fase G_0-G_1 , mientras que las que tienen el doble de fluorescencia ($2X$) ya habrán duplicado su material genético, por lo que se encuentran en fase G_2-M . Todas aquellas que se encuentren con valores de fluorescencia intermedio son las células que están replicando su DNA, es decir, en fase S.

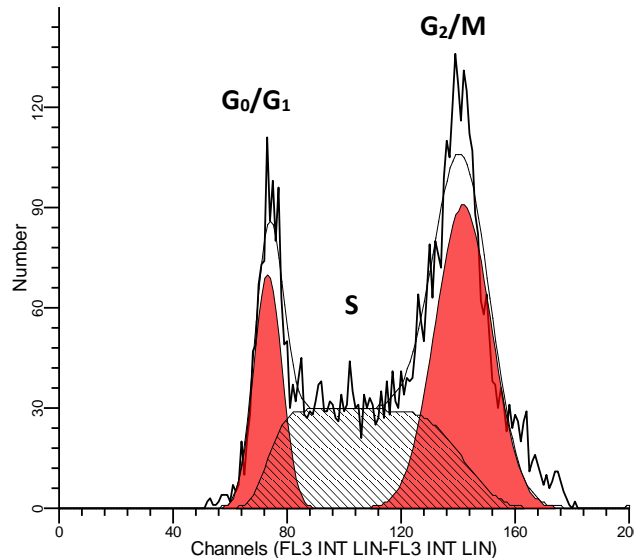


Figura 5. Histograma en el que se representa el parámetro relativo a la fluorescencia del PI en el eje de abscisas y el número de células en el eje de ordenadas, permitiendo identificar 3 poblaciones celulares en función de su contenido en DNA.

III.5.2.1. Procedimiento

Tras sembrar las células en botellas T-25 o T-75 y tratarlas durante el tiempo deseado las células se recogen y se fijan con etanol 70% frío. Tras almacenarlas a 4 °C durante 24 horas se centrifugan y se rehidratan con PBS. Por último, se tiñen con PI (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ con RNasa 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y se analiza la fluorescencia de las células por citometría de flujo. La distribución de las células en cada una de las fases del ciclo celular se realiza con el software de verificación ModFit LT™ 3.0.

III.5.2.2. Listado de materiales

- Ioduro de propidio
- Citómetro de flujo BD FACSAarray™ (BD Biosciences) equipado con un láser de iones de argón en capítulo el capítulo IV.1.
- Citómetro de flujo Beckman Coulter Gallios equipado con un láser de diodo de estado sólido azul (488 nm) y un láser de diodo de estado sólido rojo (635 nm) en los capítulos IV.2. y IV.3.

III.5.3. Determinación de proteínas intracelulares (Cas3, p53)

Para determinar la presencia de proteínas intracelulares se utilizan anticuerpos específicos de las mismas con un fluorocromo conjugado. De este modo se puede analizar la fluorescencia emitida que corresponde a la cantidad de esa proteína en la célula. En este caso se utilizan anticuerpos anti-Caspasa 3 activa y anti-p53.

III.5.3.1. Procedimiento

Tras sembrar las células en botellas T-25 o T-75 y tratarlas durante el tiempo estipulado se recogen para ser fijadas con formaldehído (0,01%) durante 15 minutos. A continuación, se centrifugan 5 minutos a 300 *g* y se incuban en oscuridad, durante otros 15 minutos, con 100 μ l de una disolución de digitonina (0,5% en PBS). Después se lavan 2 veces con una nueva disolución de digitonina (0,1% en PBS) y se vuelven a centrifugar 5 minutos a 300 *g*. Tras la centrifugación se resuspende el *pellet* en 50 μ l de la disolución de digitonina (0,1%) y se añaden 5 μ l del anticuerpo correspondiente. Tras incubar la mezcla durante 1 hora a temperatura ambiente, se centrifuga 5 minutos a 500 *g* y se lavan las células con PBS 2 veces. Por último, se resuspenden las células en 400 μ l de PBS y se analiza la fluorescencia por citometría de flujo. Para el análisis de caspasa 3 se fijaron longitudes de onda de excitación de 488 nm y de emisión de 525 nm, mientras que para la determinación de p53 se fijaron los parámetros en 635 nm para la excitación y 660 nm para la emisión.

III.5.3.2. Listado de materiales

- Anti-caspase 3 (Clone C92-605, BD Pharmigen); Ex: 494 nm y Em: 520 nm.
- Anti-p53 (Clone REA609, Miltenyi)
- Citómetro de flujo BD FACSAarray™ (BD Biosciences) equipado con un láser de iones de argón en el capítulo IV.1.
- Citómetro de flujo Beckman Coulter Gallios equipado con un láser de diodo de estado sólido azul (488 nm) y un láser de diodo de estado sólido rojo (635 nm) en los capítulos IV.2 y IV.3.

III.5.4. Análisis de la liberación del citocromo c

Para determinar la liberación del citocromo c (Cyt c) de la mitocondria al citoplasma se lleva a cabo una doble permeabilización. En la primera de ellas se utiliza la digitonina para permeabilizar la membrana plasmática celular, permitiendo la pérdida del Cyt c que había sido liberado. En la segunda de las permeabilizaciones se desestabiliza la membrana mitocondrial con saponina, liberando lo que restaba de citocromo c al citoplasma. Este Cyt c se identifica por citometría de flujo gracias al uso de un anticuerpo anti-Citocromo c, por lo que si el tratamiento induce la liberación del Cyt c los niveles de fluorescencia detectados disminuirán respecto a las células con el Cyt c intacto.

III.5.4.1. Procedimiento

Tras recoger las células previamente tratadas durante el tiempo deseado, se procede a la primera permeabilización, para lo que se resuspenden las células en 100 μ l de buffer de permeabilización frío (100 mM KCl, 50 μ g/ml digitonina en PBS) y se incuban durante 5 minutos en hielo. A continuación, se fijan las células con 100 μ l de paraformaldehído (4% en PBS) durante 20 minutos. Transcurrido este tiempo se lava con 200 μ l de PBS tres veces y se resuspenden las células en 200 μ l del segundo buffer de permeabilización (saponina 0,05% y BSA 3% en PBS). Tras incubar durante 15 minutos, se añaden 2 μ l de anticuerpo anti-citocromo c y se incuban durante otros 60 minutos. Por último, se centrifugan las células a 500 g durante 5 minutos y se lavan con PBS 2 veces para acabar resuspendiendo las células en 400 μ l de PBS y analizando la fluorescencia por citometría de flujo. Las longitudes de onda de excitación y emisión se fijaron en 488 nm y 575 nm, respectivamente.

III.5.4.2. Listado de materiales

- Anti-Citocromo c (1H8-2C12, Novus)
- Citómetro de flujo BD FACSAarray™ (BD Biosciences) equipado con un láser de iones de argón

III.5.5. Medida del potencial de membrana mitocondrial (Ψ)

El método para determinar si una célula presenta despolarización mitocondrial se basa en ioduro de 1,1',3,3,3'-hexametilindodicarbo-cianina (DiIc1(5)), una sonda catiónica capaz de acumularse en las mitocondrias con el potencial de membrana intacto. Cuando el Ψ_m está alterado la sonda se libera, por lo que la fluorescencia disminuye en las células con despolarización mitocondrial, lo que se puede detectar por citometría de flujo.

III.5.5.1. Procedimiento

Tras tratar las células, sembradas en frascos T-25, a la concentración y tiempo deseados, se recogen y se lavan 2 veces con PBS. A continuación, las células se resuspenden en PBS (10⁶ células/ml) y se añaden 5 μ l de DiIc1(5) (10 μ M). Tras incubar 15 minutos en una estufa a 37 °C con atmósfera de CO₂ (5%), se añaden 400 μ l de PBS y se analiza la fluorescencia por citometría de flujo con longitudes de onda de 635 nm (excitación) y 658 nm (emisión).

III.5.5.2. Listado de materiales

- MitoStep™ DiIc1(5) (MITO-100T, ImmunoStep)
- Citómetro de flujo BD FACSAarray™ (BD Biosciences) equipado con un láser de iones de argón en los capítulos IV.1. y IV.4.
- Citómetro de flujo Beckman Coulter Gallios equipado con un láser de diodo de estado sólido azul (488 nm) y un láser de diodo de estado sólido rojo (635 nm) en los capítulos IV.2. y IV.3.

REFERENCIAS:

1. Caro, I.; Boulenc, X.; Rousset, M.; Meunier, V.; Bourrié, M.; Julian, B.; Joyeux, H.; Roques, C.; Berger, Y.; Zweibaum, A.; et al. Characterisation of a newly isolated Caco-2 clone (TC-7), as a model of transport processes and biotransformation of drugs. *International Journal of Pharmaceutics* **1995**, *116*, 147-158.
2. Natoli, M.; Leoni, B.D.; D'Agnano, I.; D'Onofrio, M.; Brandi, R.; Arisi, I.; Zucco, F.; Felsani, A. Cell growing density affects the structural and functional properties of Caco-2 differentiated monolayer. *J Cell Physiol* **2011**, *226*, 1531-1543, doi:10.1002/jcp.22487.
3. Sambuy, Y.; De Angelis, I.; Ranaldi, G.; Scarino, M.L.; Stamatii, A.; Zucco, F. The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics. *Cell Biol Toxicol* **2005**, *21*, 1-26, doi:10.1007/s10565-005-0085-6.
4. Soule, H.D.; Vazquez, J.; Long, A.; Albert, S.; Brennan, M. A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst* **1973**, *51*, 1409-1416, doi:10.1093/jnci/51.5.1409.
5. Horwitz, K.B.; Costlow, M.E.; McGuire, W.L. MCF-7; a human breast cancer cell line with estrogen, androgen, progesterone, and glucocorticoid receptors. *Steroids* **1975**, *26*, 785-795, doi:10.1016/0039-128x(75)90110-5.
6. Cailleau, R.; Olive, M.; Cruciger, Q.V. Long-term human breast carcinoma cell lines of metastatic origin: preliminary characterization. *In Vitro* **1978**, *14*, 911-915, doi:10.1007/BF02616120.
7. Chavez, K.J.; Garimella, S.V.; Lipkowitz, S. Triple negative breast cancer cell lines: one tool in the search for better treatment of triple negative breast cancer. *Breast Dis* **2010**, *32*, 35-48, doi:10.3233/BD-2010-0307.
8. <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Fibroblasto#:~:text=Un%20fibroblasto%20es%20un%20tipo,marco%20estructural%20de%20los%20tejidos>. Available online: (accessed on December 23, 2022).
9. 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* **2002**, *68*, 445-448, doi:10.1055/s-2002-32073.

IV. RESULTADOS

IV.1. Proteasome vs thioredoxin reductase competition as possible biological targets in antitumor mixed thiolate-dithiocarbamate gold(III) complexes

Abstract: New mixed gold(III) derivatives with dithiocarbamate and thiolate ligands have been synthesized and characterized. They display high anticancer activity against colon cancer cell lines without affecting to differentiated enterocytes, high stability in phosphate buffered saline solution and resistance to gold reduction in presence of reducing agents in the majority of the derivatives. Some of them show interaction with thioredoxin reductase as derived from *in vitro* analysis and computational studies. However, a competition between this enzyme and proteasome is detected in cells, which is corroborated by the determination of proteasomal chymotrypsin-like activity inhibition. In addition, some of these dithiocarbamate gold(III) derivatives reduce the cell viability and proliferation by intrinsic apoptotic pathway, with changes in mitochondrial membrane potential, cytochrome c release and caspase 3 activation. Consequently, our results show new complexes with proteasome as possible target in colorectal cancer.

Keywords: colon cancer, dithiocarbamate, thiolate, gold(III), proteasome, thioredoxin reductase, Caco-2 cells

IV.1.1. Introduction

Most of the conventional chemotherapeutic drugs are organic compounds; however, metal-containing derivatives offer many advantages over them, which make coordination compounds attractive as well for the development of new medicinal derivatives [1,2]. Gold in addition of other metals such as ruthenium is one of the most investigated as a possible alternative to platinum-based drugs, with the aim to reduce the drawbacks induced by conventional anticancer therapy. Previous studies have revealed that the co-administration of sodium dithiocarbamate with *cisplatin* have provided protection against renal, gastrointestinal and bone marrow toxicity, without decreasing its antitumor activity [3]. However the benefits of dithiocarbamate ligands are limited, because they have been related to potential hazards associated when are not coordinated [4]. With these considerations many dithiocarbamate metallic complexes have been described able to combine the cytotoxic activity of the metal with the chemoprotective character of these ligands [5-15]. The ability of these molecules to act as bidentate ligands affords high stability to the resulting metallic derivatives due to the so-called *chelate effect*, preventing from decomposition through loss of the dithiocarbamate ligand. Furthermore, gold(III) is isoelectronic

to platinum(II) and both form four-coordinate square planar complexes, giving rise to the possibility of developing analogues to *cisplatin*. Considering the ability of dithiocarbamates to act as chelating ligands, many examples of gold(III) dithiocarbamate derivatives have been reported more active than *cisplatin* [10,14,16-18] and able to overcome both intrinsic and acquired resistance [18].

Unlike platinum based derivatives, gold compounds interact with different cellular proteins [19] instead of having DNA as their main target, which confers them an important advantage in order to overcome the limitations presented by platinum drugs. Gold coordination compounds have previously been described as potent thioredoxin reductase (TrxR) inhibitors [19,20], since the gold atom can interact with the selenium atom of the selenocysteine from the C-terminal redox motif. Moreover, previous studies have shown several dithiocarbamate complexes with the ability to inhibit the proteasome activity [14,18,21-23], mainly the chymotrypsin-like activity (CT-L activity), since inhibition of CT-L activity has been proved to be the most effective to induce apoptosis and cell cycle arrest in cancerous cells. The ubiquitin/proteasome system (UPS) is a complex molecular machinery which constitutes the main proteolytic pathway in eukaryotic cells and previous studies have suggested that cancer cells are more sensitive than normal cells to UPS inhibition [24-26]. We have previously described that the presence of gold-thiolate units in combination with phosphane molecules lead to highly cytotoxic derivatives, which in the case of phosphanes derived from PTA (1,3,5-triaza-7-phosphaadamantane) includes a balanced relationship between hydrophilicity and lipophilicity [27-33]. In addition to the aforementioned favourable properties of the coordination of dithiocarbamate ligands to a metallic center, here we demonstrate that combination of both type of ligands, dithiocarbamate and thiolate, in the same complex results in the synthesis of highly cytotoxic gold(III) derivatives against colon cancer cells. Moreover, studies concerning the ability of these new complexes to induce apoptosis or their implication in cell cycle progression and interaction with BSA are included. Furthermore, interaction with thioredoxin reductase and proteasome has been also studied in order to discern the possible target of these complexes on Caco-2 cells.

IV.1.2. Experimental section

IV.1.2.1. General procedures

^1H , $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ (161.97 MHz) and $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ (100.62 or 75.4 MHz) NMR spectra were recorded on 400 MHz or 300 MHz Bruker Advance spectrometers. Chemical shifts are quoted in ppm relative to external TMS (^1H , ^{13}C) or 85% H_3PO_4 (^{31}P); coupling constants are reported in hertz.

IR spectra were recorded on a Perkin-Elmer Spectrum 100 FTIR (far-IR) spectrophotometer. Elemental analyses were obtained in-house using a LECO CHNS-932 microanalyzer. Gold(III) $[\text{AuCl}_2(\text{S}_2\text{CNR}_2)]$ (R = Me, Et, Bz) were prepared as described in the literature [34]. The thiolato tin(IV) compounds $[\text{SnMe}_2(\text{SR})]$ (SR = Spirimidine, SMepirimidine, SMe₂pirimidine) were prepared similarly to previously described complexes) [35,36].

IV.1.2.2. General synthesis of $[Au(SR)_2(S_2CNR'_2)]$ ($SR = Spyrim$; $R' = Me$, 1; $R' = Et$, 2; $R' = Bz$, 3; $SR = SMepyrim$; $R' = Me$, 4; $R' = Et$, 5; $R' = Bz$, 6; $SR = SMe_2pyrim$; $R' = Me$, 7; $R' = Et$, 8; $R' = Bz$, 9)

To a solution of $[AuCl_2(S_2CNR_2)]$ (0.25 mmol) in acetone (ca. 20 mL) $[Sn(SR)_2Me_2]$ (0.25 mmol) was added. After stirring the mixture for ca. 4 h at room temperature the solutions were concentrated under *vacuum*. Addition of Et_2O allowed the precipitation of the products, which were isolated by filtration and dried in air.

Using this method, the following complexes were prepared:

$[Au(Spyrim)_2(S_2CNMe_2)]$ (**1**). Dark yellow solid in 73 % yield. 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$, 25 °C): δ (ppm) = 8.41 (d, 4H, $J_{H-H} = 4.8$ Hz, *Spyrim*), 6.85 (t, 2H, $J_{H-H} = 4.8$ Hz, *Spyrim*), 3.36 (s, 6H, *Me(dtc)*), $^{13}C\{^1H\}$ NMR (75.4 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 154.6 (*Spyrim*), 144.2, 131.8, 128.0, 124.0, 113.8, 111.9 (*Spyrim*), 22.2 (*Me(dtc)*). I.R.: $\nu(NCSS)$: 1541 cm^{-1} , $\nu(SCS)$: 983 cm^{-1} ; $\nu(SAuS)$: 385, 427 cm^{-1} . $C_{11}H_{12}AuN_5S_4$ (538.964): C 24.49, H 2.24, N 12.98, found: C 24.83, H 2.39, N 12.67. $LogD_{7.4} = 0.62$.

$[Au(Spyrim)_2(S_2CNEt_2)]$ (**2**). Red solid in 62 % yield. 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$, 25 °C): δ (ppm) = 8.41 (d, 4H, $J_{H-H} = 4.8$ Hz, *Spyrim*), 6.85 (t, 2H, $J_{H-H} = 4.8$ Hz, *Spyrim*), 3.71 (q, 4H, $J_{H-H} = 7.2$ Hz, $CH_2(dtc)$), 1.37 (t, 6H, $J_{H-H} = 7.2$ Hz, *Me(dtc)*). $^{13}C\{^1H\}$ NMR (75.4 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 195.4 (CSS), 157.6; 118.3, 115.8 (*Spyrim*), 45.4 ($CH_2(dtc)$), 12.5 (*Me(dtc)*). I.R.: $\nu(NCSS)$: 1539 cm^{-1} , $\nu(SCS)$: 1068 cm^{-1} ; $\nu(SAuS)$: 380, 416 cm^{-1} . $C_{13}H_{16}AuN_5S_4$ (566.995): C 27.51, H 2.84, N 12.34, found: C 27.16, H 3.11, N 12.42. $LogD_{7.4} = 0.73$.

$[Au(Spyrim)_2(S_2CNBz_2)]$ (**3**). Red solid in 64 % yield. 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$, 25 °C): δ (ppm) = 8.42 (d, 4H, $J_{H-H} = 4.8$ Hz, *Spyrim*), 7.40 (m, 10H, *Bz(dtc)*), 6.86 (t, 2H, $J_{H-H} = 4.8$ Hz, *Spyrim*), 4.73 (s, 4H, *Bz(dtc)*). $^{13}C\{^1H\}$ NMR (75.4 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) = 156.6 (*Spyrim*), 203.9 (CSS), 178.1, 134.2, 132.0, 129.4, 128.9, 127.6 (*Bz(dtc)*), 115.9 (*Spyrim*), 52.1 (*Bz(dtc)*). I.R.: $\nu(NCSS)$: 1450 cm^{-1} , $\nu(SCS)$: 976 cm^{-1} ; $\nu(SAuS)$: 317, 420 cm^{-1} . $C_{23}H_{20}AuN_5S_4$ (691.027): C 39.94, H 2.91, N 10.13, found: C 39.55, H 3.21, N 9.72. $LogD_{7.4} = 0.99$.

$[Au(SMepyrim)_2(S_2CNMe_2)]$ (**4**). Dark yellow solid in 80 % yield. 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$, 25 °C): δ (ppm) = 8.27 (d, 2H, $J_{H-H} = 5.1$ Hz, *SMepyrim*), 6.71 (d, 2H, $J_{H-H} = 5.1$ Hz, *SMepyrim*), 3.35 (s, 6H, *Me(dtc)*). I.R.: $\nu(NCSS)$: 1585 cm^{-1} , $\nu(SCS)$: 990 cm^{-1} ; $\nu(SAuS)$: 383, 438 cm^{-1} . $C_{13}H_{16}AuN_5S_4$ (566.995): C 27.51, H 2.84, N 12.34, found: C 27.21, H 3.23, N 12.46. $LogD_{7.4} = 0.66$.

$[Au(SMepyrim)_2(S_2CNEt_2)]$ (**5**). Red solid in 60 % yield. 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$, 25 °C): δ (ppm) = 8.28 (d, 4H, $J_{H-H} = 5.1$ Hz, *SMepyrim*), 6.71 (d, 2H, $J_{H-H} = 5.1$ Hz, *SMepyrim*), 3.71 (q, 4H, $J_{H-H} = 7.2$ Hz, $CH_2(dtc)$), 1.37 (t, 6H, $J_{H-H} = 9.5, 5.0$ Hz, *Me(dtc)*). $^{13}C\{^1H\}$ NMR (75.4 MHz, $dmso-d_6$): δ (ppm) = 150.2 (*Spyrim*), 194.3 (CSS), 116.5 (*Spyrim*), 47.02, 12.6 (*Et(dtc)*), 23.4 (*Me*). I.R.: $\nu(NCSS)$: 1558 cm^{-1} , $\nu(SCS)$: 1070 cm^{-1} ; $\nu(SAuS)$: 381, 417 cm^{-1} . $C_{15}H_{20}AuN_5S_4$ (595.027): C 30.25, H 3.38, N 11.76, found: C 29.86, H 3.41, N 11.44. $LogD_{7.4} = 1.11$.

$[Au(SMepyrim)_2(S_2CNBz_2)]$ (**6**). Red solid in 60 % yield. 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$, 25 °C): δ (ppm) = 8.29 (d, 2H, $J_{H-H} = 4.3$ Hz, *SMepyrim*), 7.42 (m, 10H, *Bz(dtc)*), 6.71 (d, 2H, $J_{H-H} = 4.3$ Hz,

SMepyrin), 4.73 (s, 4H, *Bz(dtc)*), 2.40 (s, 6H, *SMepyrin*). $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (101 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 203.9 (*CSS*), 134.5, (*Bz(dtc)*), 128.1 (*SMepyrin*), 128.9, 127.6 (*Bz(dtc)*), 58.6 (*Bz(dtc)*), 30.8 (*Me*), 12.9 (s, Et). I.R.: $\nu(\text{NCSS})$: 1526 cm^{-1} , $\nu(\text{SCS})$: 1083 cm^{-1} ; $\nu(\text{SAuS})$: 346, 416 cm^{-1} . $\text{C}_{25}\text{H}_{24}\text{AuN}_5\text{S}_4$ (719.058): C 41.72, H 3.36, N 9.73, found: C 41.36, H 3.42, N 9.48. $\text{Log}D_{7.4} = 1.03$.

$[\text{Au}(\text{SMe}_2\text{pyrim})_2(\text{S}_2\text{CNMe}_2)]$ (**7**). Dark yellow solid in 90 % yield. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 , 25 °C): δ (ppm) = 6.56 (s, 2H, *SMe}_2\text{pyrim}*), 3.35 (s, 6H, *Me(dtc)*), 2.35 (s, 12H, *SMe}_2\text{pyrim}*). $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (75.4 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 202.8 (*CSS*), 166.6 (*Me(dtc)*), 115.1 (*SMe}_2\text{pyrim}*), 39.1 (*Me(dtc)*), 23.6 (*SMe}_2\text{pyrim}*). I.R.: $\nu(\text{NCSS})$: 1568 cm^{-1} , $\nu(\text{SCS})$: 968 cm^{-1} ; $\nu(\text{SAuS})$: 381, 439 cm^{-1} . $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{AuN}_5\text{S}_4$ (595.027): C 30.25, H 3.38, N 11.76, found: C 29.86, H 3.42, N 11.36. $\text{Log}D_{7.4} = 1.52$.

$[\text{Au}(\text{SMe}_2\text{pyrim})_2(\text{S}_2\text{CNEt}_2)]$ (**8**). Red solid in 55 % yield. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 , 25 °C): δ (ppm) = 6.57 (d, 2H, *SMe}_2\text{pyrim}*), 3.71 (q, 4H, $J_{\text{H-H}} = 7.2$ Hz, *CH}_2(\text{dtc})*), 2.36 (s, 12H, *SMe}_2\text{pyrim}*), 1.37 (t, 6H, $J_{\text{H-H}} = 9.5$, 5.0 Hz, *Me(dtc)*). $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (101 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 195.2 (*CSS*), 166.6, 115.01 (*SMe}_2\text{pyrim}*), 46.9 (*CH}_2(\text{dtc})*), 23.6 (*SMe}_2\text{pyrim}*), 12.6 (*Me(dtc)*). I.R.: $\nu(\text{NCSS})$: 1528 cm^{-1} , $\nu(\text{SCS})$: 1071 cm^{-1} ; $\nu(\text{SAuS})$: 383, 428 cm^{-1} . $\text{C}_{17}\text{H}_{24}\text{AuN}_5\text{S}_4$ (623.058): C 32.74, H 3.88, N 11.23, found: C 32.35, H 3.52, N 11.42. $\text{Log}D_{7.4} = 1.51$.

$[\text{Au}(\text{SMe}_2\text{pyrim})_2(\text{S}_2\text{CNBz}_2)]$ (**9**). Red solid in 65 % yield. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 , 25 °C): δ (ppm) = 7.41 (m, 10H, *Bz(dtc)*), 6.57 (s, 2H, *SMe}_2\text{pyrim}*), 4.73 (s, 4H, *Bz(dtc)*), 2.35 (s, 6H, *SMe}_2\text{pyrim}*). $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (75.4 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 195.4 (*CSS*), 166.7, 132.4, 129.5, 129.0, 128.5, 127.6 (*Bz(dtc)*), 115.2 (*SMe}_2\text{pyrim}*), 52.1 (*Bz(dtc)*), 23.6 (*SMe}_2\text{pyrim}*). I.R.: $\nu(\text{NCSS})$: 1519 cm^{-1} , $\nu(\text{SCS})$: 1078 cm^{-1} ; $\nu(\text{SAuS})$: 365, 422 cm^{-1} . $\text{C}_{27}\text{H}_{28}\text{AuN}_5\text{S}_4$ (747.089): C 43.37, H 3.77, N 9.37, found: C 42.96, H 3.54, N 9.13. $\text{Log}D_{7.4} = 0.80$.

IV.1.2.3. X-Ray crystallography

Crystals were mounted in inert oil on glass fibers and transferred to the cold gas stream of an Xcalibur Oxford Diffraction diffractometer equipped with a low-temperature attachment. Data were collected using monochromated Mo K_α radiation ($\lambda = 0.71073$ Å). Scan type ω . Absorption corrections based on multiple scans were applied using spherical harmonics implemented in SCALE3 ABSPACK scaling algorithm [37]. The structures were solved by direct methods and refined on F2 using the program SHELXL-97 [38]. All non-hydrogen atoms were refined anisotropically. Further details on the crystal refinements are collected in Table S1. CCDC 1822691 (**7**) and 1822692 (**9**) contain the supplementary crystallographic data. These data can be obtained free of charge by The Cambridge Crystallography Data Center.

IV.1.2.4. Distribution coefficient ($\text{log}D_{7.4}$)

The n-octanol-water coefficients of the complexes were determined using a shake-flask method.[29] Briefly: buffered-saline distilled water (100 mL, phosphate buffer [PO_4^{3-}] = 10 mM, [NaCl] = 0.15 M, pH 7.4) and n-octanol (100 mL) were shaken together for 72 h to allow saturation of both phases. The addition of 1 mg of the complexes followed by centrifugation and separation of both phases gave two solutions of such derivatives which were analyzed by UV absorbance

spectroscopy to determine their concentration. $\text{Log}D_{7.4}$ was defined as $\log\left\{\frac{[\text{compound}_{(\text{organic})}]}{[\text{compound}_{(\text{aqueous})}]}\right\}$.

IV.1.2.5. Distribution coefficient ($\text{log}D_{7.4}$)

The stability of the gold complexes has been analyzed by absorption UV spectroscopy. UV-Vis absorption spectra of the complexes were recorded on a Thermo Scientific spectrophotometer. Solutions of the thiolate complexes were prepared from their 20 mM DMSO or MeCN stock solutions. Final concentration of these complexes (5×10^{-5} M) in PBS (pH = 7.4) were made up to a volume of 15 mL. The final concentration of DMSO or MeCN in the test cell was 0.5 %. The samples were then incubated at 37 °C and thereafter monitored measuring the electronic spectra over 24 h. Their stability towards reduction was measured by UV-vis spectroscopy after the addition of a solution of sodium ascorbate in a molar ratio 1:10 to a $2.5 \cdot 10^{-5}$ M solution of the gold derivatives.

IV.1.2.6. Interaction with bovine serum albumin

2 mM stock solution of BSA was prepared in PBS at pH 7.4. The real concentration was confirmed using UV-Vis spectroscopy ($\epsilon_{280 \text{ nm}} = 43824 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). UV-visible spectra were recorded by scanning in the wavelength range of 200-400 nm. The BSA concentration was fixed at 10 mM, while that of complex **1** was varied from 10 mM to 60 mM. The absorbance due to the complex was nullified by its addition in the reference cell at the same increasing concentration (from 10 mM to 60 mM). An additional mixture of BSA (10 mM) and complex **1** (10 mM) was incubated and measured the corresponding UV-vis spectrum after dialysis by using an Amicon® Ultra-15 10K Centrifugal Filter device.

For luminescence experiments:

BSA dialysis. A 6 mM solution of complex **8** in MeCN was prepared and diluted in PBS to obtain a final concentration of 60 mM. a dialysis membrane containing 8 mL of a solution of BSA 50 mM was immersed in 50 mL of the complex solution in a beaker. The BSA was then dialyzed against the complex solution for 24 h at 5 °C. Thereafter the luminescence of BSA was analyzed by fluorescence spectroscopy after excitation at 290 nm.

BSA quenching experiments. Gold complexes were dissolved in DMSO to achieve 6 mM stock solutions and six aliquots of 2.5 μL were added to a 50 μM solution of BSA in PBS placed in a quartz cuvette of 1 cm optical path. The final concentrations of gold complexes in the cuvette were 0, 5, 10, 15, 20, 25 and 30 μM . The fluorescence spectra were recorded on a Jobin-Yvon-Horiba fluorolog FL-3-11 spectrometer. The samples were excited at 290 nm and the emission spectra were recorded in a range from 310 to 450 nm with emission slits set to 2 nm. The fluorescence was measured 4 min after every addition of the aliquots of gold complexes.

The data were analyzed using the Stern–Volmer equation $F_0/F = 1 + K_{SV} [\text{gold complex}] = 1 + K_q \tau_0 [\text{gold complex}]$ (τ_0 = lifetime of BSA in absence of the quencher) in order to obtain the Stern–Volmer quenching constant (K_{SV}) and the quenching rate constant (K_q). The binding constant (K_b)

was quantified by using the modified Stern–Volmer equation: $\log \{(F_0 - F)/F\} = \log K_b + n \log [\text{gold complex}]$ (n = number of binding sites) [39,40].

IV.1.2.7. Cell culture

Human colon cancer Caco-2 cells (TC7 clone) were kindly provided by Dr. Edith Brot-Laroche (Université Pierre et Marie Curie-Paris 6, UMR S 872, Les Cordeliers, France) and grown in Dulbecco's Modified Eagles medium (DMEM) (Gibco Invitrogen, Paisley, UK) supplemented with 20 % fetal bovine serum (FBS), 1 % non-essential amino acids, 1 % streptomycin (1000 µg/mL), 1 % penicillin (1000 µg/mL) and 1 % amphotericin (250 U/mL). Caco-2 cells were maintained at 37 °C in a humidified atmosphere of 5 % CO₂.

Human MCF-7 cell line was kindly provided by Dr. Carlos J. Ciudad and Dr. Veronica Noé (Departamento de Bioquímica y Fisiología, Facultad de Farmacia, Universidad de Barcelona, Spain). HepG2 cell line was kindly provided by Dr. María Angeles Alava (Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias, Universidad de Zaragoza, Spain). MCF-7 and HepG2 cells were maintained in the same conditions as described for Caco-2 cell line.

IV.1.2.8. Cell proliferation assay

Cell proliferation was measured using the 3-(4,5-dimethyl-2-thiazoyl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay [41]. Cells were seeded in a 96-well plate at a density of 4000 cells/well and grown for 24 h before treating them with each complex or DMSO (used as control). After 72 h incubation with the complexes 10 µL of MTT (5 mg/mL) were added and incubation was continued at 37 °C for 3 h. Medium was then removed by inversion and 100 µL of DMSO were added to each well. Absorbance at 560 nm, proportional to number of living cells, was measured by spectrophotometry (SPECTROstar Nano, BMG LABTECH) and converted into percentage (%) of growth inhibition.

IV.1.2.9. Apoptosis determination. Annexin V-FITC binding assay

Caco-2/TC7 cells were plated in 75 cm² flask at a density of 500,000 cells/flask and grown for 24 h under standard cell culture conditions before being treated with the complexes or DMSO (as a control) for another 24 h. Then, cells were collected and stained with Annexin V-FITC as previously described by Sánchez-de-Diego et al [42]. The cell-death state was detected by flow cytometry, measuring and analyzing signal intensity using a FACSARIA BD and FACSDIVA BD, respectively.

IV.1.2.10. Determination of caspase-3 by flow cytometry

Caco-2/TC7 cells were plated in 75 cm² flask at a density of 500,000 cells/flask and grown for 24 h under standard cell culture conditions before being treated with the complexes or DMSO (used as control) for another 24 h. Then, cells were collected and stained with anti-Caspase3 antibody (Novus, Clone C92-605; Ex: 494 nm, Em: 520 nm) as described in Sánchez-de-Diego et al.⁶⁷

Fluorescence was analyzed by flow cytometry, using a FACSARRAY BD equipped with an argon ion laser.

IV.1.2.11. Determination of cytochrome c by flow cytometry

Caco-2/TC7 cells were seeded in 75 cm² flask at a density of 500,000 cells/flask and incubated 24 h under standard cell culture conditions before treatment with the complexes or DMSO (as a control) for another 24 h. In order to determine cytochrome c release, the cells were subjected to the procedure described by Christesen et al [43]. and fluorescence was analyzed by flow cytometry using a FACSARRAY BD equipped with an argon ion laser (excitation and emission settings were 488 nm and 575 nm, respectively).

IV.1.2.12. Cell cycle determination. Propidium iodide staining of DNA assay

Caco-2/TC7 were plated in 75 cm² flask at a density of 500,000 cells/flask and grown for 24 h under standard cell culture conditions before being treated with the complexes or DMSO (as a control) for another 24 h. Then, cells were stained with PI and DNA content and cell cycle-state were analyzed as described by Sánchez-de-Diego et al [42].

IV.1.2.13. Flow cytometry mitochondrial membrane potential (Ψ_m) assay

Caco-2/TC7 were seeded in 75 cm² flask at a density of 500,000 cells/flask and grown for 24 h under standard cell culture conditions before being treated with the complexes or DMSO (as a control) for another 24 h. After treatment, cells were stained with the cationic probe DiICl(5) (1,1',3,3,3'-hexamethylindodicarbo-cyanine iodide) as described by Sánchez-de-Diego et al. [42] and changes in Ψ_m were analyzed by flow cytometry using a FACSARRAY BD equipped with an argon ion laser (excitation and emission settings were 633 nm and 658 nm, respectively).

IV.1.2.14. Determination of H₂O₂ intracellular levels

Caco-2/TC7 cells were seeded in a 96-well plate at a density of 4000 cells/well and grown for 24 h under standard cell culture conditions before treating them with each complex or DMSO (used as control) for 1 h. Determination of H₂O₂ cellular levels was performed using the dichlorofluorescein (DCF) assay [44]. After incubation with complexes cells were washed with PBS and incubated with 100 μ L/well of DCFH-DA (dichloro-dihydro-fluoresceindiacetate) for 20 min at 37 °C. Finally, cells were washed twice with PBS and 100 μ L of PBS were added. The intensity of fluorescence was determined with a FLUOstar Omega (BMG LABTECH). Excitation and emission settings were 485 nm and 535 nm, respectively.

IV.1.2.15. Purified thioredoxin reductase 1 (TrxR1) activity

Recombinant Human TrxR (SIGMA SRP6081) was incubated with the complexes or DMSO (as a control) for 45 min at 37 °C. Then, 25 μ L of reaction mix (500 μ L PBS pH 7.4, 80 μ L 100 mM EDTA

pH 7.5, 20 μ L 0,05% BSA, 20 mM 100 μ L NADPH, 300 μ L distilled H₂O) were added to each well. Finally, reaction was started by adding 25 μ L of DNTB (20 mM in pure ethanol) and absorbance at 405 nm was recorded every 10 s for 6 min as a measure of thioredoxin reductase activity.

IV.1.2.16. Thiol-reductase activity assay in Caco-2/TC7 cells

Caco-2/TC7 cells were seeded in a 96-well plate at a density of 4000 cells/well and grown for 24 h under standard cell culture conditions before treating them with each complex or DMSO (used as control) for another 24 h. Then, cell lysates were obtained by adding 25 μ L/well lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 2 mM EDTA, protease inhibitor cocktail and distilled H₂O) and incubating for 30 min at room temperature. Thiol-reductase activity was determined as described above in presence and absence of TrxR inhibitor. TrxR specific activity was normalized by the amount of protein present in each well, determined by Bradford method.

IV.1.2.17. Statistical analysis

Values are means \pm SD. Data were subjected to one way ANOVA and LSD-Fisher post hoc test. Differences were considered to be significant if $p \leq 0.05$.

IV.1.2.18. Docking and DFT studies

Docking calculations were performed using the GOLD 5.5 software [45]. The receptor was built from the experimental crystallographic structure of rat thioredoxin reductase 1 (PDB: 3EAN) [46] using the PROPKA 3.0 program [47] to assess protonation states. This initial structure presents the characteristic selenocysteine residue and is highly similar to the human thioredoxin reductase 1 structure (PDB: 2J3N) [48], with an α -carbon RMSD of 0.43Å and 91.8% identical sequences. The crystallographic geometries for the studied compounds (**4**, **7**, **8**, **9**) were optimized at the B3LYP+gd3bj/def2svp level within a water-like polarizable continuum model using the Gaussian09 rev. D.01. [49-55]/Gaussian 09, Revision D.01, full citation in SI// . The active site was located in the C-terminal moiety where the selenocysteine is located, and receptor flexibility was enabled through rotamer libraries for Lys29, Tyr116, Ile347, Val484, Asp491, Ile492, Leu493, Gln494, Ser495 and Cys497, as we considered these residues to be key in the induced fit of the ligand. During the docking run, an harmonic constraint (1.5-3.5 Å range, $k=5$ arbitrary units) was placed between the Au and Se atoms in order to better represent the specific affinity of these atoms which is not accounted for in the scoring functions. Ranking of the top 10 docking poses for each compound was performed by consensus between the GoldScore, Chemscore and Piecewise Linear Potential (PLP) scoring functions, while the latter was used for the docking calculation. The default options of GOLD 5.5 were used whenever not stated otherwise. UCSF Chimera [56] was used to generate the relevant images.

All DFT theoretical calculations have been performed using the Gaussian09 program package. B3LYP method [49,53,54] has been employed including the D3 dispersion correction scheme developed by Grimme [50] using the Becke-Johnson damping [55] for both energies and gradient calculations in conjunction with the “ultrafine” grid. The def2-SVP basis set [51] has been

selected for all atoms for geometry optimizations, performing single point calculations with def2-TZVP basis set to refine energy results. A polarizable continuum model (PCM) has been included for energy and gradient calculations [52]. The nature of the stationary points has been confirmed by analytical frequency analysis, and the transition state was characterized by calculation of reaction paths following the intrinsic reaction coordinate.

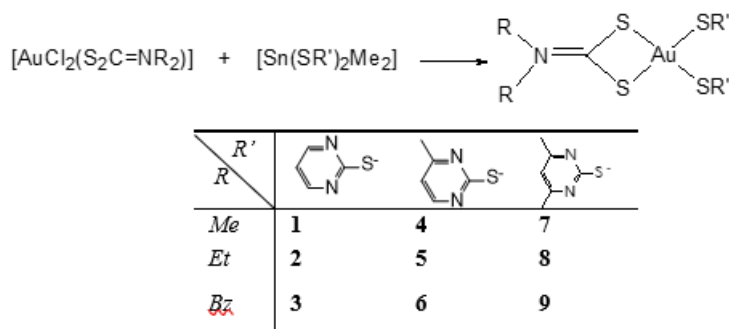
IV.1.2.19. Proteasomal activity assay in Caco-2/TC7 cells

Caco-2/TC7 cells were plated in 25 cm² flasks and incubated for 24 h under standard cell culture conditions. After 24 h treatment with the complexes or DMSO (as a control), cells were lysed with saponin, followed by centrifugation at 13,000 rpm and 4 °C for 15 minutes. Supernatant was used for the assay, adding 10 µg of protein from cell lysate (determined by Bradford method) to each well in a 96-well plate. Then, 100 µL of reaction buffer (25 mM Tris/HCl pH 7.5) were added and, finally, the mixed was incubated with 20 µM N-Suc-L-L-V-T-AMC (SIGMA, SG510) at 37 °C in the dark for 30 min. After incubation, fluorescence from hydrolyzed AMC groups was measured with a FLUOstar Omega (BMG LABTECH). Excitation and emission settings were 3655 nm and 460 nm, respectively.

IV.1.3. Results and discussion

IV.1.3.1. Synthesis and characterization

Treatment of the dithiocarbamate gold(III) derivatives [AuCl₂(S₂CNR₂)] with a freshly prepared thiolate solution, obtained by deprotonation of the corresponding thiol (R'SH) with NaOEt in ethanol, gives rise to dark solutions accompanied by metallic gold precipitation. To avoid such gold decomposition, the use of tin complexes as thiolate and/or dithiolate transfer reagents have been previously proved as an effective route in the preparation of gold(I) and gold(III) compounds under mild conditions [57-59]. Therefore, the reaction of [Sn(SR')₂Me₂] [60] with [AuCl₂(S₂CNR₂)] affords new thiolate-dithiocarbamate gold(III) derivatives according to scheme 1.



Scheme 1. Synthesis of dithiocarbamate gold(III) derivatives.

Their ¹H NMR spectra display the resonances corresponding to both pyrimidine units and the dithiocarbamate substituents, which are equivalent in solution. In addition, the IR spectra point

to a bidentate symmetrical disposition of the dithiocarbamate ligand as deduced from the presence of a unique band in the region due to the $-\text{CSS}$ moiety [61-63] (see experimental).

This geometry has been corroborated with the crystal structure of $[\text{Au}(\text{SMe}_2\text{pyrim})_2(\text{S}_2\text{CNMe}_2)]$ (**7**) and $[\text{Au}(\text{SMe}_2\text{pyrim})_2(\text{S}_2\text{CNBz}_2)]$ (**9**) ($\text{SMe}_2\text{pyrim} = 4,6\text{-dimethyl-2-mercaptopyrimidine}$) obtained by X-ray diffraction analysis.

Most of the X-ray structures of bidentate dithiocarbamate gold(III) derivatives retrieved from CSD Cambridge Data Base 2017 consist on the homoleptic bis-dithiocarbamate complexes or the corresponding dihalogen dithiocarbamate derivatives. Only three examples comprise an additional monodentate dithiocarbamate moiety: $[\text{Au}(\text{CH}_2\text{P}(\text{S})\text{Ph}_2)(\text{S}_2\text{CNEt}_2)]$ [64], $[\text{Au}(\text{S}_2\text{CNEt}_2)_2(\text{damp})]$ ($\text{damp} = -\text{C}_6\text{H}_4\text{CH}_2\text{NMe}_2$) [65] and $[\text{Au}(\text{S}_2\text{CNR}_2)_3]$ [66] and one with a dithiolate ligand ($[\text{Au}(\text{S}_2\text{CNR}_2)(\text{mnt})]$ ($\text{mnt} = \text{malonitriledithiolate}$) [67]. None of them have thiolates as ancillary ligands.

The molecular structures of complexes **7** and **9** are shown in Figure 1 and 2 respectively. Both present a square planar geometry around the gold center, which is bonded to four sulfur donor ligands, to the dithiocarbamate as chelate and to two monodentate thiolate ligands. The Au-S bond distances in complex **7** within the dithiocarbamate ligand are unsymmetrical, with one shorter Au-S bond of 2.3363(13) Å and one longer of 2.3501(13) Å; whereas the bond lengths to the thiolate ligands are very similar and in the middle of the latter distances, 2.3415(13) Å and 2.3462(13) Å. The geometry of the gold center is square planar and the main distortion arise from the narrow bite angle of the dithiocarbamate ligand, 74.99(5)°, although is worth mentioning that the angle S(3)-Au(1)-S(4) with the two thiolate ligands is also quite narrow, 79.75(5)°, probably to allow the two bulky substituents to be further apart of the AuS_4 moiety. In contrast for complex **9** the Au-S bond lengths are longer in the dithiocarbamate, Au(1)-S(1) 2.3452(10) Å, Au(1)-S(2) 2.3490(11) Å, probably because of the lower donor capacity of the benzyl substituted dithiocarbamate compared with the methyl one.

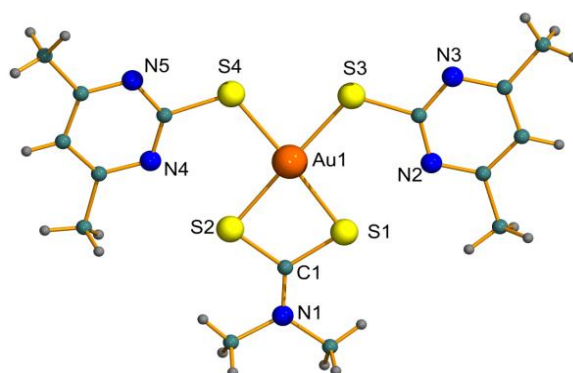


Figure 1. Molecular structure of $[\text{Au}(\text{SMe}_2\text{pyrim})_2(\text{S}_2\text{CNMe}_2)]$ (**7**). Selected bond lengths [Å] and angles [°]: Au(1)-S(2) 2.3363(13), Au(1)-S(3) 2.3417(13), Au(1)-S(4) 2.3462(13), Au(1)-S(1) 2.3501(13), S(1)-C(1) 1.746(5), S(2)-C(1) 1.728(5); S(2)-Au(1)-S(4) 101.94(5), S(3)-Au(1)-S(4) 79.75(5), S(2)-Au(1)-S(1) 74.99(5), S(3)-Au(1)-S(1) 103.32(5).

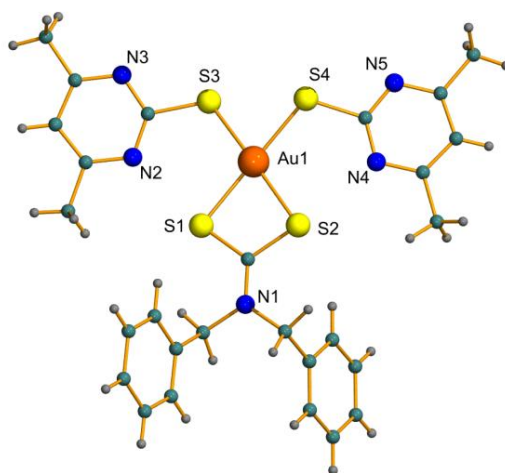


Figure 2. Molecular structure of $[\text{Au}(\text{SMe}_2\text{pyrim})_2(\text{S}_2\text{CNBz}_2)]$ (**9**). Selected bond lengths [\AA] and angles [$^\circ$]: Au(1)-S(4) 2.3275(10), Au(1)-S(3) 2.3334(11), Au(1)-S(1) 2.3452(10), Au(1)-S(2) 2.3490(11), S(1)-C(1) 1.733(3), S(3)-C(16) 1.770(3), S(4)-C(22) 1.769(3), S(2)-C(1) 1.736(3); S(4)-Au(1)-S(3) 78.50(4), S(3)-Au(1)-S(1) 103.37(3), S(4)-Au(1)-S(2) 103.34(4), S(1)-Au(1)-S(2) 74.99(3).

The molecules of complex **7** are associated in the crystal through intermolecular short Au \cdots S contacts of 3.589 \AA , between the gold center of a molecule and one of the sulfur atoms of the dithiocarbamate ligand S2 in a slipped fashion (Figure S1). This interaction is missing in complex **9** probably because the higher steric hindrance of the benzyl groups.

IV.1.3.2. Solution chemistry

The stability of the complexes was analyzed by UV-visible. They are moderately soluble in organic solvents other than hydrocarbons. Solutions suitable for spectrophotometric analysis were prepared by diluting acetonitrile or dimethylsulfoxide mother solutions of the complexes with PBS buffer at pH = 7.4. The resulting solutions were monitored over 24 h at 37 $^\circ\text{C}$. The spectra of the complexes display bands (Figure S2, supplementary material) in the region 300-400 nm, characteristic of the gold(III) chromophore assigned as LMCT bands [68]. In complexes **1-5** the transitions remain without any changes in shape or displacement in the absorbance maximum over 24 h, implying a substantial stability of the chromophore under physiological conditions. Complexes $[\text{Au}(\text{SMe}_2\text{pyrim})_2(\text{S}_2\text{CNMe}_2)]$ (**7**) and $[\text{Au}(\text{SMe}_2\text{pyrim})_2(\text{S}_2\text{CNEt}_2)]$ (**8**) (with SMe_2pyrim = 4,6-dimethyl-2-mercaptopyrimidine) display a slight progressive decrease in intensity of the characteristic bands without shape modifications.

However, these effects are specially marked in $[\text{Au}(\text{SMepyrim})_2(\text{S}_2\text{CNBz}_2)]$ (**6**) and $[\text{Au}(\text{SMe}_2\text{pyrim})_2(\text{S}_2\text{CNBz}_2)]$ (**9**), where the main bands drops to 70 % of its initial intensity, in **9**, probably due to the presence of turbidity during the measurement time, as consequence of their low solubility in the PBS solution. Additionally spectral changes are observed in both cases, that includes a bathochromic shift of the LMCT transition band and its disappearance after 24 h, in complex **6**. All complexes exhibit high stability towards gold(0) reduction, since no broad absorption band at around 550 nm, characteristic of colloidal gold, are detected over 24 h at 37 $^\circ\text{C}$.

In addition, the stability of some of the new dithiocarbamate derivatives towards biological relevant reducing agents, such as sodium ascorbate (NaAsc), has been evaluated. Figure S3 shows the corresponding UV-vis spectra before and after the addition of NaAsc to a solution of the complex (in molar ratio complex:NaAsc of 1:10) and their evolution over 2 h. Most of the derivatives are rather stable, since their profile remains unchanged, except in the case of $[\text{Au}(\text{SMe}_2\text{pyrim})_2(\text{S}_2\text{CNET}_2)]$ (**8**) where a new band at around 500 nm grows up along the time, indicating gold colloidal formation, due to the partial reduction of the sample.

IV.1.3.3. Bovine serum albumin interaction

Bloodstream is largely used to deliver drugs to disease targets in the majority of pharmaceutical treatments. Once in the blood the drug molecule can bind to the different blood constituents, such as plasma proteins. This interaction is electrostatic and hydrophobic and can affect important properties of a drug, such as its absorption and distribution [69], which is directly related with drug pharmacokinetics and dosing regimen. Albumin is the most abundant plasma protein. Human serum albumin (HSA) is responsible for the maintenance of blood pH and osmotic pressure as well as the transport of molecules throughout the body. Bovine serum albumin (BSA) is commonly used as a model protein for HSA owing to their similarity (*ca.* 76 %) and its higher availability and stability compared to HSA. BSA possesses three fluorophores: two tryptophane residues (Trp134 and Trp212), with high emission intensity, and tyrosine and phenylalanine residues. The Trp fluorescence is environment sensitive, inasmuch changes in conformation or binding to a substrate, can result in signal quenching. We firstly performed a dialysis experiment to determine the ability of complex **8** to bind BSA. A solution of BSA was dialyzed against a solution of the gold derivative in PBS for 24 h. The fluorescence of BSA was measured before and after the dialysis experiment revealing a quenching of the tryptophan luminescence which would be indicative of BSA-gold complex formation (figure 3A). Thereafter, the fluorescence spectra of BSA in the presence of increasing amounts of complexes **1**, **3**, **4**, and **8** were recorded in the range 310-450 nm upon excitation at 295 nm. A concentration dependent quenching of the fluorescence is observed, without changing in shape or in the position of the maximum (see figure 3B as example).

Fluorescence data were analyzed by the Stern-Volmer equation (see experimental in the supplementary material) and the corresponding plot F_0/F vs [complex] (F and F_0 are the corresponding intensities in the presence and the absence of the quencher agent) gives a linear plot (Figure 4A) characteristic of the presence of a single mechanism of quenching, static or dynamic [70].

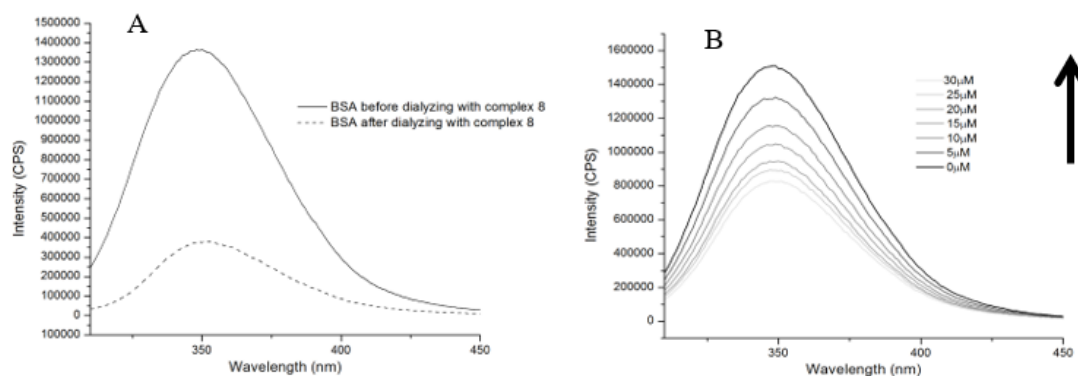


Figure 3. (A) BSA dialysis binding study with complex **8**. BSA 50 μM was dialyzed for 24h in the presence of a buffered solution of complex **8** (60 μM). The fluorescence of BSA was measured at $\lambda_{\text{exc}} = 295 \text{ nm}$ before and after dialysis. (B) Fluorescence quenching spectra of BSA in the presence of various concentration of complex **8** (from 0 μM to 30 μM) at $\lambda_{\text{exc}} = 295 \text{ nm}$. $[\text{BSA}] = 50 \text{ M}$. The arrow indicates the change in the emission intensity with respect to the increasing amounts of the gold complex.

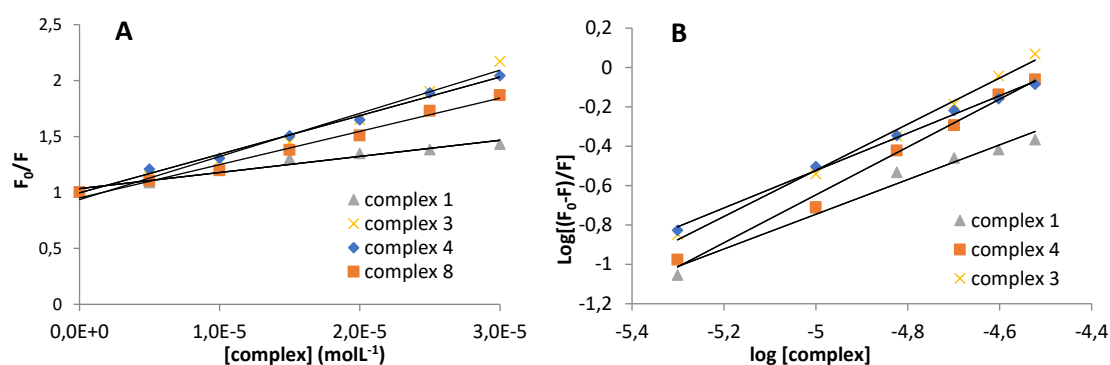


Figure 4. Stern-Volmer plots for the quenching of BSA with increasing amounts of complexes 1, 3, 4 and 8 (complex concentration from 0 μM to 30 μM) at 298 K ($\lambda_{\text{exc}} = 295 \text{ nm}$, $[\text{BSA}] = 50 \mu\text{M}$). (A) Stern-Volmer equation used: $F_0/F = 1 + K_{sv}[Q]$. The slope of the best fit linear trend provides the Stern-Volmer quenching constant K_{sv} . (B) Stern-Volmer equation used: $\log\{(F_0-F)/F\} = \log K_b + n \log [Q]$. The intercept of the best fit linear trend provides the Stern-Volmer quenching constant K_b .

This plot also provides the Stern-Volmer quenching constant K_{sv} (Table 1) and the bimolecular quenching constant K_q ($K_q = K_{sv}/\tau_0$, being τ_0 the lifetime of the fluorophore in the absence of the quencher) by using the standard value of around 10^{-8} for τ_0 [71], being all values in the same order. Static quenching implies formation of a complex involving the quencher and the biomolecule, however dynamic quenching is caused by collisions between the protein and the quencher. Both mechanisms of quenching can be distinguished by for example, the study of the bimolecular quenching constant, k_q .

Table 1. Values of Stern-Volmer quenching constant (K_{sv}), the number of binding sites and the apparent binding constant (K_b) for the interaction of complexes **1**, **4**, **8** with BSA.

Compound	$K_{sv} \times 10^4$ (M^{-1})	K_b (M^{-1})	n
[Au(Spyrim) ₂ (S ₂ CNMe ₂)] (1)	1.44	4.6×10^3	0.97
[Au(Spyrim) ₂ (S ₂ CNBz ₂)] (3)	3.85	2.2×10^5	1.17
[Au(SMepyrin) ₂ (S ₂ CNMe ₂)] (4)	3.45	2.71×10^5	1.21
[Au(SMe ₂ pyrim) ₂ (S ₂ CNEt ₂)] (8)	2.97	1.69×10^4	0.95

This constant represents the efficiency of quenching or the accessibility of the fluorophore to the quencher. As dynamic quenching depends on diffusion, a k_q value higher than the diffusion-controlled rate constant of the biomolecule in water, $10^{10} M^{-1}s^{-1}$, could indicate some type of binding interaction implying a possible contribution of static quenching. In our case, the values of k_q are of the order of $10^{12} M^{-1}s^{-1}$, so binding of the complexes and BSA could be considered.

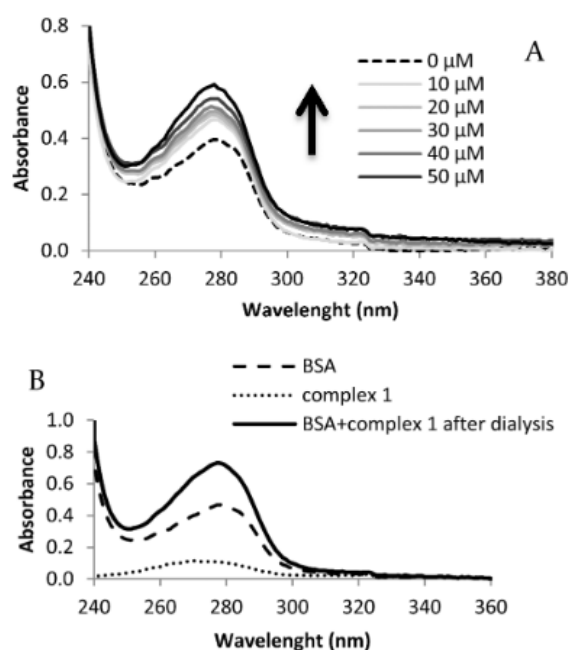


Figure 5. (A) Absorption spectra of BSA (10 μM) in the presence of increasing amounts of complex **1** (concentration range from 10 μM to 60 μM). Equal concentration of the complex was also added to the reference cell (in each measurement) in order to eliminate the absorbance of **1** itself. Arrow indicates the increase of the complex concentration. (B) UV-Vis absorption spectra of: free BSA (10 μM), complex **1** (10 μM) and a mixture of BSA and complex **1** in 1:1 molar ratio after dialysis (solid line).

Absorption spectroscopy is a simple method to explore the structural changes of serum albumin and also used to discriminate static and dynamic quenching mechanism. UV-vis absorption spectra of BSA were obtained after the addition of increasing amounts of complex **1** (Figure 5A). The UV-vis absorption spectrum of BSA displays a strong band with λ_{max} value of 208 nm, related to changes in the conformation of the peptide backbone and a weak band around 280 nm due

to the presence of tryptophan and tyrosine residues in the protein. The spectra shown in figure 5A indicates a significant increase in the absorbance at 280 nm by increasing concentration of the complex, which is in accordance with a change in the polarity of the microenvironment around tryptophan and tyrosine residues [72]. The absorption spectrum of a mixture of BSA and complex **1** in a 1:1 molar ratio, was also measured after dialyzing the solution, in order to eliminate the excess of unreacted complex (Figure 5B). As shown in the figure, the peak intensity is increased after the addition of a solution of complex **1** that is additionally blue shifted. As dynamic quenching does not affect the absorption of quenching molecule inasmuch as only affects the excited states of the quenching molecule, the changes observed in the spectrum could be indicative of static quenching and consequently the formation of a complex between BSA and the gold derivative [73].

Fluorescence intensity data can also afford the binding constant (K_b) and the number of binding sites (n) from the modified Stern-Volmer equation ($\log \{(F_0 - F)/F\} = \log K_b + n \log [\text{gold complex}]$ being n = number of binding sites). (Table 1 and figure 4B). In these complexes the calculated value for K_b are in the range 10^3 - 10^5 M^{-1} next to the previously values observed in other gold(III) complexes [74,75]. Most of the drugs bind to plasma proteins. This binding should be reversible and the equilibrium between the protein-bound and unbound should be quickly established in order to guarantee drug release to the target. Low to moderate values of binding constant (see Table 1) could facilitate drug transportation by the protein through blood and easy target release.

IV.1.3.4. Antiproliferative Activity

The *in vitro* cytotoxic effect was evaluated on human colon cancer cell line Caco-2/TC7. At first, we studied the effect that the complexes and their dithiocarbamate and thiolate free ligands exerted on the proliferation of colon carcinoma cells after 72 h exposure to increasing concentrations of the complexes. We obtained promising results since all the tested derivatives showed prominent antiproliferative effect -expressed in terms of IC_{50} - with values in the micromolar range comparable to those obtained for similar metallodrugs [22,23]. The free ligands were in general much less effective in decreasing the viability over cancer cells than gold complexes, which confirms that the gold center is necessary to obtain the biological activity (Table 2).

All the complexes display considerably lower IC_{50} values than that observed with *cisplatin* and similar values, in most of the cases, or even lower in comparison to *auranofin*. These values are barely affected by the nature of the substituents in the thiolate unit, however the ethyl group in the dithiocarbamate ligand (S_2CNEt_2) gives the most active derivatives, with values ranging from 0.56 to 1.0 μM and the benzyl residue gives the lowest cytotoxicity. In addition, there is no linear correlation between the lipophilic character of the compounds and their anticancer activity. The increase in the lipophilic character (given in terms of $\log D_{7,4}$, see Table 2) is shown in Figure S15.

Table 2. IC₅₀ values and distribution coefficients of the thiolate complexes and the free ligands against TC7 colon cancer (undifferentiated) cell lines compared with *auranofin* and *cisplatin*.

Compound	logD _{7,4}	IC ₅₀ (μM) ^[a]
[Au(Spyrim) ₂ (S ₂ CNMe ₂)] (1)	0.62	3.43 ± 2.26
[Au(Spyrim) ₂ (S ₂ CNEt ₂)] (2)	0.73	0.70 ± 0.22
[Au(Spyrim) ₂ (S ₂ CNBz ₂)] (3)	0.99	12.55 ± 1.71
[Au(SMe ₂ pyrim) ₂ (S ₂ CNMe ₂)] (4)	0.66	1.18 ± 0.57
[Au(SMe ₂ pyrim) ₂ (S ₂ CNEt ₂)] (5)	1.11	0.56 ± 0.08
[Au(SMe ₂ pyrim) ₂ (S ₂ CNBz ₂)] (6)	1.03	2.42 ± 1.10
[Au(SMe ₂ pyrim) ₂ (S ₂ CNMe ₂)] (7)	1.52	5.31 ± 2.88
[Au(SMe ₂ pyrim) ₂ (S ₂ CNEt ₂)] (8)	1.51	1.00 ± 0.06
[Au(SMe ₂ pyrim) ₂ (S ₂ CNBz ₂)] (9)	0.80	5.00 ± 0.79
<i>Cisplatin</i>	-0.53	45.60 ± 8.08
<i>Auranofin</i>	-2.53	2.10 ± 0.40
SPyrim		>50
SMe ₂ Pyrim		>50
SMe ₂ Pyrim		>50
NaS ₂ CNMe ₂		>50
NaS ₂ CNEt ₂		26.51 ± 1.80
NaS ₂ CNBz ₂		14.52 ± 2.21

^[a] Mean ± SE of at least three determinations

Caco-2 cell line undergoes spontaneous enterocytic-like differentiation when confluency is reached. Therefore, they become polarized cells expressing apical and basolateral surfaces with well-established tight junctions [76][77]. Consequently, it was possible to test the cytotoxic effect of the complexes on differentiated cells (behaving as non-carcinogenic) and compare with the undifferentiated cells viability. Our results suggested that complexes **4**, **8** and **9** were selective towards cancer cells since they displayed higher IC₅₀ values when tested on Caco-2/TC7 cells over confluence (Table 3). Moreover, it was observed that cytotoxic concentrations of complexes **4**, **8** and **9** for undifferentiated cells did not compromise the integrity in differentiated cells, since no reduction of their viability were detected after incubation with the gold derivatives at IC₅₀ concentrations (Table S2). This fact suggests that treatment with these complexes would not induce excessive side effects on healthy tissues. The low cytotoxicity of our derivatives in normal cells could be rationalized by the different behavior of cancerous cells and the different response after incubation with the gold complexes. In fact, tumor cells have both altered and increased metabolic demands. In this regard, thioredoxin reductase is overexpressed in several human cancer cell lines including in colorectal tumors as compared with normal tissues [78,79]. In addition, cancer cells are more sensitive to oscillations in the ubiquitin proteasome system than normal cells [80]. Thus, cancer cells require higher rates of protein synthesis and consequently greater requirement for proteasome activity to maintain homeostasis. Some examples have shown that any changes in ubiquitin proteasome activity result in the accumulation of misfolded immunoglobulins, triggering apoptosis, which explain thus the cytotoxic effects of proteasome inhibitors [81].

Table 3. IC₅₀ values determined by MTT assay after incubating differentiated Caco-2/TC7 cells with increasing concentrations (10, 20, 30, 40 and 50 μM) of complexes **4**, **8** and **9** for 72 h.

Compound	IC ₅₀ (μM) ^[a]
[Au(SMe ₂ pyrim) ₂ (S ₂ CNMe ₂)] (4)	>50
[Au(SMe ₂ pyrim) ₂ (S ₂ CNEt ₂)] (8)	9.86 ±0.56
[Au(SMe ₂ pyrim) ₂ (S ₂ CNBz ₂)] (9)	34.70 ±0.29

^[a] Mean ± SE of at least three determinations

Additionally, we have chosen the complex with the lowest IC₅₀ value, [Au(SMe₂pyrim)₂(S₂CNEt₂)] (**8**), to be tested towards additional cancer cells (MC-7 breast carcinoma) and differentiated cells (liver HepG2) corroborating the selectivity of this type of complex towards undifferentiated or cancerous cells (Tables S3 and S4 supporting information). Thus, complex **8** displayed high cytotoxicity against MC-7 cancer cells with time dependent IC₅₀ values, since lower value was obtained after 72 h of incubation (2.25 μM at 72 h vs 3.27 μM at 48 h) and higher IC₅₀ values were determined after complex **8** incubation with HepG2 cells (5.96 μM at 72 h vs 9.80 μM at 48 h). Both free ligands are less cytotoxic against these cells, reinforcing the importance of the gold center presence.

IV.1.3.5. Cell death studies

Since the complexes showed the capacity of compromising cell proliferation, we analyzed the type of induced cell death caused by gold(III) dithiocarbamate species. Annexin V/propidium iodide double staining was performed on Caco-2/TC7 cells and the fluorescence was determined by flow cytometry.

Along the apoptotic process, the cell suffers morphological changes and the phosphatidylserine, an inner membrane phospholipid, is translocated to the outer part of the membrane, where binds to Annexin V (FITC conjugated). Cells undergoing late apoptosis stages and necrosis processes present damaged membranes permeable to PI, whereas cells with intact membranes exclude PI. A prominent increase of Caco-2/TC7 cells in early stages of apoptosis was detected after 24 h incubation with complex **8**, whereas treatment with complexes **4** and **9** showed a slight increase in this cell population (Figure 6A). There were not significant changes in late apoptotic cell levels after incubation with either three complexes (Figure 6A). However, higher levels of apoptotic cells, both in early and late stages were observed after 48 h treatment with complexes **4**, **8** and **9** (Figure 6B).

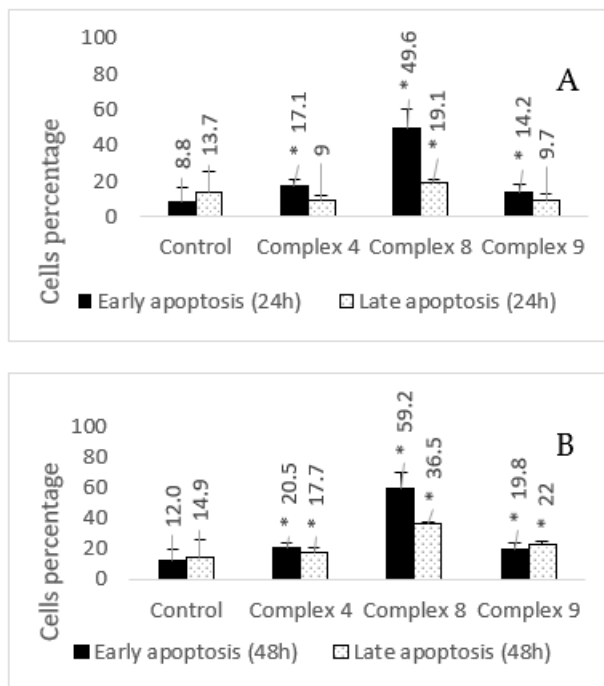


Figure 6. Undifferentiated Caco-2/TC7 cells apoptotic-state analysis after 24 h (A) and 48 h (B) incubation with complexes **4** (1.18 μ M), **8** (1 μ M) and **9** (5 μ M). A double staining (Annexin V-PI) was performed and fluorescence was determined by flow cytometry. The results are expressed in % of cells going through early and late apoptosis. * $p < 0.05$ compared to control.

Apoptosis, a programmed cell death that avoid inflammation and damage to surrounding cells, is ultimately triggered by the activation of executioner caspases (-3, -6, -7). Caspase-3 activation was studied by flow cytometry after cells incubation with complexes **4**, **8** and **9** at their IC_{50} concentration. An increase in active caspase-3 levels was observed in all the cases after 24 h incubation (Figure 7). This fact could be related to different activation pathways of apoptosis.

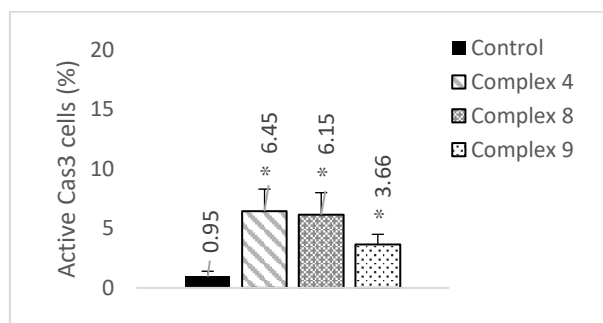


Figure 7. Evaluation of caspase-3 activation by flow cytometry in Caco-2/TC7 cells after 24 h treatment with complexes **4** (1.18 μ M), **8** (1 μ M) and **9** (5 μ M). Fluorescence of anti-caspase 3 antibody in cells was determined by flow cytometry. The results are expressed in terms of % of cells with caspase 3 activated. * $p < 0.05$ compared to control.

There are two different apoptotic pathways, the extrinsic or death receptor pathway and the intrinsic or mitochondrial pathway, which converge in caspase-3 activation [82].

Since previous studies on metal complexes suggested mitochondrial dysfunction and intrinsic apoptosis induction [83,84], we analyzed two characteristic features of this pathway: mitochondrial depolarization and cytochrome *c* release.

Throughout the intrinsic apoptotic process, the mitochondrion undergoes the redistribution of ions across the membrane, which alters the concentration gradient of protons that maintains the mitochondrial membrane potential (MMP). The MMP reduction induces matrix condensation, crystal unfolding and cytochrome *c* redistribution towards intermembrane space [85]. These structural changes on account of mitochondrial depolarization ultimately lead to cytochrome *c* release. Once in the cytoplasm, cytochrome *c* binds to Apoptosis Protease-Activating Factor-1 (APAF-1). Then, this complex recruits and binds to caspase-9, constituting apoptosome, which activates the effector caspase-3 [86].

To confirm whether the complexes would compromise the mitochondrial membrane potential (MMP), we used the cationic probe DiI(5) (1,1',3,3,3',3'-hexamethylindodicarbo-cyanine iodide) and performed flow cytometry in order to detect the decrease of fluorescence in cells with depolarized mitochondria in comparison with unaltered MMP cells. As expected, complexes **4**, **8** and **9** decreased MMP in Caco-2/TC7 cells after 48 h of incubation (Figure 8B). Moreover, complex **8** induced mitochondrial depolarization along the first 24 h after incubation, unlike complexes **4** and **9** (Figure 8A). This is well-correlated with our previous results shown in Figure 6, where $[\text{Au}(\text{SMe}_2\text{pyrim})_2(\text{S}_2\text{CNEt}_2)]$ (**8**) proved to induce apoptosis much faster than $[\text{Au}(\text{SMepyrim})_2(\text{S}_2\text{CNMe}_2)]$ (**4**) or $[\text{Au}(\text{SMe}_2\text{pyrim})_2(\text{S}_2\text{CNBz}_2)]$ (**9**) and with the higher lipophilic character of complex **8** in comparison with those of **4** and **9**.

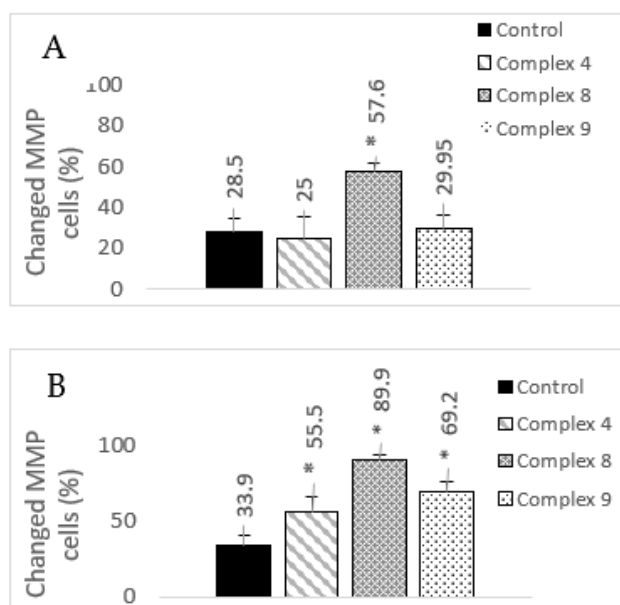


Figure 8. Quantification by flow cytometry of number of cells with mitochondrial depolarization. Colorectal cancer Caco-2/TC7 cells were treated with **4** (1.18 μM), **8** (1 μM) and **9** (5 μM) for 24 h (A) and 48 h (B). Cells were stained with a cationic probe DiI(5) and fluorescence was determined by flow cytometry. The results are expressed in terms of % of cells with changed MMP. * $p < 0.05$ compared to control.

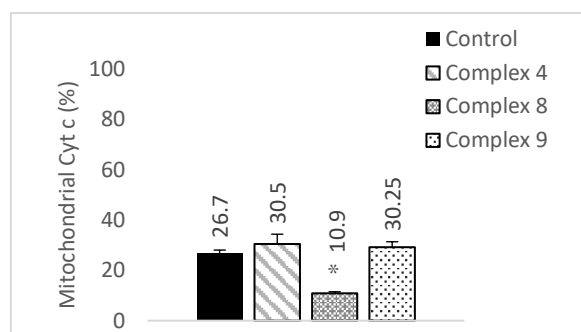


Figure 9. Flow cytometry quantification in terms of % mitochondrial cytochrome *c* in Caco-2/TC7 cells after 24 h of treatment with complexes **4** (1.18 μ M) **8** (1 μ M), and **9** (5 μ M). Fluorescence from anti-cytochrome *c* antibody was determined by flow cytometry. *, $p < 0.05$ compared to control.

Then, we quantified cytochrome *c* release to cytoplasm by flow cytometry in treated and untreated cells. As expected, after 24 h only cells treated with complex **8** showed a significant decrease in mitochondrial cytochrome *c* levels (Figure 9), which is in accordance with the results described for mitochondrial depolarization, being complex **8** the fastest in its induction and consequently release of cytochrome *c* to cytoplasm. Based on these results, we conclude that the complexes could induce intrinsic apoptosis in these cancer cells, despite the fact that at 24 h incubation time only complex **8** produces apoptosis in this way.

IV.1.3.6. Studies of therapeutic targets

Although there are some examples of gold(III) based metallodrugs [87] that have shown evidence for a direct DNA damage, for most other cases interaction with DNA appears to be modest or even inexistent and consequently should not be considered as the primary biological target. In our case, we have monitored the influence of complex **1** on pIRES2-EGFP (5308 pb) plasmid DNA, following incubation at 37 $^{\circ}$ C, by agarose gel electrophoresis, and compared to cisplatin (Figure S16). After treatment with increasing amounts of the complex, the mobility of the plasmid was not affected unlike with the observed in cisplatin. Additionally, studies of this complex with calf thymus DNA by vis-UV absorption titration did not provide any changes in the Soret band (data not shown). These results should indicate the absence of an interaction with DNA double helix.

As stated in the introduction, one of the most studied proteins as a possible biological target in gold derivatives is the selenoenzyme thioredoxin reductase (TrxR), involved in the regulation of the intracellular state and mitochondrial function. In addition, proteasome has emerged as a new target in cancer therapy [26,88], since proteasome inhibitors exert the ability to inhibit the growth of cancer cells altering the balance on intracellular proteins. Moreover, several examples of dithiocarbamate gold(III) derivatives have been previously described as potent proteasome inhibitors [10,14,18,22,23].

Consequently, inhibition of both, the enzyme thioredoxin reductase and the ubiquitin-proteasome system has been evaluated in complexes **4**, **8** and **9** as selected derivatives.

IV.1.3.7. Interaction with thioredoxin reductase

Thioredoxin system is one of the most important antioxidant systems in mammalian cells and it is constituted by thioredoxin (Trx), the enzyme thioredoxin reductase (TrxR) and NADPH. Although the principal function of thioredoxin system is controlling the intracellular redox homeostasis and repairing oxidative damage, it is as well implicated in cell growth and apoptosis control [89]. Thioredoxin reductase comprises a flexible C-terminal extension with a cysteine/selenocysteine redox center [90], able to interact with different substrates and inhibitors, such as gold compounds.[91,92] In addition, thioredoxin reductase is overexpressed in several human cancer cells compared to normal tissues [78]. Consequently, some authors regard to this enzyme as a novel target for cancer therapy [93,94]. Different examples of dithiocarbamate gold complexes have been described as TrxR inhibitors in the literature [95-97].

Computational studies were performed in order to assess the possible interaction mechanisms between complexes **4**, **7**, **8** and **9** and TrxR1. As the selenocysteine (Sec) amino acid is important for high catalytic efficiency and the human TrxR1 structure presents a mutation (Sec-> Cys) [98,99], the analogous homodimer of rat TrxR1 (subunits A and B) has been selected for the docking studies. As both mammalian proteins (rat and human) present very similar overall folding and sequence, the rat TrxR crystal structure has been selected as target of the docking studies due to the importance of a good description of the active site. Significant differences in the binding mode of complex **9** with respect to **4**, **7** and **8**, have been found, in correlation with the experimental inhibitory activities. The binding region was located in the surroundings of the selenocysteine residue of subunit B. The volume of the substituted dithiocarbamate moiety appears to be highly relevant, as nonpolar substituents tend to occupy a hydrophobic pocket of reduced size in the proximity of Ala26 A and Ile347 B (Figure S17 and Figure 10 as a representative example). The resulting poses favor a highly maintained pair of hydrogen bonds with Ser404 B and Cys497 B, one to each pyrimidine ring. This hydrophobic pocket is unable to hold larger groups, as seen in complex **9**, which is therefore forced to a different pose that lacks the hydrogen bond pair. The nearby presence of subunit A is shown to be secondary in the disposition of the compounds.

In order to analyze the kinetics and thermodynamics of the sulfur-selenium ligand exchange of the Au(III) complex, a σ -bond metathesis reaction mechanism has been investigated using quantum-mechanical calculations on a model system at the DFT level using a continuous solvent approach. The calculated free energetic profile for this reaction is shown in Figure S18. A concerted transition structure **TSA/B** is found for this reaction presenting an energetic barrier of 18.6 kcal/mol. Interestingly, the geometry of the transition state favors the perpendicular approach of the selenol group to the planar complex, which is shown to be favored for complexes **4**, **7** and **8** in the docking calculations.

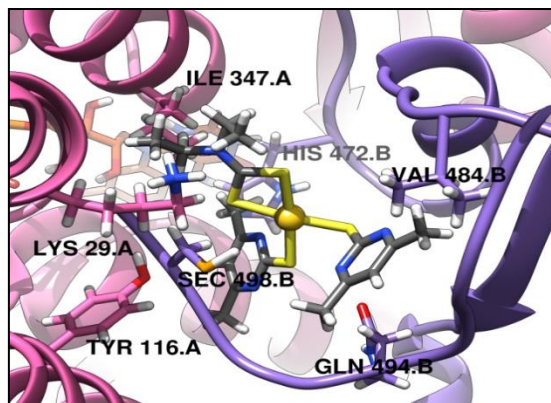


Figure 10. Top ranked interaction models for complexes **8** and TrxR1 as representative example. Complex and key residues are shown as sticks, with gold atoms being displayed as golden spheres, while the protein is shown as a pink (subunit A) and a violet (subunit B) ribbon. Nitrogen, sulfur, oxygen, selenium and hydrogen atoms are colored blue, yellow, red, orange and white respectively, while carbon atoms are colored grey or as the subunit they belong to.

This value indicates that this process is feasible at room temperature although it is a slow reaction, according to the transition state theory. As expected for an Au(III) complex, the obtained Au-Se complex **B** is exergonic (-8.5 kcal/mol) and, therefore, thermodynamically favorable. The reverse reaction, from **B** to **A**, presents an excessively high activation barrier for the experimental conditions (27.1 kcal/mol). Then, the chemical reaction from **A** to **B** can be considered as an irreversible process.

The difference in inhibitory activity can thus be linked to both the docking of the drug in the enzyme, which favors certain conformations through non-covalent interactions, and the specific mechanistic features of the Se-Au interaction.

Since computational studies reinforced the possibility of our complexes interacting with TrxR, we determined the thioredoxin reductase activity of human purified TrxR1 after 30 min exposure to the gold derivatives. All compounds showed the ability to inhibit purified TrxR1 (Figure S20) triggering a 1.33-fold (complex **9**), 4-fold (complex **8**) and 3.2-fold (complex **4**) decrease in the enzyme activity.

Therefore, experimental and computational results are in agreement with the inhibition of the TrxR activity due to the presence of gold-enzyme interactions. Consequently, its inhibition would have an impact on the production of oxidative species, inasmuch the thioredoxin system helps to keep the redox balance inside the cells. Since H₂O₂ scavenging is one of the main antioxidant functions for TrxR [100], we performed a fluorometric assay (by using 2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate, DCFH-DA, which is hydrolyzed by H₂O₂ to 2,7-dichlorofluorescein, DCF, inside the cells) to quantify H₂O₂ intracellular levels in Caco-2/TC7 cells upon treatment with the IC₅₀ and twice IC₅₀ concentrations of complexes **4**, **8** and **9**. There is only a slight increase in the cellular ROS levels after 1 h of incubation, which remained practically unaltered after 3 h of incubation (Figure S21).

In order to explain these contradictory results, we determined the interaction with reductase systems in the cells using a colorimetric assay. The experiment, based on the reduction of 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic) acid (DTNB) to thio-2-nitrobenzoic acid (TNB) allows the determination of the inhibition of thiol reductase activity in Caco-2/TC7 cell lysates after 24 h of incubation with the complexes (Figure 11).

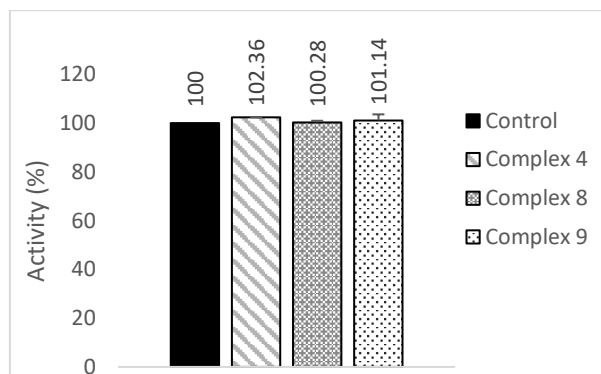


Figure 11. Determination of thiol-reductase activity of Caco-2/TC7 lysates after 24 h incubation with the complexes (complex 4 (1.18 μ M), complex 8 (1 μ M) and complex 9 (5 μ M)). Activity was measured by monitoring DTNB reduction and the results are expressed in terms of % of activity with respect to control.

Figure 11 displays no variation in the thiol reductase activity in cells treated with any of the three complexes, which is in agreement with the results observed in ROS levels. Glutathione reductase and thioredoxin reductase systems, both with cysteine active sites, are able to maintain redox balance inside cells, and their activity depends on the presence of a reduced sulfhydryl group. DTNB is not selective to TrxR, but the presence of any variation in the thiol reductase activity points to the absence of any interaction of our complexes with thiol containing enzymes, among which TrxR is included.

Although all complexes were able to inhibit purified TrxR (Figure S20), they showed a lack of interaction with its intracellular analogue (Figure 11). It is remarkable that the concentrations of these complexes used to inhibit TrxR is higher than common values for other gold(III) and gold(I) inhibitors [91,101,102]. Consequently, it is expected that this will not be the likely target in cells, where other possible targets are present. Gold derivatives can interact with different targets inside the cells and therefore some competition can occur from their action. As stated above previous studies have pointed at proteasome as a common target for different dithiocarbamate-based coordination gold compounds [18,22,23,103]. Accordingly, we have analyzed proteasome inhibition by some of these new derivatives.

IV.1.3.8. Interaction with the proteasome

The ubiquitin/proteasome system (UPS) is a complex molecular machinery which constitute the main proteolytic pathway in eukaryotic cells. The UPS is involved in regulation of basic biological processes such as cell growth, proliferation, cell cycle and apoptosis [104], and dysregulation of these processes causes malignant transformation. Therefore, several cancer cells have dysfunctional UPS with increased proteasome activity [105,106] and diverse studies have

demonstrated that proteasome inhibition in tumor cells may lead to accumulation of inhibitors of cyclin-dependent kinases, pro-apoptotic and tumor suppressor proteins, hence inducing cell cycle arrest and apoptosis [107]. To analyze whether the complexes [Au(SMepyrin)₂(S₂CNMe₂)] (**4**), [Au(SMe₂pyrim)₂(S₂CNEt₂)] (**8**) and [Au(SMe₂pyrim)₂(S₂CNBz₂)] (**9**) were able to interact with the proteasome, hence inhibiting its activity, we performed a fluorometric assay. We used Suc-LLVY-AMC, a fluorogenic substrate of the proteasome β5 subunit. Therefore, fluorescence levels correspond to the proteasomal chymotrypsin-like activity (CT-L activity). It has been previously demonstrated that inhibition of the CT-like activity is connected with the induction of cancer cells apoptosis programs [108]. We observed a decrease in Caco-2/TC7 proteasomal CT-L activity after 24 h treatment with either the three complexes (Figure 12).

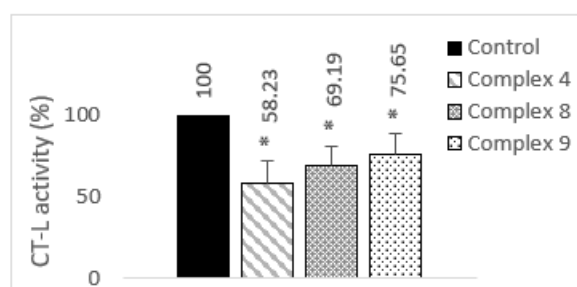


Figure 12. Determination of proteasomal chymotrypsin-like activity inhibition. Colon cancer Caco-2/TC7 cells were treated with complexes **4** (1.18 μM) **8** (1 μM) and **9** (5 μM) for 24 h. CT-L activity was determined by measuring fluorescence after cleavage of N-Suc-L-L-V-T-AMC and the results are expressed in terms of % of activity with respect to control. Activity *p<0.05 compared to control.

On the other hand, the proteasome inhibition by MG132 (Carbobenzoxy-L-leucyl-L-leucyl-L-leucinal) did not show any significant effect on TrxR activity in the cells, which could indicate that this enzyme is not the cellular target of these complexes (data not shown), enhancing the hypothesis that, although a Se-Au interaction exists in vitro, our complexes do not bind TrxR in the cell environment and inhibition of proteasome could be the reason of their cytotoxic effect.

The normal progression of cell cycle is the result of a regulated interaction between cyclins and cyclins dependent kinases (CDKs). The disruption of this regulation contributes to tumor developments, since cells go into uncontrolled proliferation [109]. Different proteins involved in cell cycle progression are degraded by UPS system [110], suggesting that proteasome inhibition may induce cell cycle arrest. Complexes **4** and **8** induced cell cycle arrest in G₁ phase after 24 h incubation (Figure 13), whereas cells treated with complex **9** showed no significant changes, which is in accordance with its lowest CT-like activity inhibition (Figure 12). Determination of cell cycle status by flow cytometry confirmed proteasome as a possible target of our complexes.

In this way, p27^{Kip1} is a cyclin-dependent kinase inhibitor (CKI) which arrest cell cycle in G₁ phase, negatively regulating cell-cycle progression. In the nucleus, p27^{Kip1} binds cyclin E/Cdk2 complex, preventing this complex from activating the transcription of different genes involved in G₁-S transition [111]. Tumor suppressor function of p27 can reverse in case of its degradation by UPS in the nucleus [112], which dysregulate cell cycle, inducing cell proliferation [113]. In addition, nuclear p27^{Kip1} binding to cyclin E/Cdk2 complex is mediated by NF-κB, which binds the complex

preventing the interaction with the CKI [114]. NF- κ B signaling is regulated by UPS, since inhibitory κ B (I κ B) is ubiquitinated and proteolyzed by the proteasome, allowing NF- κ B to enter the nucleus [115]. In conclusion, proteasome inhibition will prevent nuclear p27^{Kip1} loss, thus inducing cell cycle arrest in G₀/G₁ phase [25], which correlates with results shown in Figure 12 and Figure 13.

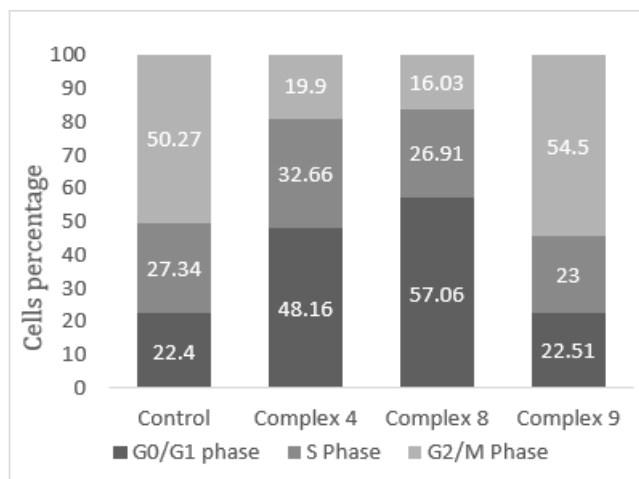
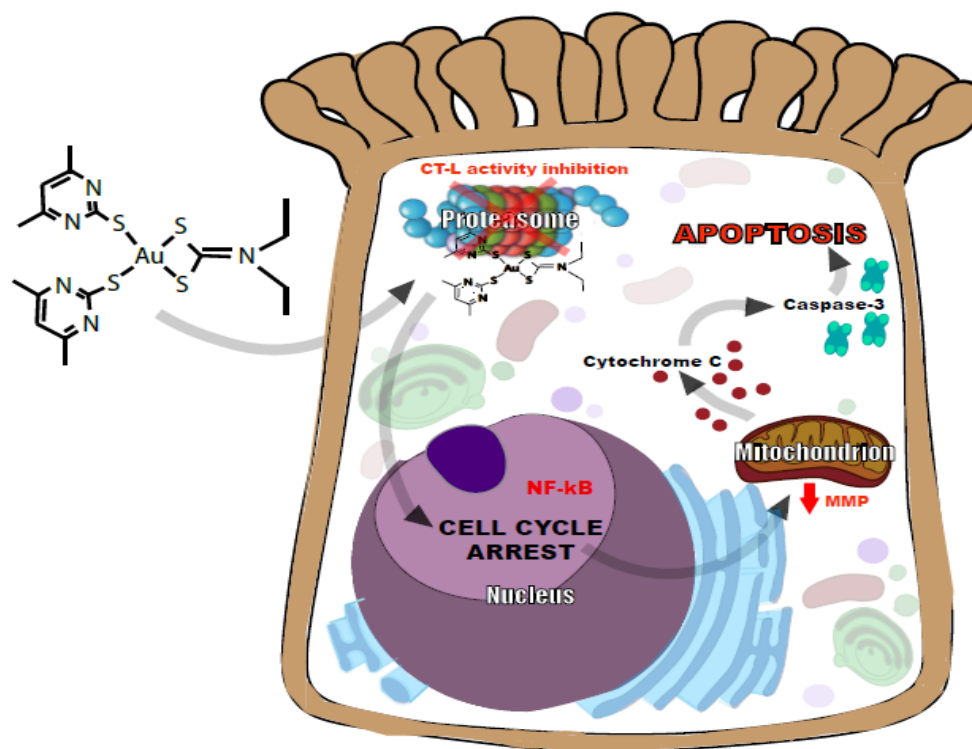


Figure 13. Cell cycle analyses by flow cytometry. Cancer Caco-2/TC7 cells were incubated with complexes [Au(SMepyrin)₂(S₂CNMe₂)] (**4**) (1.18 μ M), [Au(Sme₂pyrim)₂(S₂CNEt₂)] (**8**) (1 μ M) and [Au(Sme₂pyrim)₂(S₂CNBz₂)] (**9**) (5 μ M) for 24 h. Cells were stained with PI and fluorescence was determined by flow cytometry. The results are expressed in terms of % of cells in each phase of the cell cycle.

IV.1.4. Conclusions

In this study we report the synthesis of new mixed thiolate-dithiocarbamate gold(III) derivatives via transmetalation reactions with tin(IV) complexes. These new derivatives display high antiproliferative effect on colon cancer cells and reduce cell viability mainly by intrinsic apoptotic pathway since they produce modification of mitochondrial membrane potential, release of cytochrome c to the cytoplasm and caspase 3 activation. Likewise, the proteasome could be the cellular target of these complexes, which is supported by our experiments. Moreover, this fact would explain the cell cycle arrest in G₁ phase, since different proteins related with cell cycle progression and regulation need to be degraded by UPS system before exerting their function. On the other hand, although TrxR was studied as a potential target for our complexes, different experiments in cells rejected this hypothesis, since ROS levels and TrxR activity seemed to be maintained unaltered. Although cytotoxicity is scarcely affected by the different thiolates in the structure, the substituents in the dithiocarbamate unit exert a greater influence, being ethyl group the most active. In addition, higher cytotoxicity is exerted by the complexes in comparison to the free ligands, which is in accordance with the relevance of the metal presence. Some of these complexes have proved to be selective towards normal enterocytes, displaying viabilities around 100% in Caco-2 cells under confluence, as well as higher IC₅₀ values towards other differentiated cells (Hep G-2) than in tumor cell lines (Caco-2/TC7 and MCF-7). We have found that their interaction with BSA led to moderate binding constants, which suggests their

transportation by the protein through blood and easy target release. In addition, their stability under physiological conditions even towards biological relevant reducing agents, such as sodium ascorbate makes them suitable candidates for drug development in colorectal cancer treatment.



Graphical Abstract

REFERENCES:

1. Haas, K.L.; Franz, K.J. Application of Metal Coordination Chemistry To Explore and Manipulate Cell Biology. *Chem. Rev* **2009**, *109*, 4921-4960, doi:10.1021/cr900134a.
2. Frezza, M.; Hindo, S.; Chen, D.; Davenport, A.; Schmitt, S.; Tomco, D.; Dou, Q.P. Novel Metals and Metal Complexes as Platforms for Cancer Therapy. *Curr. Pharm. Des.* **2010**, *16*, 1813-1825.
3. Dorr, R.T. A review of the modulation of cisplatin toxicities by chemoprotectants. In *Platinum And Other Metal Coordination Compounds In Cancer Chemotherapy 2*, Pinedo, H.M., Schomagel, J.H., Eds.; Plenum Press: New York, 1996; pp. 131-154.
4. Segovia, N.; Crovetto, G.; Lardelli, P.; Espigares, M. In vitro toxicity of several dithiocarbamates and structure-activity relationships. *J. Appl. Toxicol.* **2002**, *22*, 353-357, doi:10.1002/jat.868.
5. Nardon, C.; Brustolin, L.; Fregona, D. Is matching ruthenium with dithiocarbamate ligands a potent chemotherapeutic weapon in oncology? *Future Med. Chem.* **2016**, *8*, 211-226, doi:10.4155/fmc.15.175.
6. Skrott, Z.; Cvek, B. Diethyldithiocarbamate complex with copper: the mechanism of action in cancer cells. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* **2012**, *12*, 1184-1192.
7. Nagy, E.M.; Ronconi, L.; Nardon, C.; Fregona, D. Noble metal-dithiocarbamates precious allies in the fight against cancer. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* **2012**, *12*, 1216-1229.
8. Hogarth, G. Metal-dithiocarbamate complexes: chemistry and biological activity. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* **2012**, *12*, 1202-1215.
9. Buac, D.; Schmitt, S.; Ventro, G.; Kona, F.R.; Dou, Q.P. Dithiocarbamate-based coordination compounds as potent proteasome inhibitors in human cancer cells. *Mini-Rev Med Chem* **2012**, *12*, 1193-1201, doi:Doi 10.2174/138955712802762040.
10. 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*, 1649-1660, doi:10.1016/j.ccr.2009.01.032.
11. Ronconi, L.; Fregona, D. The Midas touch in cancer chemotherapy: from platinum- to gold-dithiocarbamate complexes. *Dalton Trans.* **2009**, 10670-10680.
12. Tiekink, E.R.T. Tin dithiocarbamates: applications and structures. *Applied Organometallic Chemistry* **2008**, *22*, 533-550, doi:10.1002/aoc.1441.
13. Milacic, V.; Fregona, D.; Dou, Q.P. Gold complexes as prospective metal-based anticancer drugs. *Histology and Histopathology* **2008**, *23*, 101-108.
14. Nardon, C.; Fregona, D. Gold(III) Complexes in the Oncological Preclinical Arena: From Aminoderivatives to Peptidomimetics. *Curr. Top. Med. Chem.* **2016**, *16*, 360-380, doi:10.2174/1568026615666150827094500.
15. Ronconi, L.; Marzano, C.; Zanella, P.; Corsini, M.; Miolo, G.; Macca, 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*, 1648-1657.
16. Milacic, V.; Fregona, D.; Dou, Q.P. Gold complexes as prospective metal-based anticancer drugs. *Histol. Histopathol.* **2008**, *23*, 101-108.
17. Boscutti, G.; Nardon, C.; Marchio, L.; Crisma, M.; Biondi, B.; Dalzoppo, D.; Dalla Via, L.; Formaggio, F.; Casini, A.; Fregona, D. Anticancer Gold(III) Peptidomimetics: From Synthesis to in vitro and ex vivo Biological Evaluations. *ChemMedChem* **2018**, *13*, 1131-1145, doi:10.1002/cmcd.201800098.
18. Milacic, V.; Chen, D.; Ronconi, L.; Landis-Piwowar, K.R.; Fregona, D.; Dou, Q.P. A novel anticancer gold(III) dithiocarbamate compound inhibits the activity of a purified 20S proteasome and 26S proteasome in human breast cancer cell cultures and xenografts. *Cancer Res.* **2006**, *66*, 10478-10486, doi:10.1158/0008-5472.can-06-3017.

19. McKeage, M.J.; Maharaj, L.; Berners-Price, S.J. Mechanisms of cytotoxicity and antitumor activity of gold(I) phosphine complexes: the possible role of mitochondria. *Coord. Chem. Rev.* **2002**, *232*, 127-135.
20. Bindoli, A.; Rigobello, M.P.; Scutari, G.; Gabbiani, C.; Casini, A.; Messori, L. Thioredoxin reductase: A target for gold compounds acting as potential anticancer drugs. *Coord. Chem. Rev.* **2009**, *253*, 1692-1707.
21. Huang, H.B.; Liao, Y.N.; Liu, N.N.; Hua, X.L.; Cai, J.Y.; Yang, C.S.; Long, H.D.; Zhao, C.; Chen, X.; Lan, X.Y.; et al. Two clinical drugs deubiquitinase inhibitor auranofin and aldehyde dehydrogenase inhibitor disulfiram trigger synergistic anti-tumor effects in vitro and in vivo. *Oncotarget* **2016**, *7*, 2796-2808, doi:10.18632/oncotarget.6425.
22. Zhang, X.; Frezza, M.; Milacic, V.; Ronconi, L.; Fan, Y.H.; Bi, C.F.; 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*, 162.
23. 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, doi:10.1016/j.ejmech.2017.06.013.
24. Almond, J.B.; Cohen, G.M. The proteasome: a novel target for cancer chemotherapy. *Leukemia* **2002**, *16*, 433-443, doi:10.1038/sj.leu.2402417.
25. An, B.; Goldfarb, R.H.; Siman, R.; Dou, Q.P. Novel dipeptidyl proteasome inhibitors overcome Bcl-2 protective function and selectively accumulate the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 and induce apoptosis in transformed, but not normal, human fibroblasts. *Cell Death Differ.* **1998**, *5*, 1062-1075, doi:10.1038/sj.cdd.4400436.
26. Adams, J. Potential for proteasome inhibition in the treatment of cancer. *Drug Discov. Today* **2003**, *8*, 307-315, doi:10.1016/s1359-6446(03)02647-3.
27. Atrian-Blasco, E.; Gascon, S.; Rodriguez-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*, 8562-8579, doi:10.1021/acs.inorgchem.7b01370.
28. Garcia-Moreno, E.; Tomas, A.; Atrian-Blasco, E.; Gascon, S.; Romanos, E.; Jesus Rodriguez-Yoldi, M.; Cerrada, E.; Laguna, M. In vitro and in vivo evaluation of organometallic gold(I) derivatives as anticancer agents. *Dalton Trans.* **2016**, *45*, 2462-2475, doi:10.1039/c5dt01802a.
29. Atrián-Blasco, E.; Gascón, S.; Rodríguez-Yoldi, M.J.; Laguna, M.; Cerrada, E. Synthesis of Gold(I) Derivatives Bearing Alkylated 1,3,5-Triaza-7-phosphaadamantane as Selective Anticancer Metallodrugs. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2016**, 2791-2803.
30. García-Moreno, E.; Gascón, S.; Jalón, J.A.G.d.; Romanos, E.; Rodriguez-Yoldi, M.J.; Cerrada, E.; Laguna, M. In vivo anticancer activity, toxicology and histopathological studies of the thiolate gold(I) complex [Au(Spyrimidine)(PTA-CH₂Ph)]Br. *Anti-Cancer Agents Med. Chem.* **2015**, *15*, 773-782.
31. Garcia-Moreno, E.; Gascon, S.; Atrian-Blasco, E.; Rodriguez-Yoldi, M.J.; Cerrada, E.; Laguna, M. Gold(I) complexes with alkylated PTA (1,3,5-triaza-7-phosphaadamantane) phosphanes as anticancer metallodrugs. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, *79*, 164-172, doi:10.1016/j.ejmech.2014.04.001.
32. García-Moreno, E.; Cerrada, E.; Bolsa, M.J.; A. Luquin; Laguna, M. Water-Soluble Phosphanes Derived from 1,3,5-Triaza-7-phosphaadamantane and Their Reactivity towards Gold(I) Complexes. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2013**, 2020-2030.
33. 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. *Dalton Trans.* **2011**, *40*, 10927-10935.

34. Ronconi, L.; Giovagnini, L.; Marzano, C.; Bettio, F.; Graziani, R.; Pilloni, G.; Fregona, D. Gold dithiocarbamate derivatives as potential antineoplastic agents: Design, spectroscopic properties, and in vitro antitumor activity. *Inorg. Chem.* **2005**, *44*, 1867-1881.
35. M. N. Xanthopoulou; S. K. Hadjikakou; N. Hadjiliadis; M. Kubicki; S. Skoulika; T. Bakas; M. Baril; Butler, I.S. *Inorg. Chem.* **2007**, 1187-1195.
36. E. Martin; C. Spendley; A. J. Mountford; S. J. Coles; P. N. Horton; D. L. Hughes; M. B. Hursthouse; S. J. Lancaster. *Organometallics* **2008**, *27*, 1436-1446.
37. CysAlisPro *Multiscan absorption correction with SCALE3 ABSPACK scaling algorithm*, 1.171.35.11; Agilent Technologies.
38. Sheldrick, G.M. A short history of SHELX. *Acta Crystallogr. A* **2008**, *64*, 112-122, doi:S0108767307043930.
39. Mote, U.S.; Bhattar, S.L.; Patil, S.R.; Kolekar, G.B. Interaction between felodipine and bovine serum albumin: fluorescence quenching study. *Luminescence* **2010**, *25*, 1-8, doi:10.1002/bio.1130.
40. Wang, C.X.; Yan, F.F.; Zhang, Y.X.; Ye, L. Spectroscopic investigation of the interaction between rifabutin and bovine serum albumin. *J. Photochem. Photobio. A* **2007**, *192*, 23-28, doi:10.1016/j.jphotochem.2007.04.032.
41. van Meerloo, J.; Kaspers, G.J.; Cloos, J. Cell sensitivity assays: the MTT assay. *Methods Mol. Biol.* **2011**, *731*, 237-245, doi:10.1007/978-1-61779-080-5_20.
42. Sanchez-de-Diego, C.; Marmol, I.; Perez, R.; Gascon, S.; Rodriguez-Yoldi, M.J.; Cerrada, E. The anticancer effect related to disturbances in redox balance on Caco-2 cells caused by an alkynyl gold(I) complex. *J Inorg Biochem* **2017**, *166*, 108-121, doi:10.1016/j.jinorgbio.2016.11.009.
43. 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* **2013**, *61*, 138-145, doi:10.1016/j.ymeth.2013.03.020.
44. Ruiz-Leal, M.; George, S. An in vitro procedure for evaluation of early stage oxidative stress in an established fish cell line applied to investigation of PHAH and pesticide toxicity. *Mar. Environ. Res.* **2004**, *58*, 631-635, doi:10.1016/j.marenvres.2004.03.054.
45. Jones, G.; Willett, P.; Glen, R.C.; Leach, A.R.; Taylor, R. Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking. *J. Mol. Biol.* **1997**, *267*, 727-748, doi:S0022-2836(96)90897-9 [pii]10.1006/jmbi.1996.0897.
46. Cheng, Q.; Sandalova, T.; Lindqvist, Y.; Arner, E.S. Crystal structure and catalysis of the selenoprotein thioredoxin reductase 1. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 3998-4008, doi:M807068200 [pii]10.1074/jbc.M807068200.
47. Olsson, M.H.; Sondergaard, C.R.; Rostkowski, M.; Jensen, J.H. PROPKA3: Consistent Treatment of Internal and Surface Residues in Empirical pKa Predictions. *J. Chem. Theory Comput.* **7**, 525-537, doi:10.1021/ct100578z.
48. Fritz-Wolf, K.; Urig, S.; Becker, K. The structure of human thioredoxin reductase 1 provides insights into C-terminal rearrangements during catalysis. *J. Mol. Biol.* **2007**, *370*, 116-127, doi:S0022-2836(07)00535-9 [pii]10.1016/j.jmb.2007.04.044.
49. Lee, C.; Yang, W.; Parr, R.G. Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density. *Phys Rev B Condens Matter* **1988**, *37*, 785-789.
50. Grimme, S.; Antony, J.; Ehrlich, S.; Krieg, H. A consistent and accurate ab initio parametrization of density functional dispersion correction (DFT-D) for the 94 elements H-Pu. *J. Chem. Phys.* **132**, 154104, doi:10.1063/1.3382344.
51. Weigend, F.; Ahlrichs, R. Balanced basis sets of split valence, triple zeta valence and quadruple zeta valence quality for H to Rn: Design and assessment of accuracy. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2005**, *7*, 3297-3305, doi:10.1039/b508541a.

52. Tomasi, J.; Mennucci, B.; Cammi, R. Quantum mechanical continuum solvation models. *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 2999-3093, doi:10.1021/cr9904009.
53. Becke, A.D. A new mixing of Hartree-Fock and local density-functional theories. *The Journal of Chemical Physics* **1993**, *98*, 1372-1377.
54. Becke, A.D. Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange. *The Journal of Chemical Physics* **1993**, *98*, 5648-5652.
55. Johnson, E.R.; Becke, A.D. A post-Hartree-Fock model of intermolecular interactions. *J. Chem. Phys.* **2005**, *123*, 24101, doi:10.1063/1.1949201.
56. Pettersen, E.F.; Goddard, T.D.; Huang, C.C.; Couch, G.S.; Greenblatt, D.M.; Meng, E.C.; Ferrin, T.E. UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.* **2004**, *25*, 1605-1612, doi:10.1002/jcc.20084.
57. Cerrada, E.; Fernandez, E.J.; Gimeno, M.C.; Laguna, A.; Laguna, M.; Terroba, R.; Villacampa, M.D. synthesis of dithiolate gold(III) complexes by dithiolate transfer-reactions - x-ray structure of Au(C₆F₅)(S₂C₆H₄)(PPh₃). *J. Organomet. Chem.* **1995**, *492*, 105-110, doi:10.1016/0022-328x(95)05291-v.
58. Cerrada, E.; Fernandez, E.J.; Jones, P.G.; Laguna, A.; Laguna, M.; Terroba, R. Synthesis and reactivity of trinuclear gold(III) dithiolate complexes - x-ray structure of Au(C₆F₅)(S₂C₆H₄)₃ AND uU(C₆F₅)(S₂C₆H₄)(SC(6)H(4)SPPH(3)). *Organometallics* **1995**, *14*, 5537-5543, doi:10.1021/om00012a021.
59. Cerrada, E.; Laguna, M.; Sorolla, P.A. Gold complexes with 2-selenoxo-1,3-dithiole-4,5-dithiolato. *Polyhedron* **1998**, *17*, 295-298, doi:10.1016/s0277-5387(97)00302-1.
60. Xanthopoulou, M.N.; Hadjikakou, S.K.; Hadjiliadis, N.; Kubicki, M.; Skoulika, S.; Bakas, T.; Baril, M.; Butler, I.S. Synthesis, structural characterization, and biological studies of six- and five-coordinate organotin(IV) complexes with the thioamides 2-mercaptobenzothiazole, 5-chloro-2-mercaptobenzothiazole, and 2-mercaptobenzoxazole. *Inorg. Chem.* **2007**, *46*, 1187-1195, doi:10.1021/ic061601f.
61. Brown, D.A.; Glass, W.K.; Burke, M.A. General use of ir spectral criteria in discussions of bonding and structure of metal dithiocarbamates. *Spectrochim. Acta* **1976**, *32*, 137-143, doi:10.1016/0584-8539(76)80059-1.
62. Durgaprasad, G.; Sathyanarayana, D.N.; Patel, C.C. Normal coordinate analysis of dialkyldithiocarbamate and its selenium analogue. *Can. J. Chem.* **1969**, *47*, 631-+, doi:10.1139/v69-097.
63. Bonati, F.; Ugo, R. Organotin(4) n,n-disubstituted dithiocarbamates. *J. Organomet. Chem.* **1967**, *10*, 257-&, doi:10.1016/s0022-328x(00)93085-7.
64. Murray, H.H.; Garzon, G.; Raptis, R.G.; Mazany, A.M.; Porter, L.C.; Fackler, J.P. Sulfur-containing gold(III) chelates and their use in heterovalent dimer synthesis: crystal structures of Au^{III}[CH₂P(S)Ph₂]₂Br, [Au^{III}[S₂P(OH)Ph]₂]Cl, and Au^{III}[CH₂P(S)Ph₂][S₂CN(Et)₂]₂. *Inorg. Chem.* **1988**, *27*, 836-842, doi:10.1021/ic00278a018.
65. Parish, R.V.; Howe, B.P.; Wright, J.P.; Mack, J.; Pritchard, R.G.; Buckley, R.G.; Elsome, A.M.; Fricker, S.P. Chemical and Biological Studies of Dichloro(2-((dimethylamino)methyl)phenyl)gold(III). *Inorg. Chem.* **1996**, *35*, 1659-1666, doi:10.1021/ic950343b.
66. Noordik, J.H. *Cryst. Struct. Commun* **1973**, *2*.
67. Noordik, J.H.; Hummelink, T.W.; Van Der Linden, J.G.M. Structure and properties of n,ndi-n-butylthiocarbamate-1, 2-dicyanoethene-1, 2-dithiolato-gold(III). *J. Coord. Chem.* **1973**, *2*, 185-191, doi:10.1080/00958977308072970.
68. Vogler, A.; Kunkely, H. Photoreactivity of gold complexes. *Coord. Chem. Rev.* **2001**, *219-221*, 489-507, doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0010-8545\(01\)00348-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0010-8545(01)00348-4).
69. Smith, D.A.; Van de Waterbeemd, H.; Walker, D.K. Pharmacokinetics and metabolism in drug design. Wiley-VCH, Ed.; Weinheim, Germany, 2001.

70. Lakowicz, J.R. in *'Principles of fluorescence Spectroscopy'*; Springer: Baltimore, Maryland, USA, 2006; pp. 277-330.
71. Zheng, C.Z.; Wang, H.P.; Xu, W.; Xu, C.Y.; Liang, J.G.; Han, H.Y. Study on the interaction between histidine-capped Au nanoclusters and bovine serum albumin with spectroscopic techniques. *Spectrochim. Acta A* **2014**, *118*, 897-902, doi:10.1016/j.saa.2013.09.082.
72. Polet, H.; Steinhardt, J. Binding-induced alterations in ultraviolet absorption of native serum albumin. *Biochemistry* **1968**, *7*, 1348-1356, doi:10.1021/bi00844a015.
73. Veeralakshmi, S.; Nehru, S.; Arunachalam, S.; Kumar, P.; Govindaraju, M. Study of single and double chain surfactant-cobalt(III) complexes and their hydrophobicity, micelle formation, interaction with serum albumins and antibacterial activities. *Inorg. Chem. Front.* **2014**, *1*, 393-404, doi:10.1039/C4QI00018H.
74. Sanghvi, C.D.; Olsen, P.M.; Elix, C.; Peng, S.; Wang, D.S.; Chen, Z.; Shin, D.M.; Hardcastle, K.I.; MacBeth, C.E.; Eichler, J.F. Antitumor properties of five-coordinate gold(III) complexes bearing substituted polypyridyl ligands. *J. Inorg. Biochem.* **2013**, *128*, 68-76, doi:10.1016/j.jinorgbio.2013.07.014.
75. Gouvea, L.R.; Garcia, L.S.; Lachter, D.R.; Nunes, P.R.; Pereira, F.D.; Silveira-Lacerda, E.P.; Louro, S.R.W.; Barbeira, P.J.S.; Teixeira, L.R. Atypical fluoroquinolone gold(III) chelates as potential anticancer agents: Relevance of DNA and protein interactions for their mechanism of action. *Eur. J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 67-73, doi:10.1016/j.ejmech.2012.07.004.
76. Sambuy, Y.; De Angelis, I.; Ranaldi, G.; Scarino, M.L.; Stamatii, A.; Zucco, F. The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics. *Cell Biol Toxicol* **2005**, *21*, 1-26, doi:10.1007/s10565-005-0085-6.
77. Liévin-Le Moal, V.; Servin, A.L. Pathogenesis of Human Enterovirulent Bacteria: Lessons from Cultured, Fully Differentiated Human Colon Cancer Cell Lines. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2013**, *77*, 380-439, doi:10.1128/mmbr.00064-12.
78. Berggren, M.; Gallegos, A.; Gasdaska, J.R.; Gasdaska, P.Y.; Warneke, J.; Powis, G. Thioredoxin and thioredoxin reductase gene expression in human tumors and cell lines, and the effects of serum stimulation and hypoxia. *Anticancer Res.* **1996**, *16*, 3459-3466.
79. Choi, J.H.; Kim, T.N.; Kim, S.Y.; Baek, S.H.; Kim, J.H.; Lee, S.R.; Kim, J.R. Overexpression of mitochondrial thioredoxin reductase and peroxiredoxin III in hepatocellular carcinomas. *Anticancer Res.* **2002**, *22*, 3331-3335.
80. Selvaraju, K.; Mazurkiewicz, M.; Wang, X.; Gullbo, J.; Linder, S.; D'Arcy, P. Inhibition of proteasome deubiquitinase activity: a strategy to overcome resistance to conventional proteasome inhibitors? *Drug Resist. Update* **2015**, *21-22*, 20-29, doi:10.1016/j.drup.2015.06.001.
81. Meister, S.; Schubert, U.; Neubert, K.; Herrmann, K.; Burger, R.; Gramatzki, M.; Hahn, S.; Schreiber, S.; Wilhelm, S.; Herrmann, M.; et al. Extensive immunoglobulin production sensitizes myeloma cells for proteasome inhibition. *Cancer Res.* **2007**, *67*, 1783-1792, doi:10.1158/0008-5472.can-06-2258.
82. McIlwain, D.R.; Berger, T.; Mak, T.W. Caspase Functions in Cell Death and Disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2013**, *5*, 28, doi:10.1101/cshperspect.a008656.
83. Zeng, C.C.; Lai, S.H.; Yao, J.H.; Zhang, C.; Yin, H.; Li, W.; Han, B.J.; Liu, Y.J. The induction of apoptosis in HepG-2 cells by ruthenium(II) complexes through an intrinsic ROS-mediated mitochondrial dysfunction pathway. *Eur. J. Med. Chem.* **2016**, *122*, 118-126, doi:10.1016/j.ejmech.2016.06.020.
84. Ooi, K.K.; Yeo, C.I.; Ang, K.P.; Akim, A.M.; Cheah, Y.K.; Halim, S.N.; Seng, H.L.; Tiekink, E.R. Phosphane-gold(I) thiolates, Ph₃PAu[SC(OR)=NC 6H 4Me-4] for R = Me, Et and iPr, induce apoptosis, cell cycle arrest and inhibit cell invasion of HT-29 colon cancer cells

- through modulation of the nuclear factor-kappaB activation pathway and ubiquitination. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2015**, *20*, 855-873, doi:10.1007/s00775-015-1271-5.
85. 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*, 709-717, doi:10.1038/sj.cdd.4401231.
 86. Elmore, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol. Pathol.* **2007**, *35*, 495-516, doi:10.1080/01926230701320337.
 87. Che, C.M.; Sun, R.W.Y.; Yu, W.Y.; Ko, C.B.; Zhu, N.Y.; Sun, H.Z. Gold(III) porphyrins as a new class of anticancer drugs: cytotoxicity, DNA binding and induction of apoptosis in human cervix epitheloid cancer cells. *Chem. Commun.* **2003**, 1718-1719, doi:10.1039/b303294a.
 88. Zhang, Z.; Wang, H.Y.; Yan, M.C.; Wang, H.N.; Zhang, C.Y. Novel copper complexes as potential proteasome inhibitors for cancer treatment. *Mol. Med. Reports* **2017**, *15*, 3-11, doi:10.3892/mmr.2016.6022.
 89. Rigobello, M.P.; Messori, L.; Marcon, G.; Agostina Cinellu, M.; Bragadin, M.; Folda, A.; Scutari, G.; Bindoli, A. Gold complexes inhibit mitochondrial thioredoxin reductase: consequences on mitochondrial functions. *J. Inorg. Biochem.* **2004**, *98*, 1634-1641, doi:10.1016/j.jinorgbio.2004.04.020.
 90. Arner, E.S.J.; Holmgren, A. Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. *Eur. J. Biochem.* **2000**, *267*, 6102-6109, doi:10.1046/j.1432-1327.2000.01701.x.
 91. 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*, 96-102.
 92. Nordberg, J.; Arner, E.S. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic. Biol. Med.* **2001**, *31*, 1287-1312.
 93. Zhang, J.M.; Li, X.M.; Han, X.; Liu, R.J.; Fang, J.G. Targeting the Thioredoxin System for Cancer Therapy. *Trends Pharmacol. Sci.* **2017**, *38*, 794-808, doi:10.1016/j.tips.2017.06.001.
 94. Nguyen, P.; Awwad, R.T.; Smart, D.D.K.; Spitz, D.R.; Gius, D. Thioredoxin reductase as a novel molecular target for cancer therapy. *Cancer Lett.* **2006**, *236*, 164-174, doi:10.1016/j.canlet.2005.04.028.
 95. Shaik, N.; Martinez, A.; Augustin, I.; Giovinazzo, H.; Varela-Ramirez, A.; Sanau, M.; Aguilera, R.J.; Contel, M. Synthesis of apoptosis-inducing iminophosphorane organogold(III) complexes and study of their interactions with biomolecular targets. *Inorg. Chem.* **2009**, *48*, 1577-1587, doi:10.1021/ic801925k.
 96. Cattaruzza, L.; Fregona, D.; Mongiat, M.; Ronconi, L.; Fassina, A.; Colombatti, A.; Aldinucci, D. Antitumor activity of gold(III)-dithiocarbamate derivatives on prostate cancer cells and xenografts. *Int. J. Cancer* **2011**, *128*, 206-215, doi:10.1002/ijc.25311.
 97. Saggiaro, D.; Rigobello, M.P.; Paloschi, L.; Folda, A.; Moggach, S.A.; Parsons, S.; Ronconi, L.; Fregona, D.; Bindoli, A. Gold(III) - Dithiocarbamate complexes induce cancer cell death triggered by thioredoxin redox system inhibition and activation of ERK pathway. *Chem. Biol.* **2007**, *14*, 1128-1139.
 98. Fritz-Wolf, K.; Urig, S.; Becker, K. The structure of human thioredoxin reductase 1 provides insights into C-terminal rearrangements during catalysis. *J. Mol. Biol.* **2007**, *370*, 116-127, doi:10.1016/j.jmb.2007.04.044.
 99. Cheng, Q.; Sandalova, T.; Lindqvist, Y.; Arner, E.S.J. Crystal Structure and Catalysis of the Selenoprotein Thioredoxin Reductase 1. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 3998-4008, doi:10.1074/jbc.M807068200.

100. Lu, J.; Holmgren, A. The thioredoxin antioxidant system. *Free Radic. Biol. Med.* **2014**, *66*, 75-87, doi:10.1016/j.freeradbiomed.2013.07.036.
101. 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*, 1006-1015.
102. Gabbiani, C.; Mastrobuoni, G.; Sorrentino, F.; Dani, B.; Rigobello, M.P.; Bindoli, A.; Cinellu, M.A.; Pieraccini, G.; Messori, L.; Casini, A. Thioredoxin reductase, an emerging target for anticancer metallodrugs. Enzyme inhibition by cytotoxic gold(III) compounds studied with combined mass spectrometry and biochemical assays. *Med. Chem. Commun* **2011**, *2*, 50-54, doi:10.1039/c0md00181c.
103. Ronconi, L.; Aldinucci, D.; Dou, Q.P.; Fregona, D. Latest Insights into the Anticancer Activity of Gold(III)-Dithiocarbamate Complexes. *Anti-Cancer Agent Med. Chem.* **2010**, *10*, 283-292, doi:10.2174/187152010791162298.
104. Hershko, A.; Ciechanover, A. The ubiquitin system. *Annu. Rev. Biochem.* **1998**, *67*, 425-479, doi:10.1146/annurev.biochem.67.1.425.
105. Chen, L.; Madura, K. Increased proteasome activity, ubiquitin-conjugating enzymes, and eEF1A translation factor detected in breast cancer tissue. *Cancer Res.* **2005**, *65*, 5599-5606, doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-0201.
106. Arlt, A.; Bauer, I.; Schafmayer, C.; Tepel, J.; Muerkoster, S.S.; Brosch, M.; Roder, C.; Kalthoff, H.; Hampe, J.; Moyer, M.P.; et al. Increased proteasome subunit protein expression and proteasome activity in colon cancer relate to an enhanced activation of nuclear factor E2-related factor 2 (Nrf2). *Oncogene* **2009**, *28*, 3983-3996, doi:10.1038/onc.2009.264.
107. Milacic, V.; Banerjee, S.; Landis-Piowar, K.R.; Sarkar, F.H.; Majumdar, A.P.; Dou, Q.P. Curcumin inhibits the proteasome activity in human colon cancer cells in vitro and in vivo. *Cancer Res.* **2008**, *68*, 7283-7292, doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-6246.
108. Orłowski, R.Z.; Kuhn, D.J. Proteasome inhibitors in cancer therapy: Lessons from the first decade. *Clin. Cancer Res.* **2008**, *14*, 1649-1657, doi:10.1158/1078-0432.ccr-07-2218.
109. Vermeulen, K.; Van Bockstaele, D.R.; Berneman, Z.N. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif.* **2003**, *36*, 131-149.
110. Adams, J. The proteasome: structure, function, and role in the cell. *Cancer Treat. Rev.* **2003**, *29 Suppl 1*, 3-9.
111. Chu, I.M.; Hengst, L.; Slingerland, J.M. The Cdk inhibitor p27 in human cancer: prognostic potential and relevance to anticancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* **2008**, *8*, 253-267, doi:10.1038/nrc2347.
112. Pagano, M.; Tam, S.W.; Theodoras, A.M.; Beer-Romero, P.; Del Sal, G.; Chau, V.; Yew, P.R.; Draetta, G.F.; Rolfe, M. Role of the ubiquitin-proteasome pathway in regulating abundance of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27. *Science* **1995**, *269*, 682-685.
113. Wander, S.A.; Zhao, D.; Slingerland, J.M. p27: a barometer of signaling deregulation and potential predictor of response to targeted therapies. *Clin. Cancer Res.* **2011**, *17*, 12-18, doi:10.1158/1078-0432.CCR-10-0752.
114. Rastogi, N.; Mishra, D.P. Therapeutic targeting of cancer cell cycle using proteasome inhibitors. *Cell Div.* *7*, 26, doi:1747-1028-7-26 [pii]10.1186/1747-1028-7-26.
115. Chen, Z.J. Ubiquitin signalling in the NF-kappaB pathway. *Nat. Cell Biol.* **2005**, *7*, 758-765, doi:10.1038/ncb0805-758.

SUPPORTING INFORMATION:**Table S1.** Details of Data Collection and Structure Refinement for Complexes **7** and **9**.

Compound	7	9
Chemical Formula	C ₁₅ H ₂₀ AuN ₅ S ₄	C ₂₇ H ₂₈ AuN ₅ S ₄
Crystal habit	Orange-red prism	Orange-red plate
Crystal size/ mm	0.44 x 0.20 x 0.16	0.42 x 0.38 x 0.08
Crystal system	Monoclinic	Triclinic
Space group	P2(1)/n	P-1
<i>a</i> / Å	8.22094(19)	9.1403(18)
<i>b</i> / Å	14.1972(3)	11.902(2)
<i>c</i> / Å	16.9658(5)	13.718(3)
α / °	-	104.69(3)
β / °	89.926(2)	103.29(3)
γ / °	-	90.10(3)
<i>U</i> / Å ³	1980.14(9)	1402.0(5)
<i>Z</i>	4	2
<i>D_c</i> / Mg m ⁻³	1.998	1.771
<i>M</i>	595.57	747.75
<i>F</i> (000)	1152	736
<i>T</i> / °C	-173	-173
2 θ _{max} / °	51	51
μ (Mo-K α)/mm ⁻¹	7.860	5.571
Transmission	0.3661 and 0.1295	0.6642 and 0.2031
No. of refl. measured	8507	21323
No. of unique refl.	3593	5201
R int	0.0212	0.0336
R ^a (F>4 σ (F))	0.0271	0.0202
wR b(F ₂ , all refl.)	0.0664	0.0504
No. of refl. used	3593	5201
No. of parameters	232	338
No. of restraints	0	0
S c	1.039	1.059
Max./Min $\Delta\rho$ / eÅ ⁻³	3.903/ -0.589	1.655/-0.668

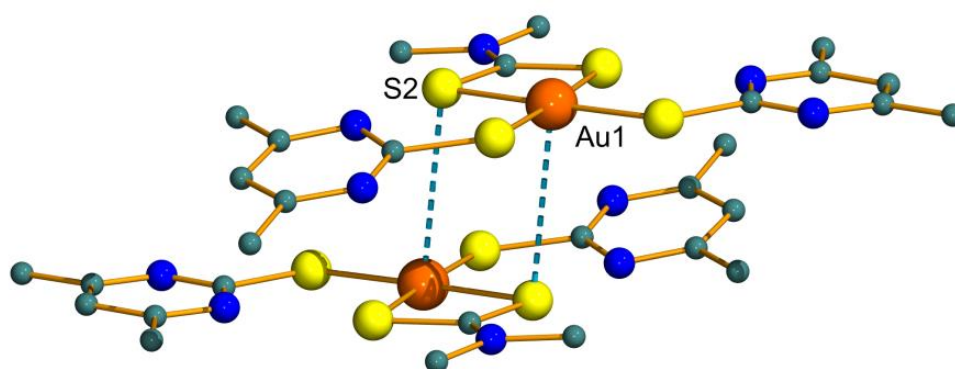
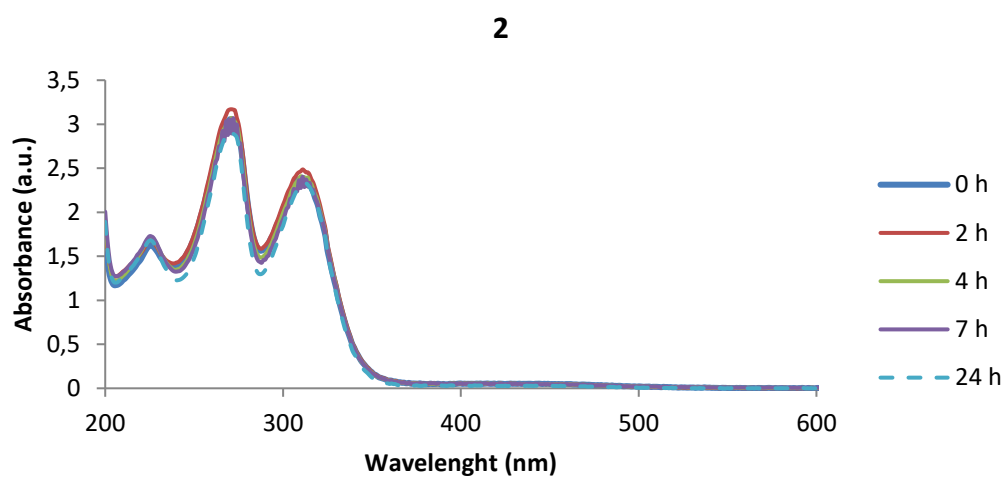
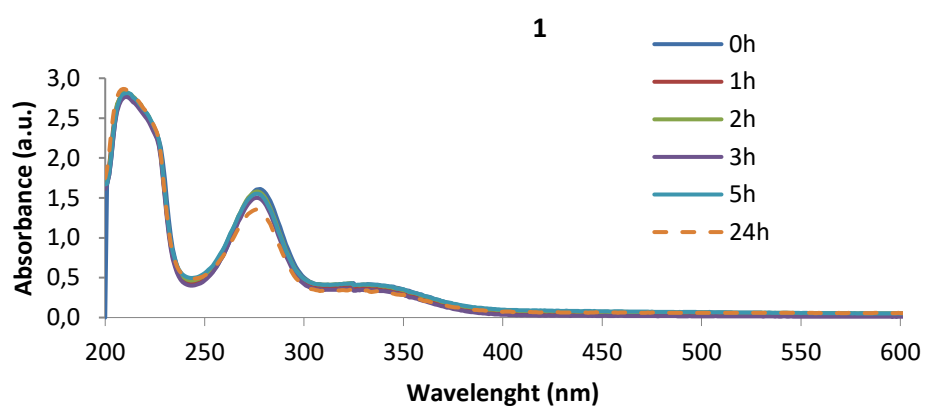
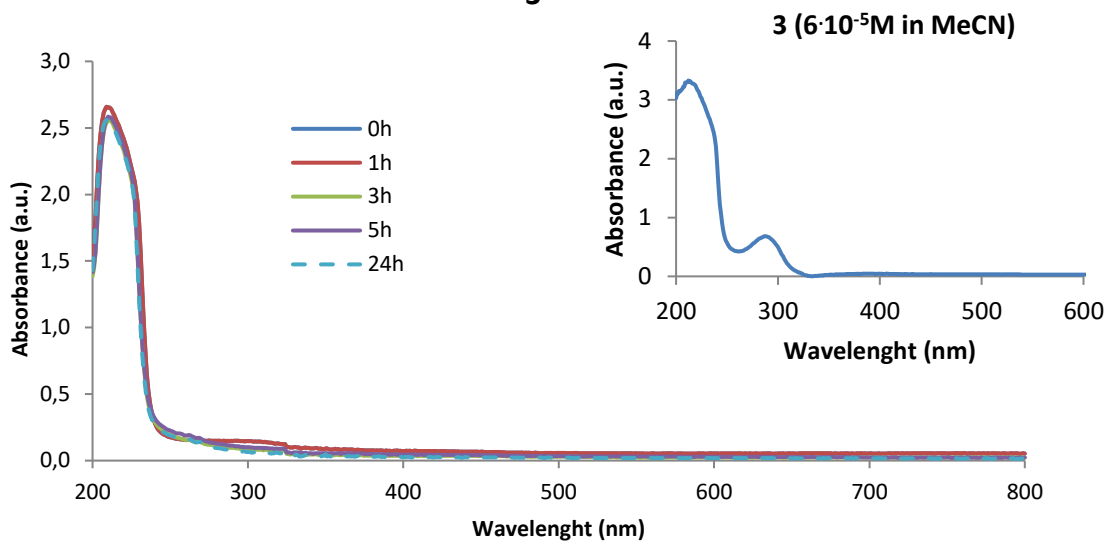


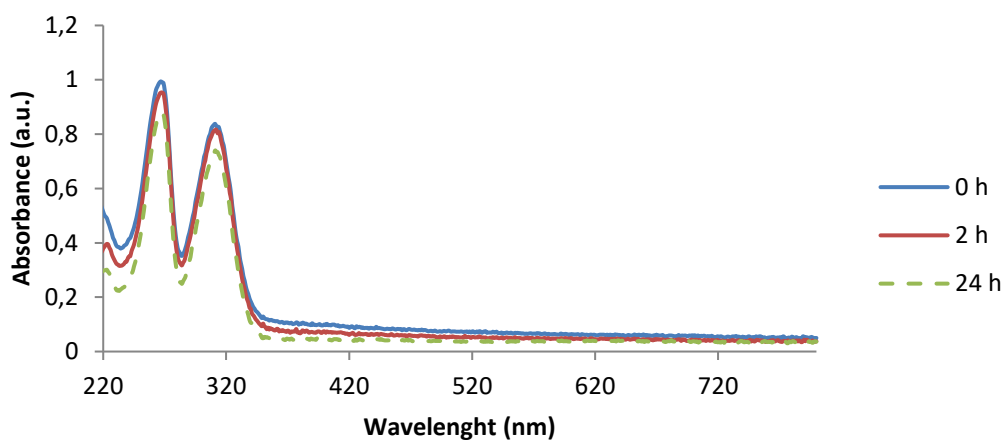
Figure S1. Association of molecules of complex 7 through Au...S contacts.



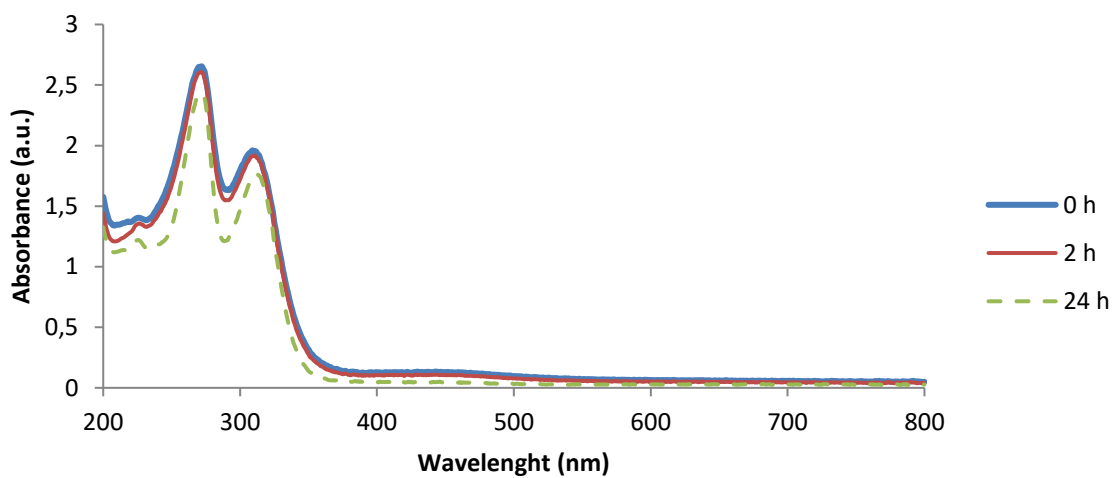
3



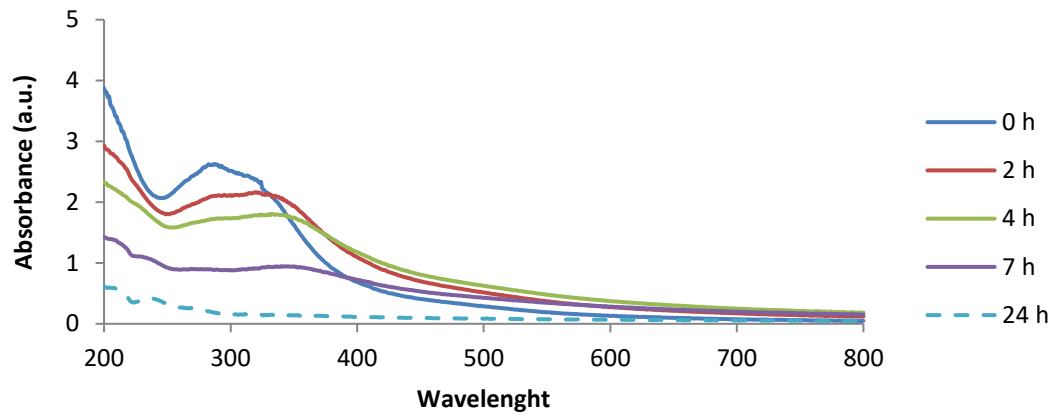
4



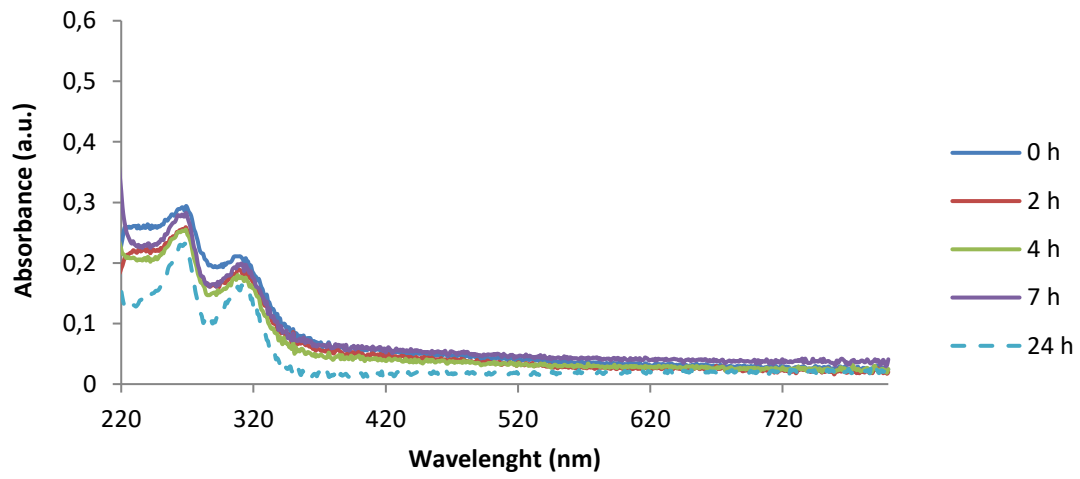
5



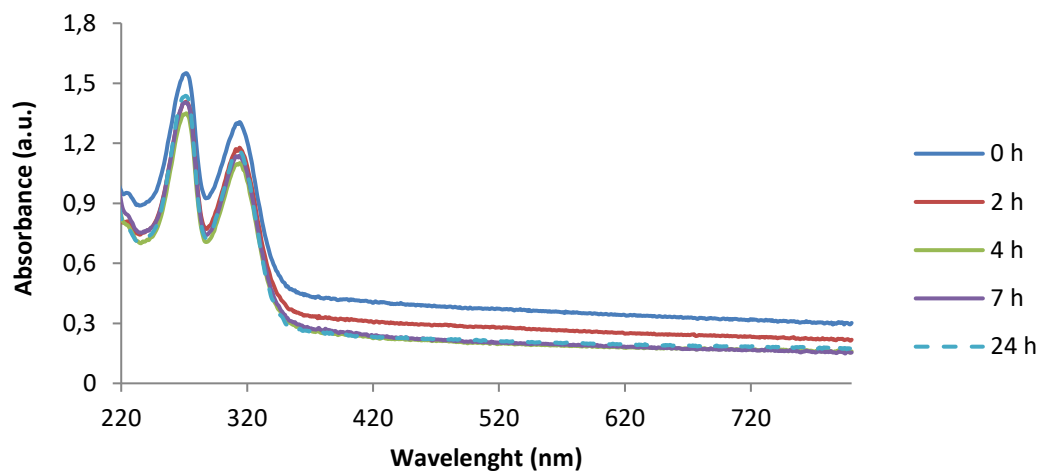
6



7



8



9

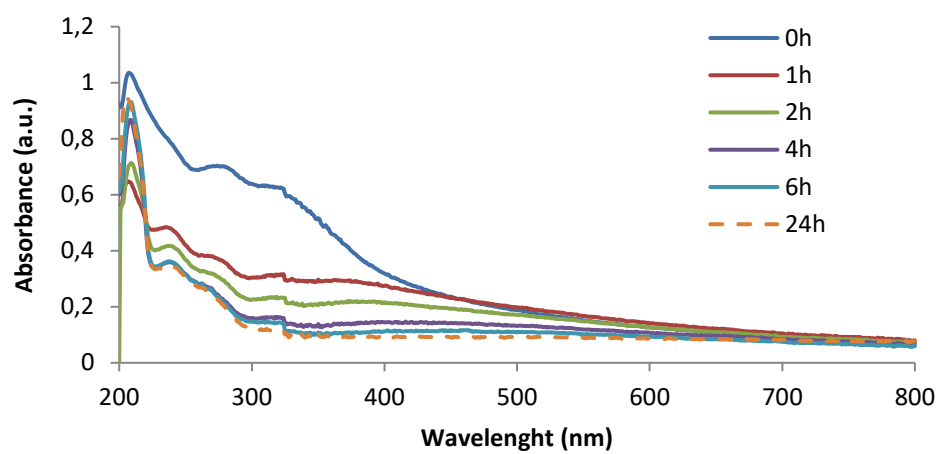
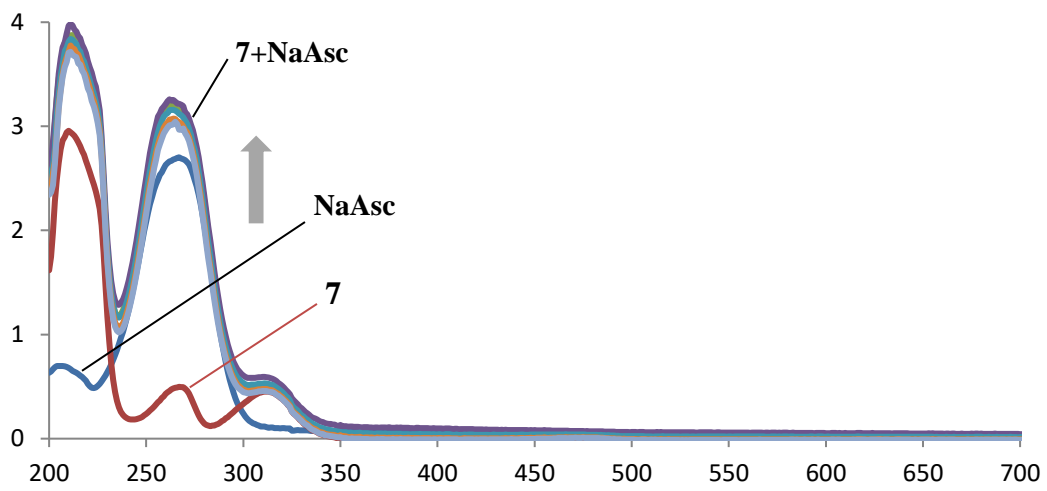
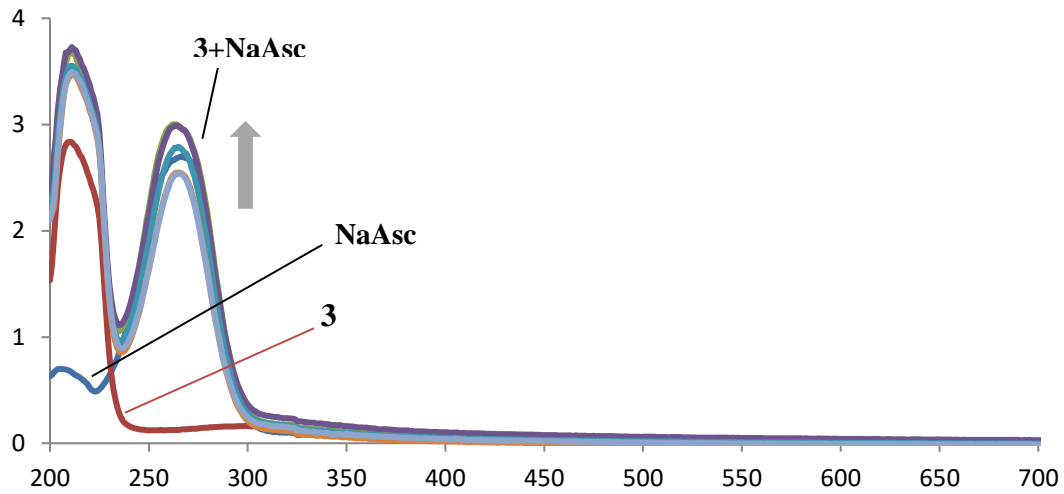
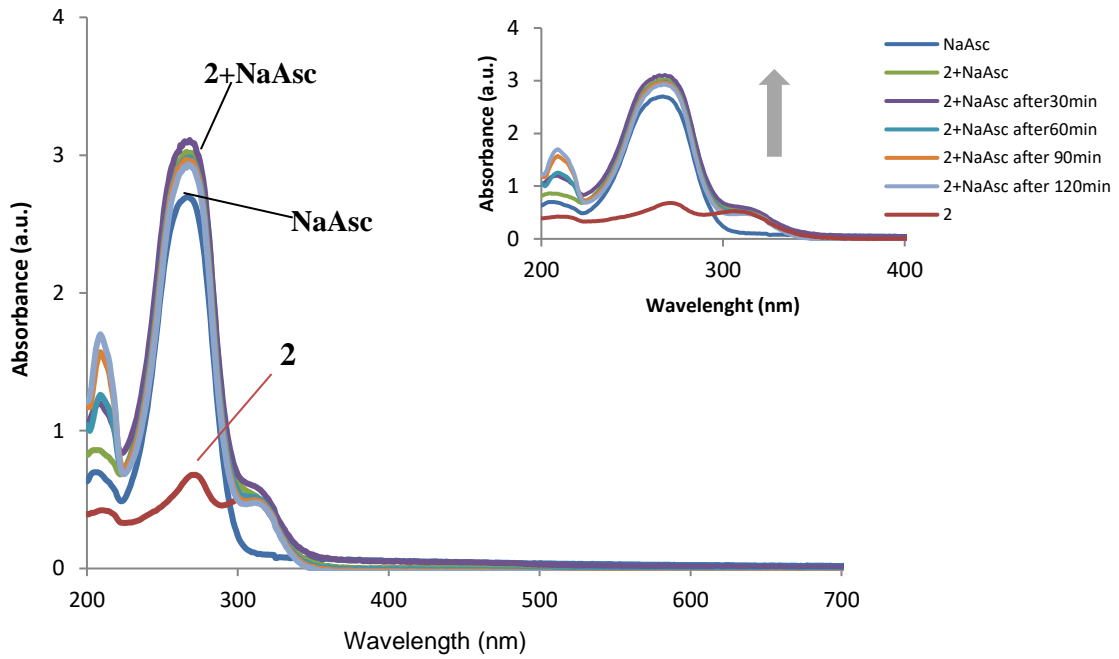


Figure S2. UV-Vis spectra of 1-9 complexes recorded at different times for 24 h to test their stability under physiological conditions. [complex] = 50 μ M diluted in PBS at 37 $^{\circ}$ C.



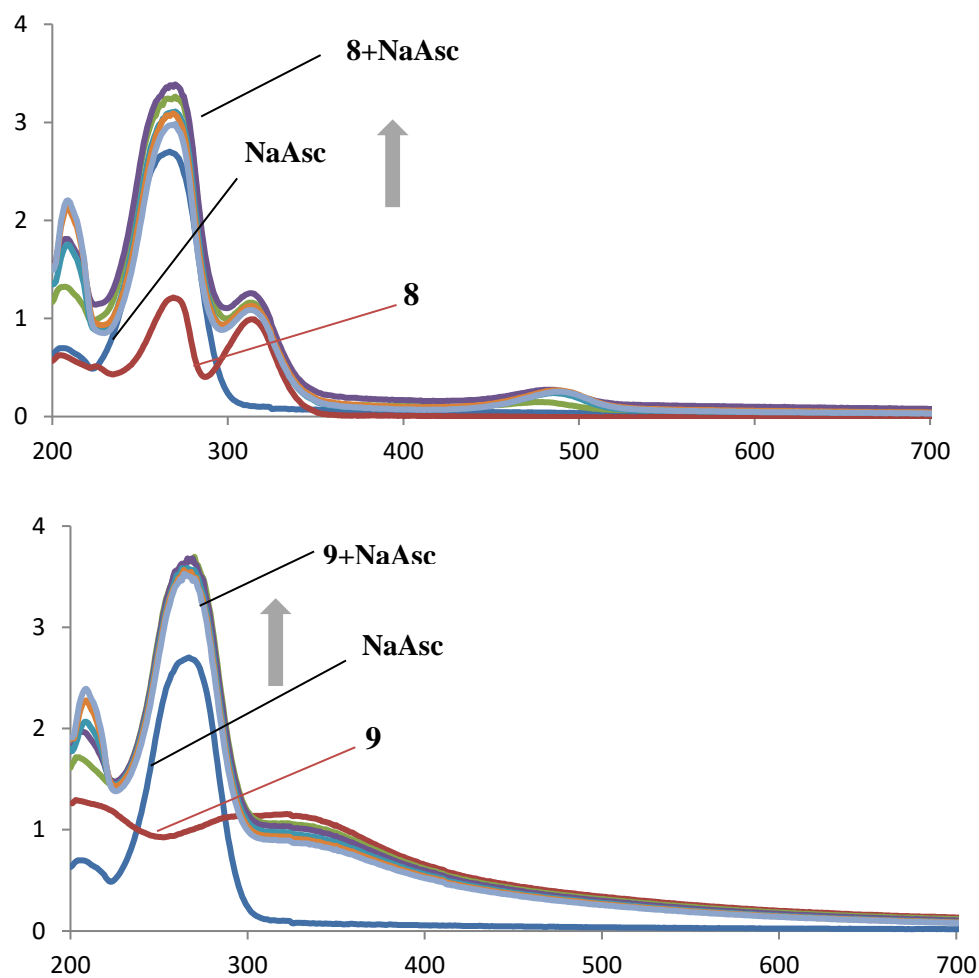


Figure S3. Time dependent UV-Vis spectra of **2-9** complexes ($2,5 \cdot 10^{-5} \text{M}$) before (red) and after the addition of NaAscorbate (NaAsc) in a relation 1:10 (complex:NaAsc). The spectra were recorded at different times for 2 h at room temperature. Arrow indicates the increase of the incubation time with NaAcs.

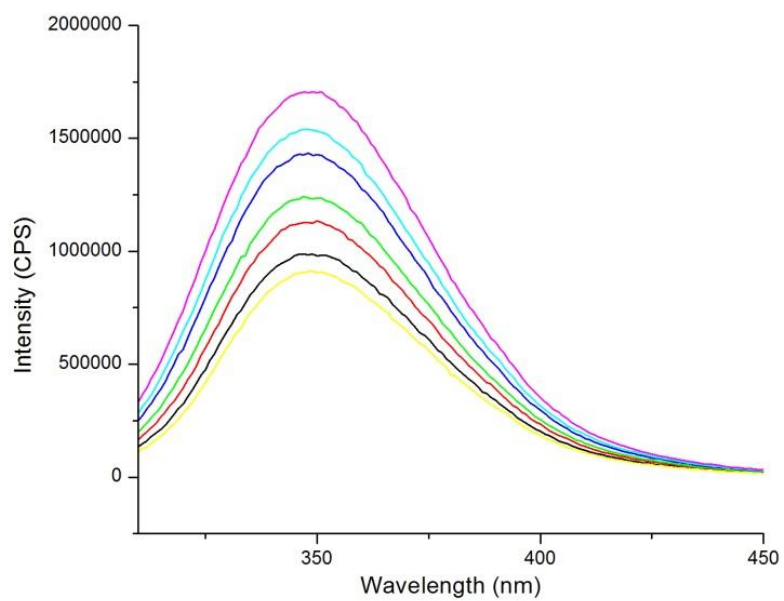


Figure S4. Fluorescence emission spectra of BSA at 298 K in the presence of increasing amounts of **1**.

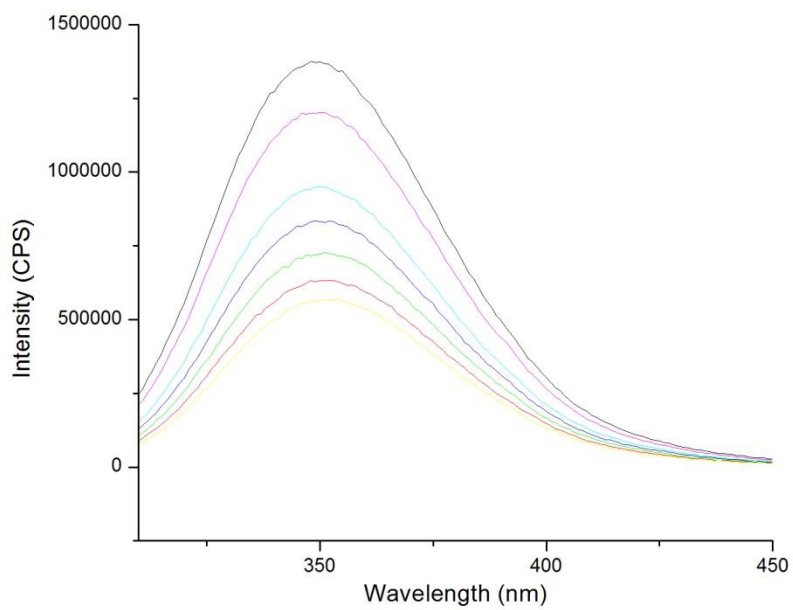


Figure S5. Fluorescence emission spectra of BSA at 298 K in the presence of increasing amounts of **3**.

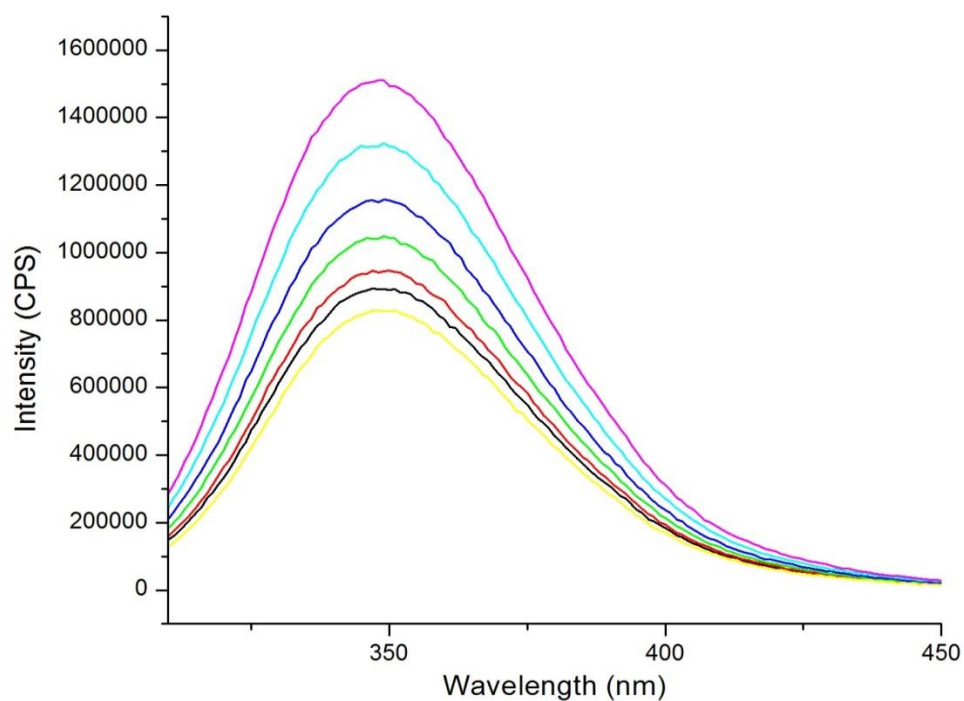


Figure S6. Fluorescence emission spectra of BSA at 298 K in the presence of increasing amounts of 4.

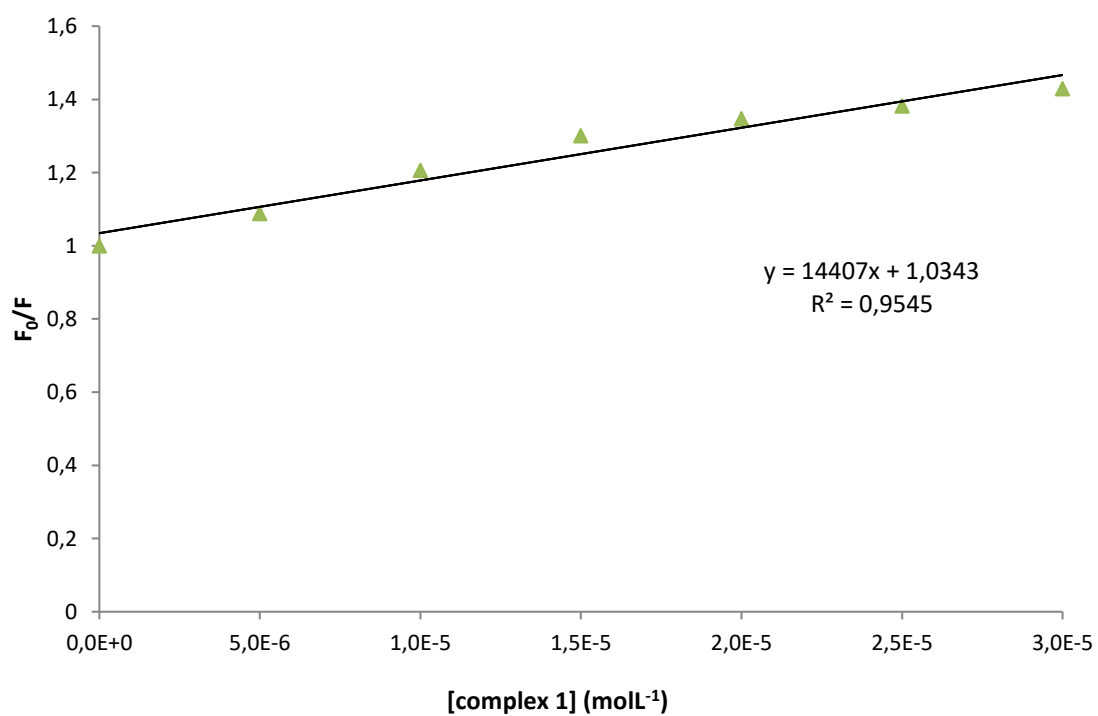


Figure S7. Stern-Volmer plot for the quenching of BSA with complex 1. Stern-Volmer equation used: $F_0/F = 1 + K_{sv}[1]$.

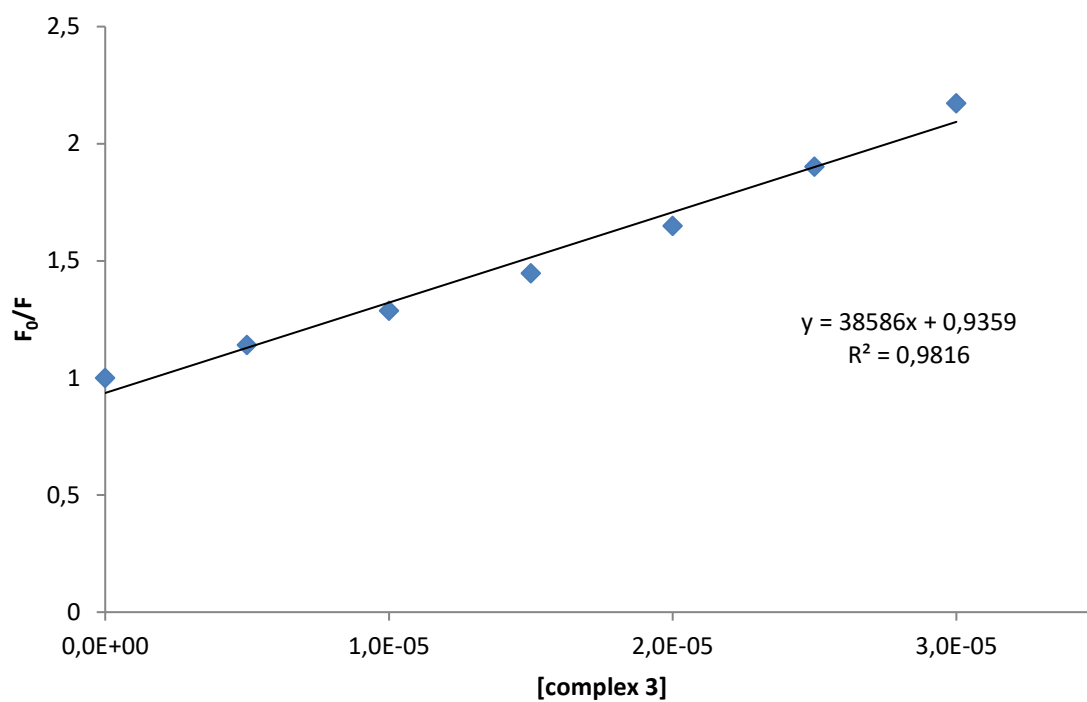


Figure S8. Stern-Volmer plot for the quenching of BSA with complex 3.

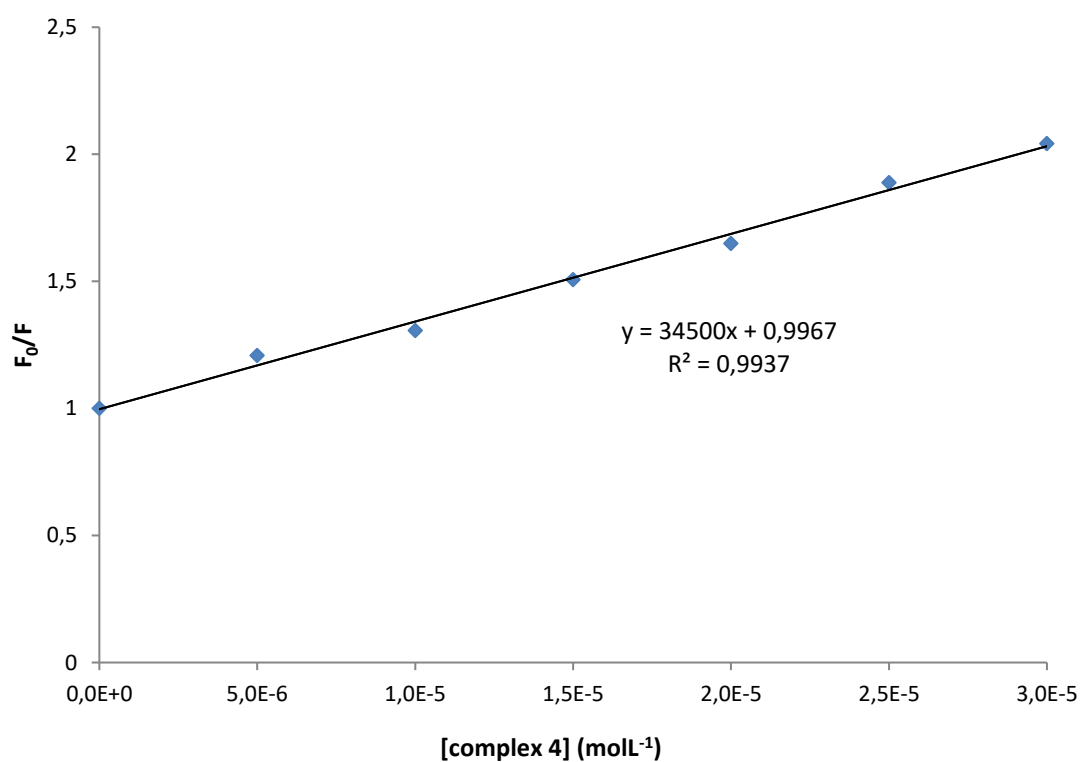


Figure S9. Stern-Volmer plot for the quenching of BSA with complex 4.

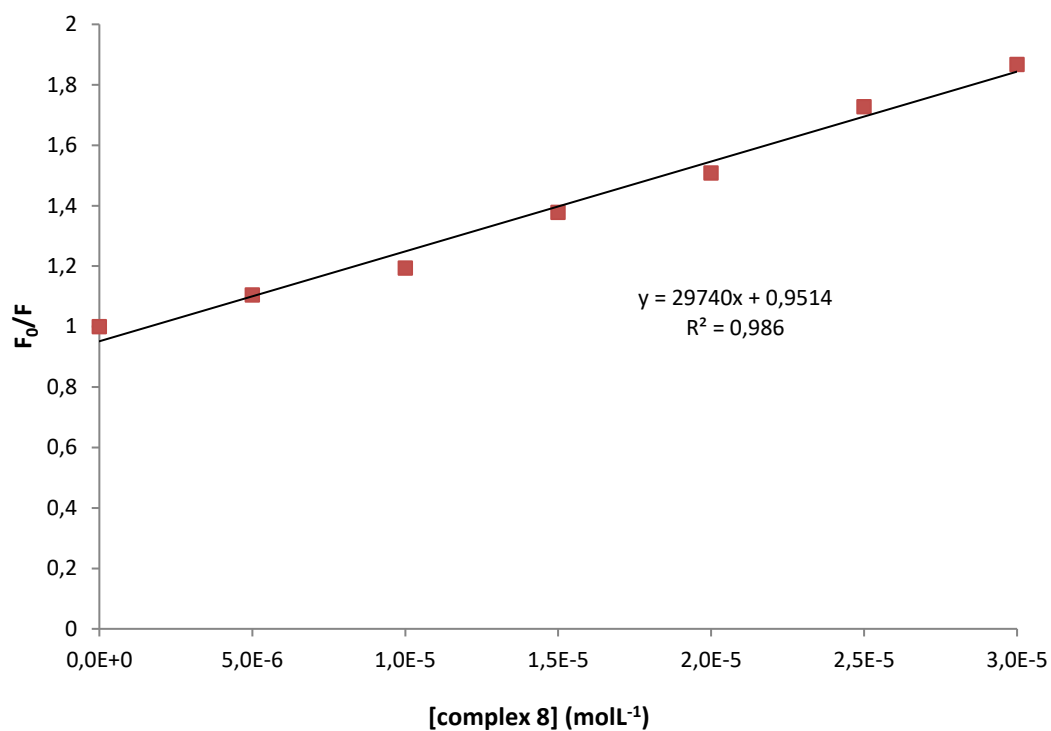


Figure S10. Stern-Volmer plot for the quenching of BSA with complex 8.

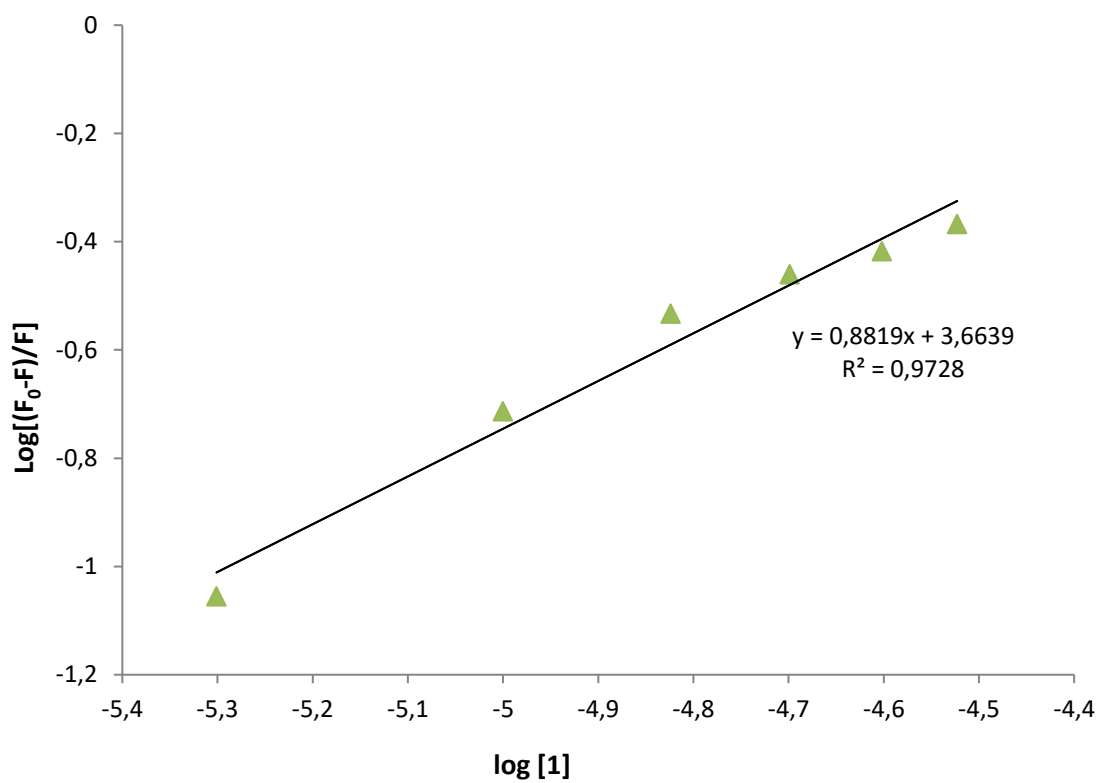


Figure S11. Stern-Volmer equation used: $\log\{(F_0-F)/F\} = \log K_b + n \log[1]$. The intercept of the best fit linear trend provides the Stern-Volmer quenching constant K_b .

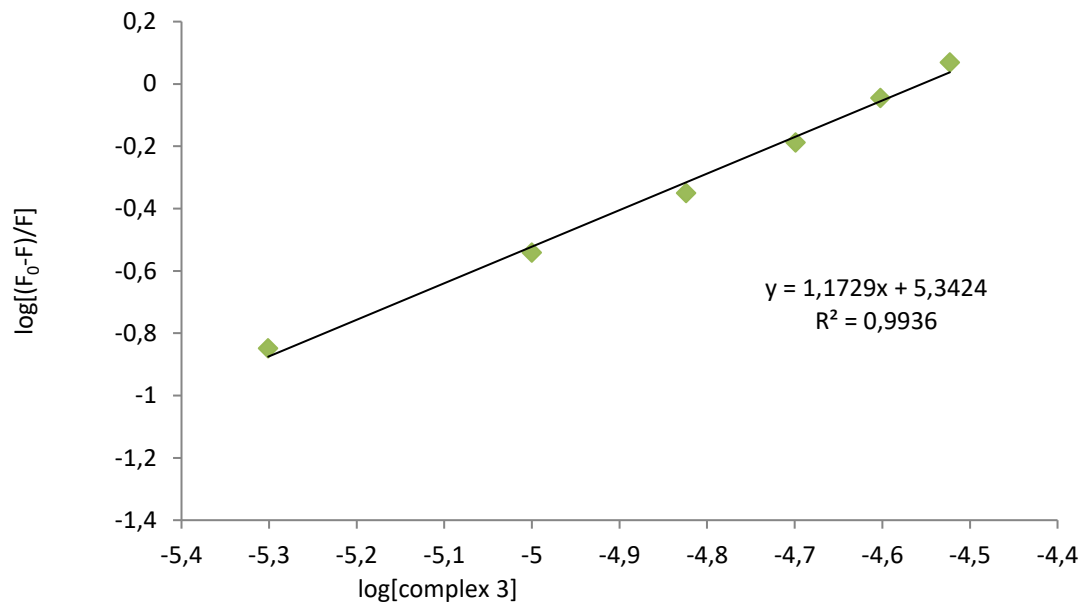


Figure S12. Stern-Volmer equation used: $\log\{(F_0-F)/F\} = \log K_b + n \log[3]$.

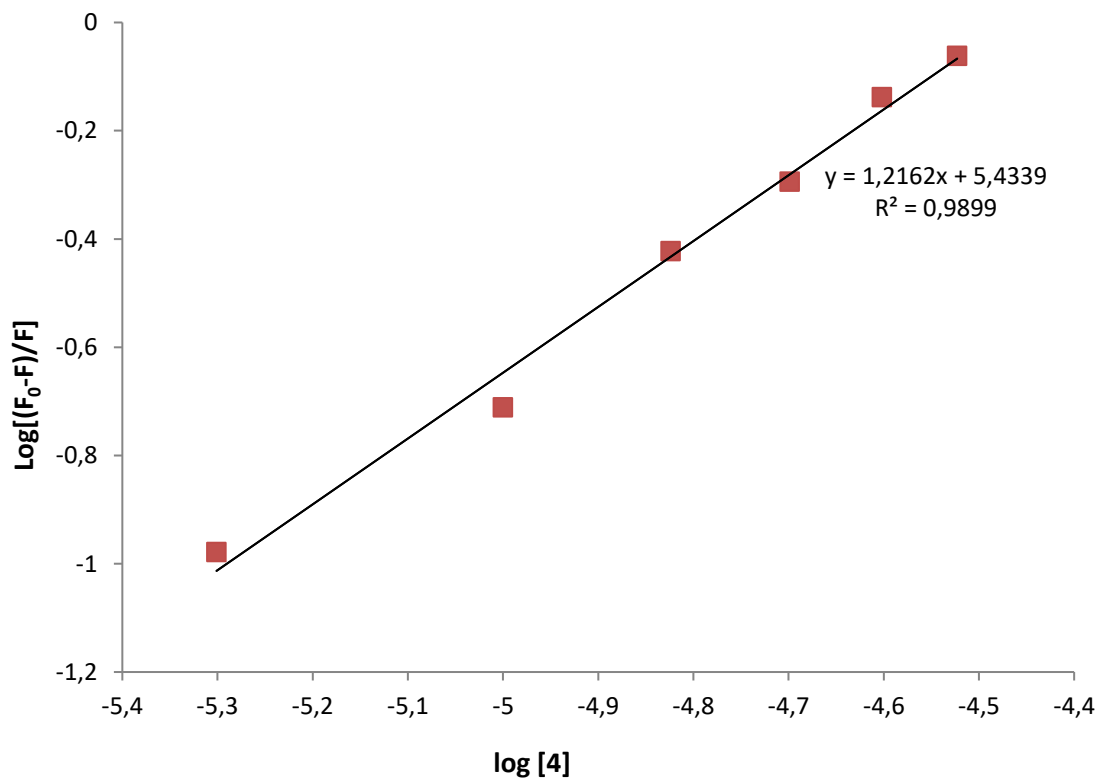


Figure S13. Stern-Volmer equation used: $\log\{(F_0-F)/F\} = \log K_b + n \log[4]$.

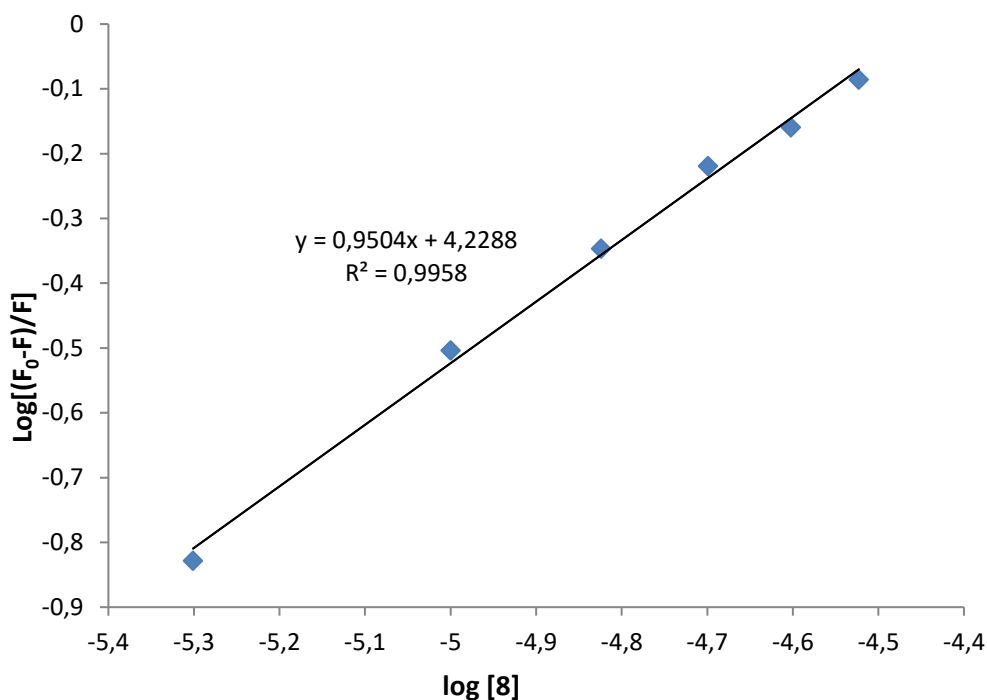


Figure S14. Stern-Volmer equation used: $\log\{(F_0-F)/F\} = \log K_b + n \log [8]$.

Table S2. Viability of differentiated Caco-2/TC7 cells after being exposed for 72 h to IC₅₀ values of complexes **4** (1.18 μM), **8** (1 μM) and **9** (5 μM).

Compound	Cell viability (%)
Mock-treated cells (DMSO)	100
[Au(SMepyrin) ₂ (S ₂ CNMe ₂)] (4)	117.21 ± 2.17
[Au(SMe ₂ pyrim) ₂ (S ₂ CNEt ₂)] (8)	111.27 ± 9.86
[Au(SMe ₂ pyrim) ₂ (S ₂ CNBz ₂)] (9)	106.59 ± 1.68

Table S3. IC₅₀ determinations of complex **8** on different cell lines at 48 h and 72 h. IC₅₀ values are lower at 72 h than at 48 h, as well as in cancerous cells (Caco-2/TC7, MCF-7) than in normal cells (Caco-2 differentiated and HepG2).

Cell line	IC ₅₀ (μM) 72h ^[a]	IC ₅₀ (μM) 48h ^[a]
Caco-2/TC7 undifferentiated	1.00 ± 0.06	3.17 ± 0.05
MCF-7	2.25 ± 0.32	3.27 ± 0.02
Caco-2/TC7 differentiated	9.86 ± 0.56	15,97 ± 0,54
HepG2	5.96 ± 1.77	9.80 ± 0.56

^[a] Mean ± SE of at least three determinations

Table S4. IC₅₀ determinations of complex **8** ligands (SMe₂Pyrim and NaS₂CNEt₂) on MCF-7 cells and 72 h.

	SMe ₂ Pyrim ^[a]	NaS ₂ CNEt ₂ ^[a]
IC ₅₀	> 50	>50

^[a] Mean ± SE of at least three determinations

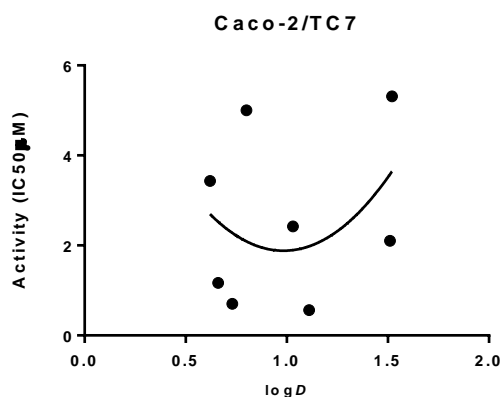


Figure S15. Correlation between IC₅₀ values for complexes **1-9** and log $D_{7.4}$. The curve has been extrapolated with the *GraphPad Prism* program.

Interactions with DNA. Adducts with pIRES2-EGFP (5308 pb) plasmid DNA (Cloutech #6029-1) were prepared by adding the required volume of a freshly prepared solution of complex **1** in MilliQ water. The concentration of pBR322 DNA in the reaction mixture was 5 ng/μl and the concentration of the gold complex was varied to give different metal-to-base pair stoichiometries (0.5, 1 and 2). The mobility of the metal complex-treated pIRES2-EGFP samples was analyzed by gel electrophoresis on a 1% (w/v) agarose gel in addition of Sybersafe (Boehringer-Mannheim, Mannheim, Germany) at 90 V/cm at 25°C in Tris-acetate/EDTA buffer.

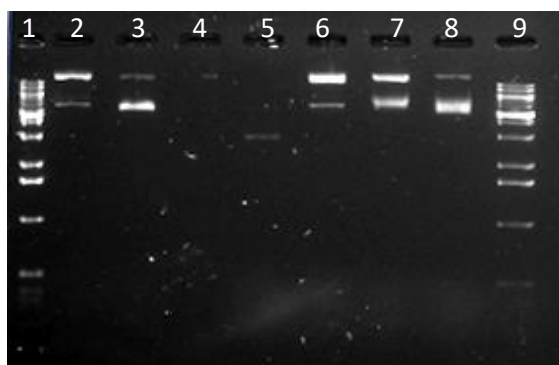


Figure S16. Gel electrophoresis of pIRES2-EGFP plasmid DNA treated with cisplatin, and [Au(Spyrim)₂(S₂CNMe₂)] (**1**) at a metal:DNA base pairs ratio of 0.5, 1 and 2. Lane 1 and 9, molecular marker; lane 2 control plasmid pIRES2-EGFP 24 h incubated at 37°C; lanes 3-5, cisplatin/DNAbp ratios of 0.5, 1 and 2 respectively; lanes 6-8, complex **1**/DNAbp ratios of 0.5, 1 and 2 respectively.

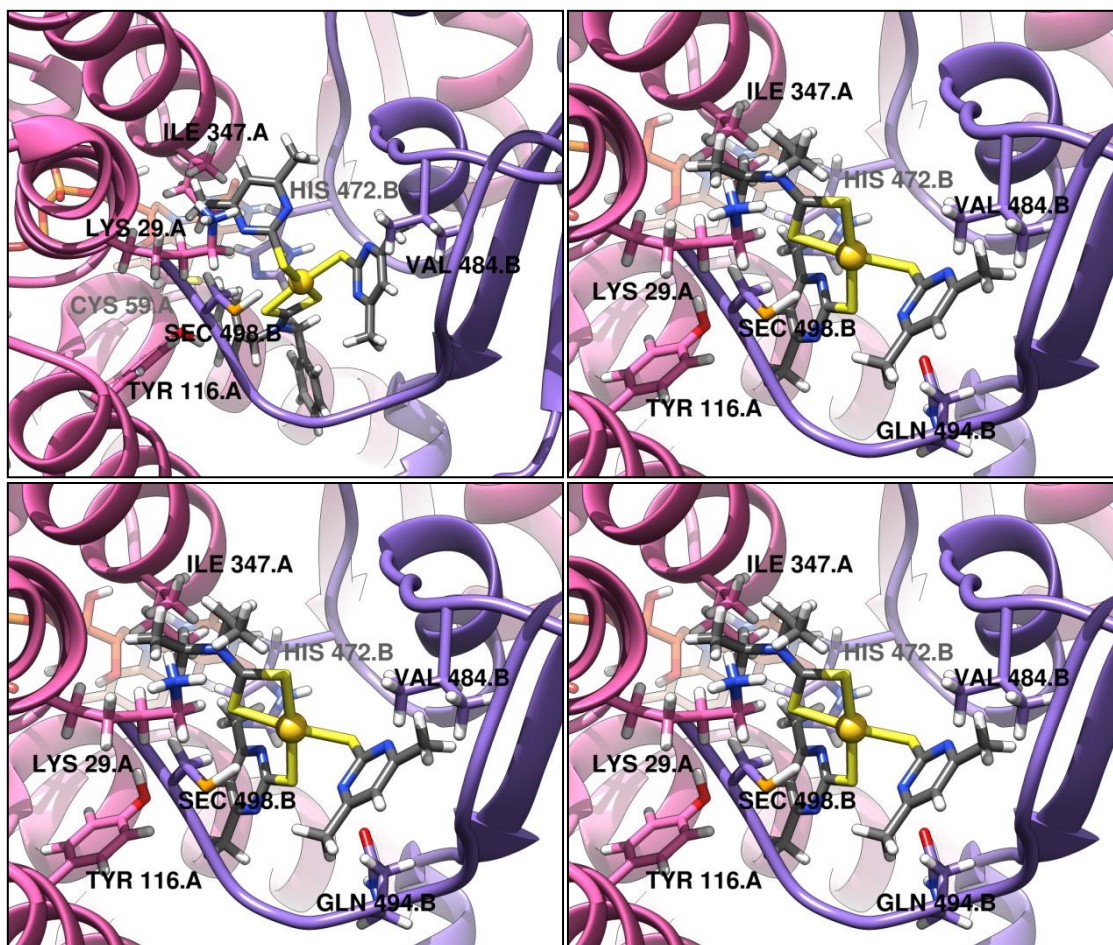


Figure S17. Top ranked interaction models for complexes **4**, **7**, **8** and **9** and TrxR1. Complexes and key residues are shown as sticks, with gold atoms being displayed as golden spheres, while the protein is shown as a pink (subunit A) and a violet (subunit B) ribbon. Nitrogen, sulfur, oxygen, selenium and hydrogen atoms are colored blue, yellow, red, orange and white respectively, while carbon atoms are colored grey or as the subunit they belong to.

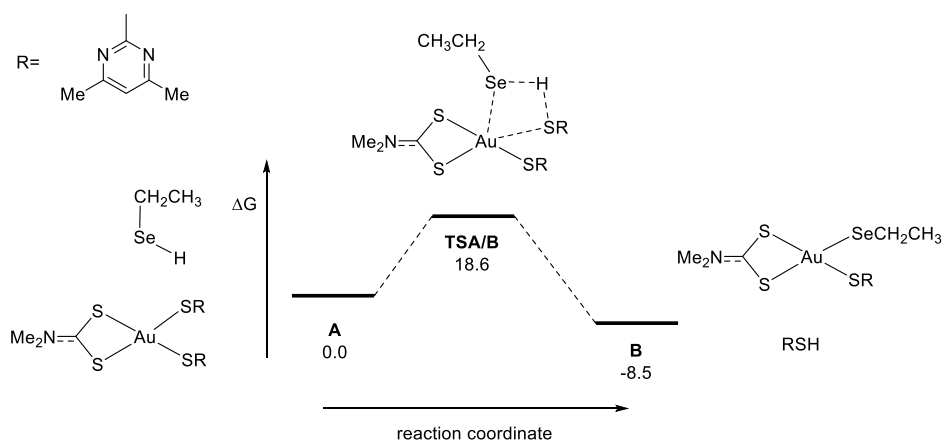


Figure S18. Free energy profile (in kcal/mol, relative to **A**) for the S/Se metal-ligand exchange reaction by Au(III) complex.

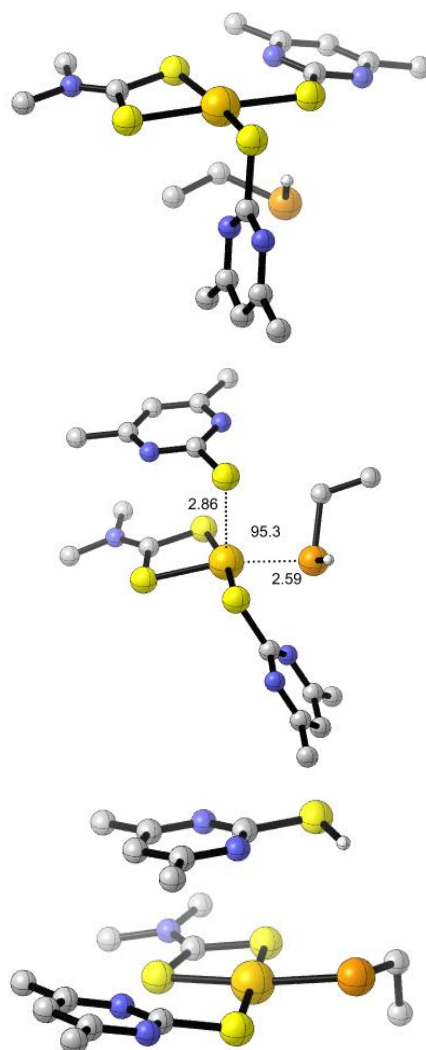


Figure S19. Geometrical representation of R (up), TS (middle) and P (down) for complex 7.

Table S5. B3LYP-D3BJ(PCM)/def2TZVP (TZ) absolute (in a.u.) and relative (to **A** and in kcal/mol) energies (E) and Gibbs free energies (G) for B3LYP-D3BJ(PCM)/def2SVP optimized structures (DZ).

	E(DZ)	Gcorr	E(TZ)	G(TZ)	ΔE (TZ)	ΔG (TZ)
A	-5066.18656	0.33883	-5068.10004	-5067.76121	0	0
TSA/B	-5066.14954	0.33471	-5068.06620	-5067.73149	21.2	18.6
B	-5066.20422	0.33974	-5068.11446	-5067.77472	-9.0	-8.5

Table S6. Cartesian coordinates (Å) of fragment, reactant, transition state and product.

minA	16	2.012295	-0.644819	-1.679671			
79	-0.425407	0.636513	-1.118653	16	-1.051655	1.062349	-2.286766
16	-1.504282	2.668245	-0.357087	7	-2.950088	-2.497757	1.442712
16	1.319581	2.035915	-0.232763	7	3.442354	-0.262318	0.573635
16	-2.386742	-0.358267	-2.074334	7	4.587355	-1.028300	-1.368127
16	0.649390	-1.379742	-1.762638	7	-3.257115	-0.321524	-1.698156
7	0.293708	4.331588	0.786435	7	-3.152994	1.911889	-0.873200
7	-2.659697	-0.775833	0.572786	6	-1.900442	-1.834271	0.987457
7	-4.377854	-1.566868	-0.879328	6	-3.151902	-3.919830	1.180095
7	2.898437	-0.221288	-0.774447	1	-4.140158	-4.073470	0.724292
7	2.929161	-2.544060	-1.272487	1	-2.379641	-4.292336	0.497513
6	0.069897	3.193904	0.156021	1	-3.100506	-4.479900	2.126282
6	-0.773297	5.285005	1.080978	6	-3.906957	-1.854443	2.342733
1	-1.649864	5.080533	0.454950	1	-4.074047	-0.814697	2.030755
1	-1.058061	5.217777	2.142594	1	-4.857921	-2.397856	2.289277
1	-0.411374	6.300842	0.869903	1	-3.537211	-1.873452	3.380127
6	1.628042	4.708695	1.248469	6	3.490396	-0.646601	-0.701248
1	2.293888	3.837811	1.238243	6	4.595811	-0.254609	1.265851
1	2.044402	5.495707	0.600912	6	4.521941	0.191690	2.696282
1	1.553418	5.090848	2.276259	1	3.837247	-0.462545	3.258986
6	-3.215770	-0.957285	-0.629003	1	5.507052	0.180726	3.180683
6	-3.330403	-1.250349	1.635032	1	4.105515	1.210335	2.747983
6	-2.711187	-1.044944	2.984956	6	5.789384	-0.641246	0.655591
1	-2.580037	0.031288	3.177113	1	6.730361	-0.640364	1.207239
1	-3.325557	-1.479023	3.784817	6	5.743657	-1.027467	-0.694695
1	-1.706225	-1.495918	3.008673	6	6.984519	-1.453106	-1.426002
6	-4.555908	-1.907068	1.471205	1	6.745897	-1.690037	-2.470517
1	-5.102850	-2.295618	2.330793	1	7.744645	-0.656209	-1.398622
6	-5.057674	-2.047671	0.171529	1	7.429901	-2.340297	-0.947638
6	-6.363402	-2.732278	-0.113421	6	-2.637302	0.870626	-1.559804
1	-6.201862	-3.577534	-0.801064	6	-4.431406	-0.497360	-1.084963
1	-6.841238	-3.102273	0.803314	6	-5.107469	-1.828219	-1.271308
1	-7.050189	-2.035003	-0.619282	1	-4.355838	-2.625521	-1.353669
6	2.337196	-1.348688	-1.202559	1	-5.805687	-2.053329	-0.452683
6	4.166227	-0.284608	-0.336530	1	-5.685246	-1.827664	-2.211386
6	4.778436	0.988026	0.171174	6	-5.011156	0.522142	-0.319496
1	4.260997	1.311205	1.089231	1	-5.961998	0.376260	0.195149
1	5.846657	0.866125	0.393414	6	-4.322200	1.739434	-0.248924
1	4.647001	1.792974	-0.567524	6	-4.841191	2.897682	0.557987
6	4.861973	-1.497056	-0.353070	1	-4.230876	3.015456	1.469359
1	5.891258	-1.559551	0.001636	1	-4.747726	3.832541	-0.014736
6	4.197492	-2.627582	-0.848681	1	-5.888062	2.755163	0.859533
6	4.852189	-3.977054	-0.908256	6	0.368797	4.628129	0.388714
1	4.369763	-4.653913	-0.183880	1	0.916642	4.959490	1.284064
1	4.713075	-4.421268	-1.905529	6	-0.102771	3.188445	0.500063
1	5.924452	-3.923744	-0.677877	1	-0.756830	3.028575	1.369576
6	0.511991	0.713674	3.007279	1	-0.623008	2.828478	-0.401035
1	-0.262428	0.736720	2.227509	1	2.092436	2.210881	-0.452425
6	1.678483	-0.169303	2.598935	34	1.384126	1.916883	0.808577
1	2.155272	0.200648	1.684489	1	-0.507746	5.285171	0.265544
1	2.443297	-0.227119	3.387264	1	1.019153	4.771536	-0.488228
1	0.508177	-1.798380	0.976664	minB			
34	1.204607	-2.061419	2.252137	79	-0.543808	-0.673870	-0.636721
1	0.862900	1.748443	3.160449	16	0.261560	1.531653	-1.319889
1	0.046530	0.366430	3.941946	16	-2.465785	0.783808	-0.708853
				16	1.376233	-2.083027	-0.723867
tsAB				16	-2.555573	0.031636	2.883514
79	0.274224	-0.231600	-0.106241	7	-1.802696	3.304135	-1.361570
16	-0.698154	-2.500679	-0.068082	7	2.747244	0.247505	-0.897501
16	-1.598559	-0.179630	1.413141	7	3.940827	-1.736598	-0.365304

7	0.112012	-0.085306	2.676769	1	6.205191	-2.329540	1.012499
7	-0.943542	2.010300	2.248314	6	-0.945360	0.713520	2.570609
6	-1.389483	2.060696	-1.177383	6	1.317605	0.463370	2.436175
6	-0.918477	4.353413	-1.860206	6	2.512411	-0.431560	2.577370
1	0.079970	3.945946	-2.053937	1	2.339773	-1.374246	2.039986
1	-1.328767	4.761873	-2.796140	1	3.425119	0.043335	2.194539
1	-0.843923	5.162861	-1.119352	1	2.666173	-0.682351	3.640006
6	-3.199769	3.676604	-1.148479	6	1.425906	1.809545	2.086844
1	-3.615347	3.102089	-0.309965	1	2.397213	2.257795	1.878075
1	-3.245680	4.745534	-0.905514	6	0.249247	2.566381	1.999026
1	-3.798179	3.485474	-2.053507	6	0.279118	4.017774	1.618521
6	2.826696	-1.058477	-0.659068	1	-0.740695	4.382514	1.442039
6	3.874004	0.969095	-0.800109	1	0.734502	4.618761	2.422579
6	3.768260	2.441752	-1.067886	1	0.886641	4.169916	0.713994
1	3.013176	2.891300	-0.405612	6	-4.043472	-2.324172	-1.518717
1	4.729143	2.953139	-0.925057	1	-3.509808	-1.571743	-2.119192
1	3.421534	2.610217	-2.099763	6	-3.579599	-2.300513	-0.071173
6	5.085264	0.351319	-0.471184	1	-3.765312	-1.330730	0.413893
1	6.005746	0.929131	-0.382481	1	-4.099678	-3.063157	0.530507
6	5.080231	-1.036895	-0.274589	34	-1.672052	-2.744468	0.191686
6	6.329578	-1.802067	0.053606	1	-5.122488	-2.100411	-1.579094
1	6.510781	-2.571039	-0.714132	1	-3.871122	-3.310254	-1.976667
1	7.207629	-1.145907	0.116628	1	-2.143783	-1.256950	2.859704

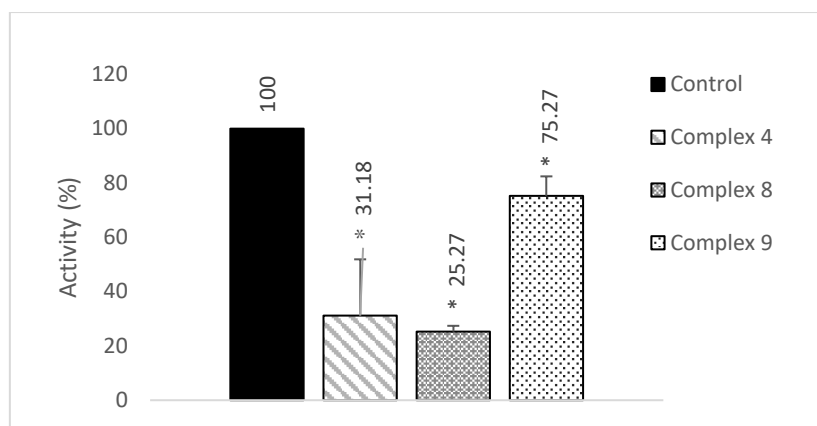


Figure S20. Determination of thioredoxin reductase activity of human purified TrxR after 30 min incubation with the gold compounds (complex **4** (1.18 μ M), complex **8** (1 μ M) and complex **9** (5 μ M)). Activity was measured by monitoring DTNB reduction and the results are expressed in terms of % of activity with respect to control. * $p < 0.05$ compared to control.

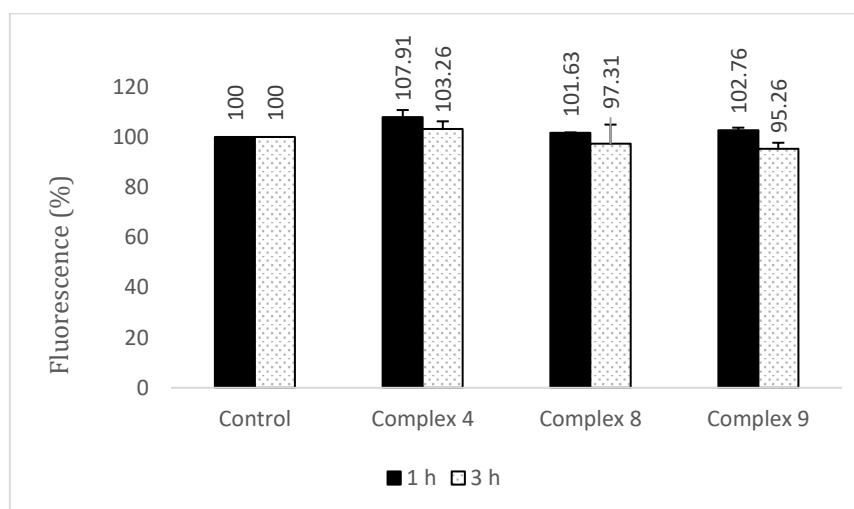


Figure S21. Determination of H_2O_2 levels, by using DCFH-DA method, after 1 h and 3 h incubation with complexes **4** (1.18 μ M), **8** (1 μ M) and **9** (5 μ M)). Results are expressed in terms of % of fluorescence intensity of DCF, which is an indicator of the formation of H_2O_2 over time.

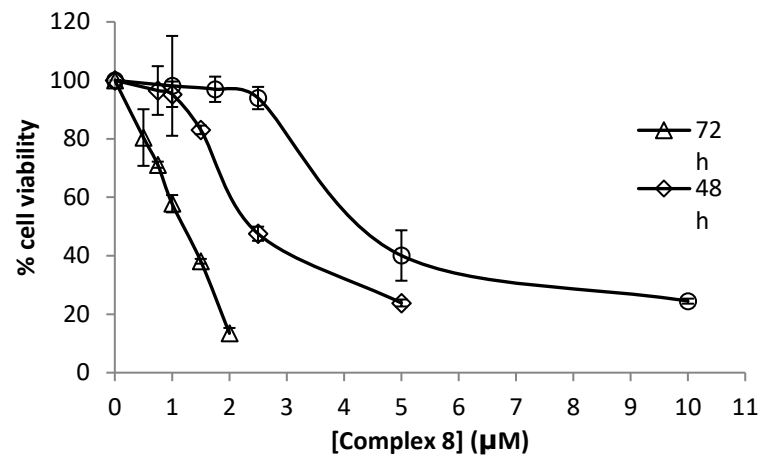


Figure S22. Survival curves of Caco-2/TC7 treated with increasing concentrations of complex 8 at 24 h (circles), 48 h (diamonds) and 72 h (triangles).

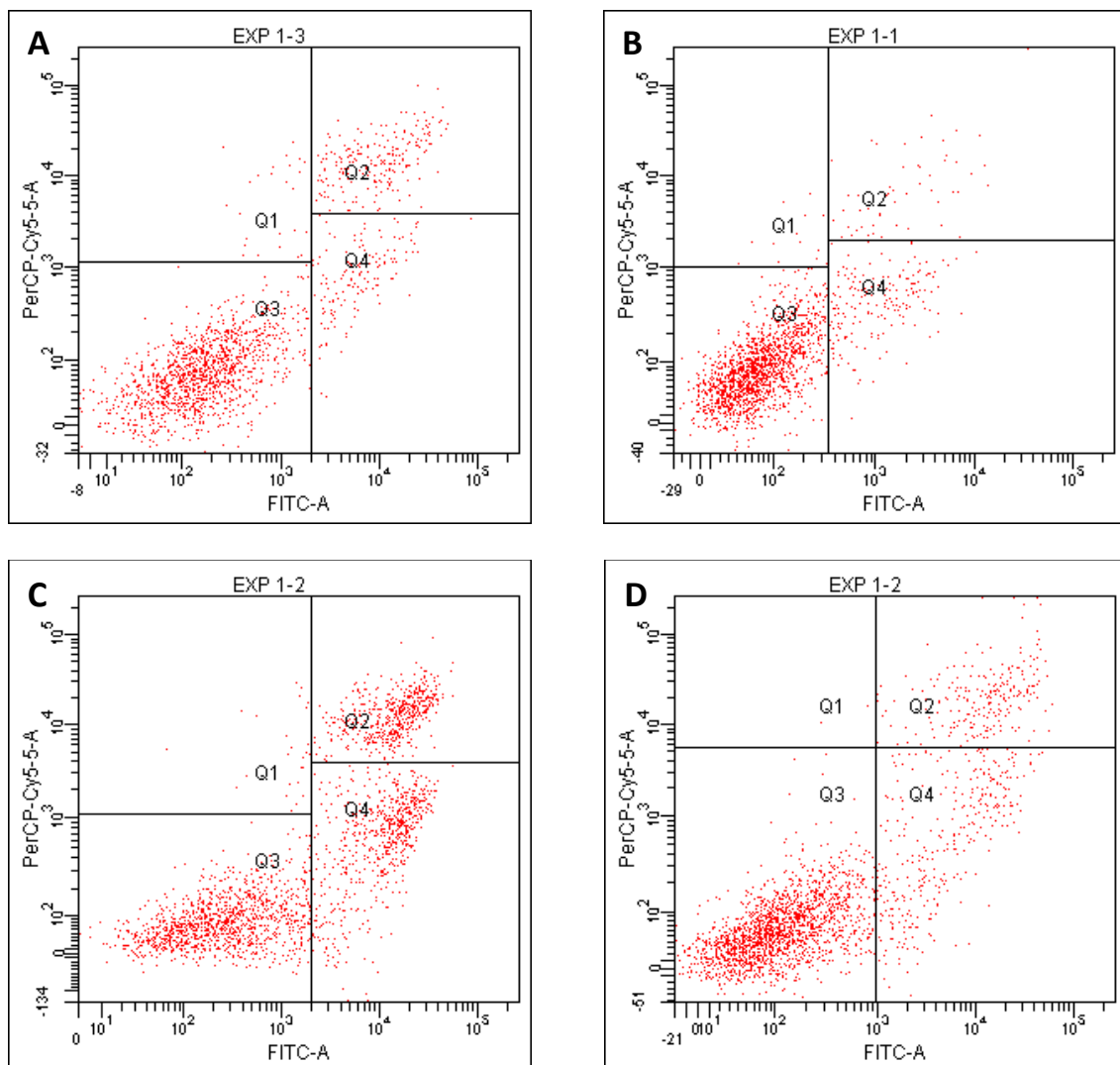


Figure S23. Representative flow cytometry cytograms from double stained (Annexin V-PI) Caco-2/TC7 cells after 24h treatment with DMSO (A) and complexes 4 (1.18 µM) (B) 8 (1 µM) (C) and 9 (5 µM) (D).

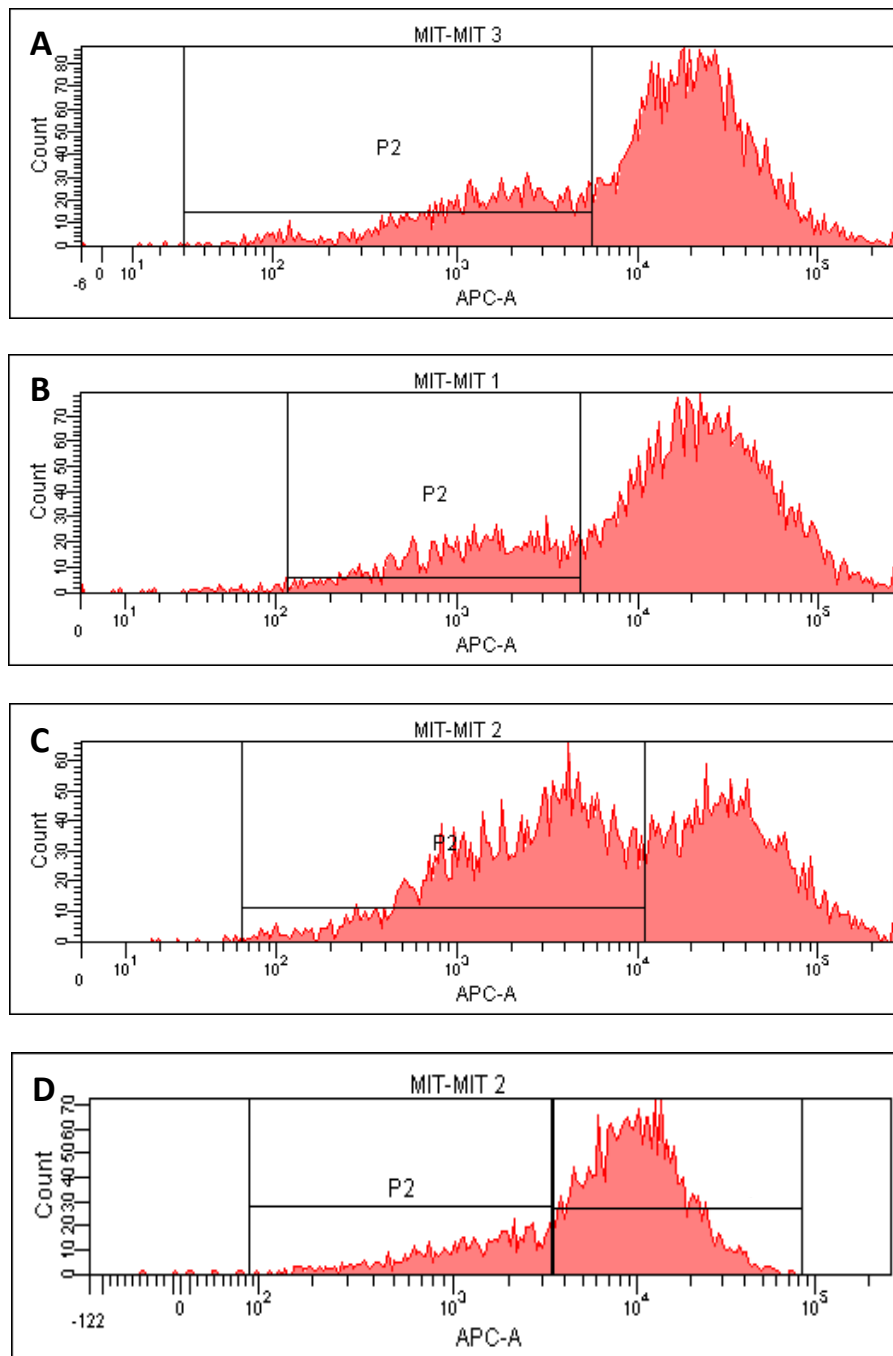


Figure S24. Representative flow cytometry histograms of effects on mitochondrial membrane after 24 h treatment with DMSO (A) and complexes **4** (1.18 μ M) (B) **8** (1 μ M) (C) and **9** (5 μ M) (D).

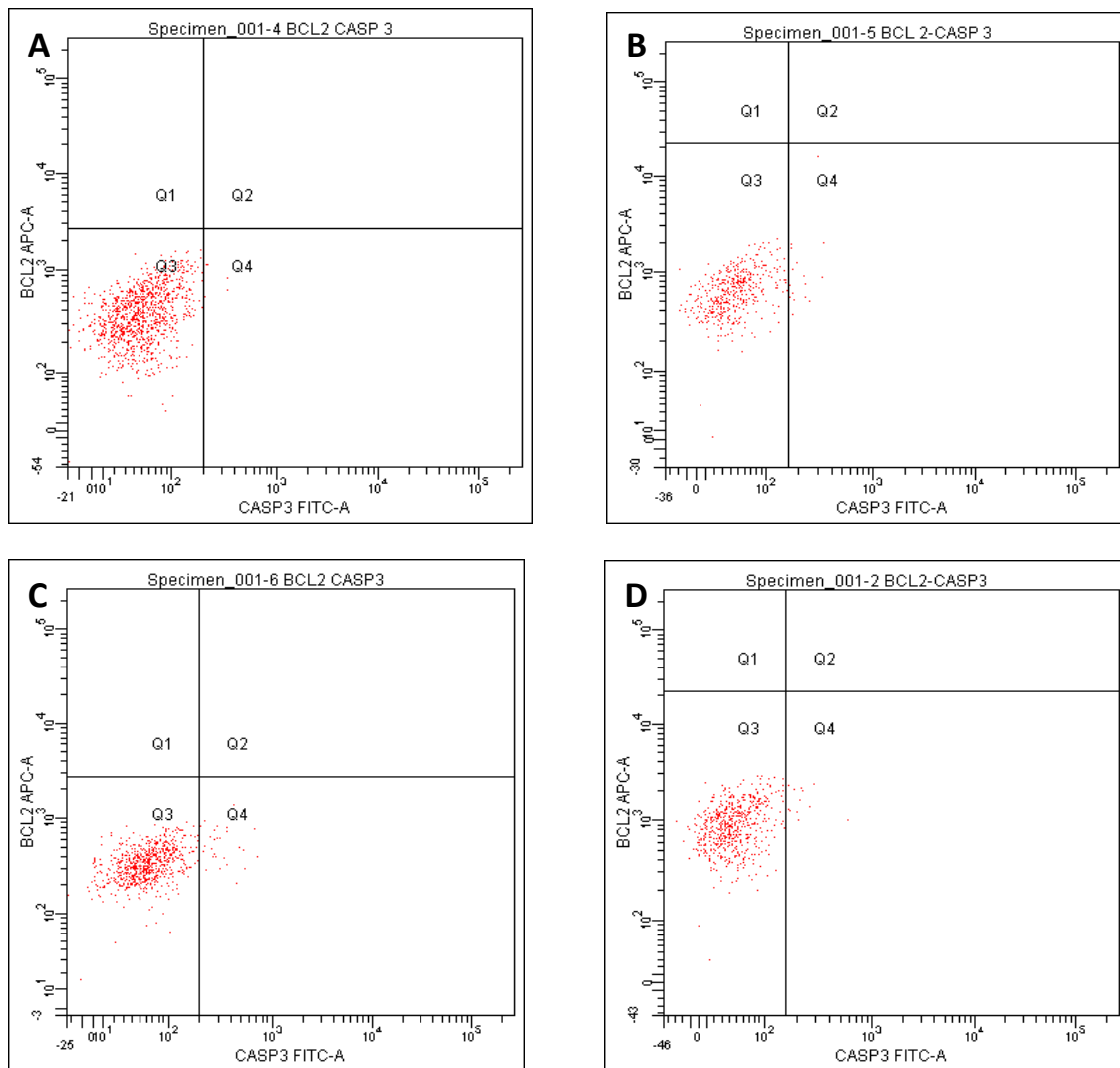


Figure S25. Representative flow cytometry cytograms of anti-BCL2 antibody fluorescence vs anti-Casp3 antibody fluorescence in Caco-2/TC7 cells after 24h treatment with DMSO (A) and complexes **4** (1.18 μ M) (B) **8** (1 μ M) (C) and **9** (5 μ M) (D).

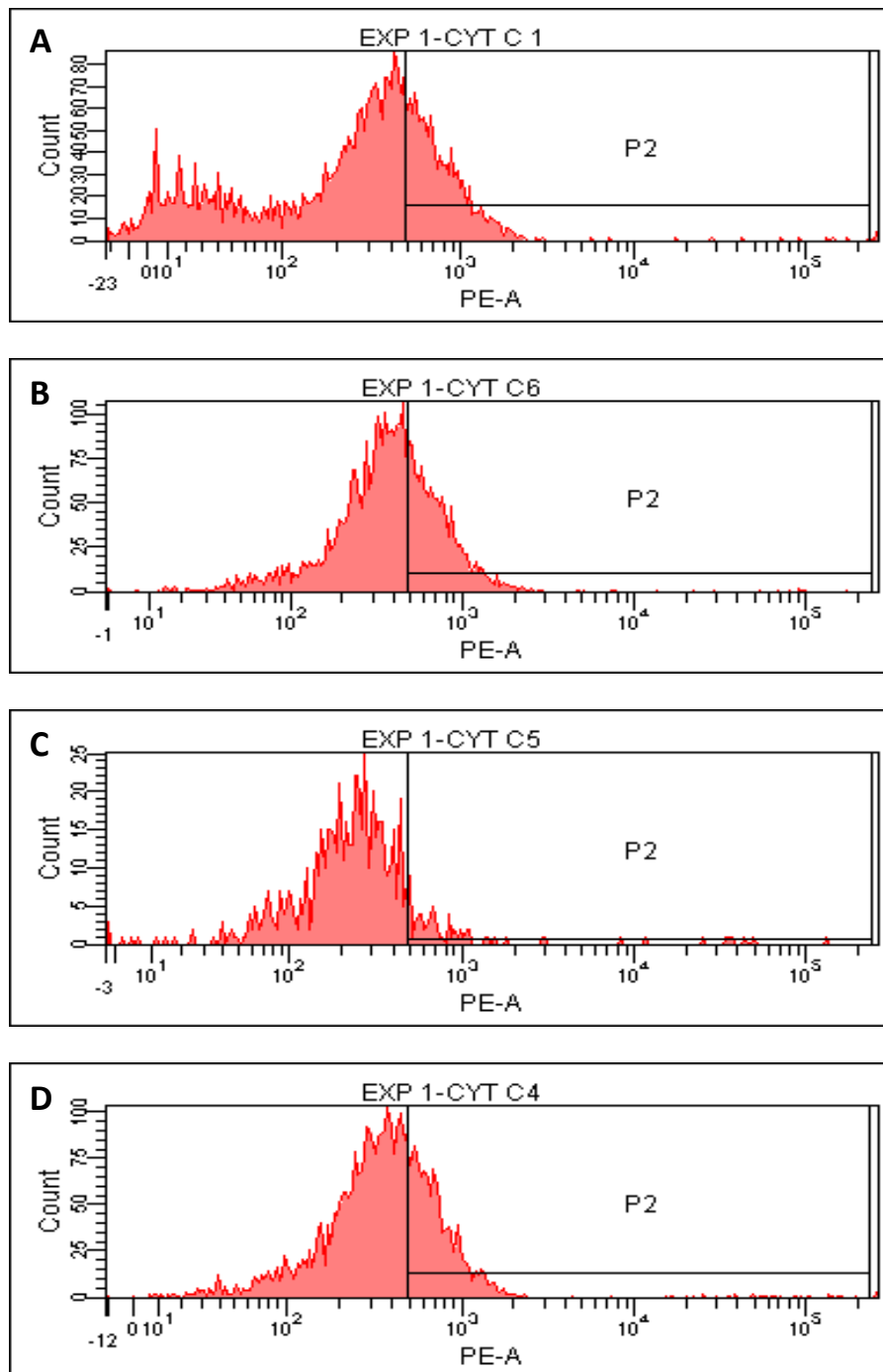


Figure S26. Representative flow cytometry histograms of mitochondrial cytochrome c in Caco-2/TC7 cells after 24h treatment with DMSO (A) and complexes 4 (1.18 μ M) (B) 8 (1 μ M) (C) and 9 (5 μ M) (D).

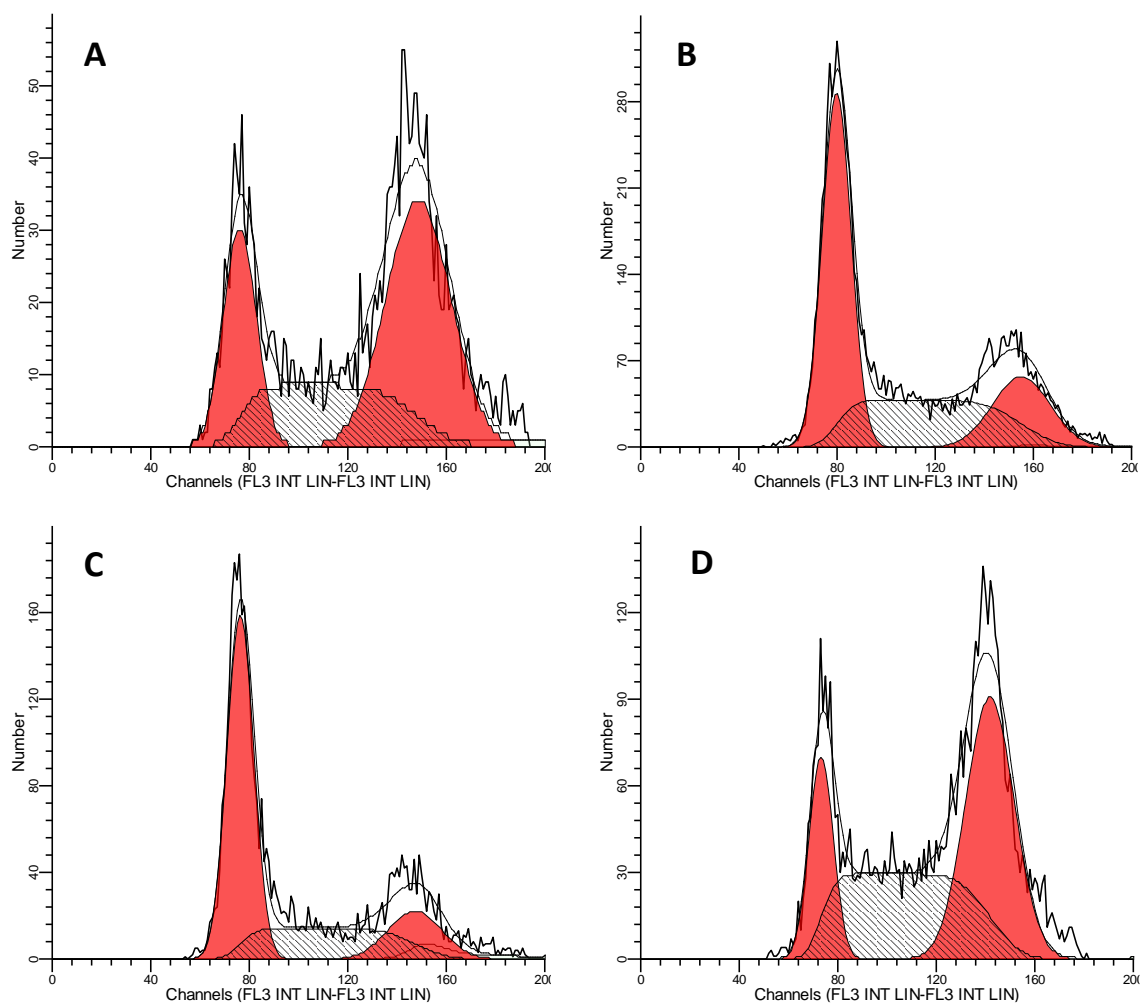


Figure S27. Representative flow cytometry histograms of PI stained Caco-2/TC7 cells after 24h treatment with DMSO (A) and complexes **4** (1.18 μM) (B) **8** (1 μM) (C) and **9** (5 μM) (D).

IV.2. Gold(I) complexes bearing alkylated 1,3,5-triaza-7-phosphaadamantane ligands as thermoresponsive anticancer agents in human colon cells

Abstract: Overheating can affect solubility or lipophilicity, among other properties, of some anticancer drugs. These temperature-dependent changes can improve efficiency and selectivity of the drugs, since they may affect their bioavailability, diffusion through cell membrane or activity. One recent approach to create thermosensitive molecules is the incorporation of fluorine atoms in the chemical structure, since fluorine can tune some chemical properties such as binding affinity. Herein we report the anticancer effect of gold derivatives with phosphanes derived from 1,3,5-triaza-7-phosphaadamantane (PTA) with long hydrocarbon chains and the homologous fluorinated chains. Besides, we analyzed the influence of temperature in the cytotoxic effect. The studied gold(I) complexes with phosphanes derived from PTA showed antiproliferative effect on human colon carcinoma cells (Caco-2/TC7 cell line), probably by inhibiting cellular TrxR causing a dysfunction in the intracellular redox state. In addition, the cell cycle was altered by the activation of p53, and the complexes produce apoptosis through mitochondrial depolarization and the consequent activation of caspase-3. Furthermore, the results suggest that this cytotoxic effect is enhanced by hyperthermia and the presence of polyfluorinated chains.

Keywords: hyperthermia; PTA; gold; thiolate; colon cancer; TrxR

IV.2.1. Introduction

Mitochondria have emerged as important biological targets, since they are known as an essential biosynthetic, bioenergetic, and signaling organelles, playing a key role in cellular differentiation, proliferation, and death [1]. Mitochondria also play a central and multifunctional role in malignant tumor progression. Therefore, cancer has been recently considered as a mitochondrial metabolic disease [2] and consequently, targeting mitochondria provides new therapeutic opportunities. Anticancer agents that directly target mitochondria do not exert their mode of action via interaction with nuclear DNA. Consequently, these drugs are likely to be minimally genotoxic.

There are many examples of compounds with anticancer activity that act on mitochondria. The non-metal anti-mitochondrial agents, named as 'mitocans' as the acronym for 'mitochondria and cancer' [3], have been classified into eight classes depending on the mitochondrial site of

action. Compounds targeting Bcl-2 family proteins, thiol redox inhibitors and VDAC/ANT targeting compounds, electron redox chain targeting drugs and lipophilic cations among others constitute a vast group of promising anti-carcinogenic drugs [3,4]. In addition, a wide number of cytotoxic metallodrugs, whose mechanism of action is based on to their ability to alter mitochondrial function, have been described [5].

Most of the anti-mitochondrial metal complexes are Au-, Ru-, Ir- and Pt-based compounds and exert their activity via mitochondrial damage and mitochondria-mediated apoptosis, thioredoxin reductase inhibition and/or interaction with protein translocators. Gold derivatives are probably the best studied anticancer metal complexes that target mitochondria. Several lines of evidence point that the enzyme thioredoxin reductase (TrxR) constitutes the main target for cytotoxic gold derivatives [6–9]. The presence of cysteine and selenocysteine residues in the catalytic sites of the enzyme can bind soft metals such as gold, with a subsequent inhibition of its activity. TrxR, a ubiquitous flavoprotein that maintains the cellular redox state [10], is existing as two main isoforms, namely, the cytosolic (TrxR1) and the mitochondrial (TrxR2). Both isoforms exert the same function of reducing the disulfide protein thioredoxin to its dithiol form. Its inhibition affects the cellular redox balance by increasing ROS levels leading to a decrease in the mitochondrial thiol levels, which consequent can affect the mitochondrial membrane permeability causing apoptosis [11]. Examples that include phosphane thiolate [12–14] and phosphane alkynyl gold(I) derivatives [15–18], NHC-carbene gold(I) complexes [19–22], cationic bisphosphane complexes [23] or square-planar gold(III) compounds [24] have been described as TrxR inhibitors.

Tumor cells exhibit a more negative mitochondrial transmembrane potential in comparison with normal cells [25], that contributes to enhanced accumulation to positively charged compounds, such as lipophilic cationic metal complexes. Among them, cationic Au(I)-N-heterocyclic carbene complexes constitute one of the most studied groups of mitochondria-targeting lipophilic cationic metal derivatives. However, the accumulation in mitochondria of type of lipophilic species may not be selective towards cancerous cells, and the side effects may be significant.

Recent studies have revealed that the temperature of mitochondria is higher than the ambient temperature and estimated around 10 degrees higher [26]. Taking advantage of that temperature difference, some studies related to thermoresponsive drug delivery have been recently described [27,28]. Besides, thermoresponsive small molecules [29], such as arene ruthenium complexes [30,31], platinum compounds [32] and chlorambucil derivatives [33], both with long polyfluorinated appendages, have shown an increased cytotoxic activity under hyperthermia conditions.

With this idea we describe here the synthesis of gold derivatives with phosphanes derived from 1,3,5-triaza-7-phosphaadamantane (PTA) after introduction of perfluorinated chains in order to lead to thermoresponsive properties. Related compounds with long hydrocarbon chains in the PTA skeleton, were also included for comparison purposes. The new complexes were tested against human colon carcinoma cells (Caco-2 cells) at 37 °C and following a hyperthermia

treatment at 40 °C and their possible intracellular target was also studied, including TrxR and possible mitochondrial disturbances and apoptotic implications.

IV.2.2. Materials and Methods

IV.2.2.1. Synthesis of the ligands

Synthesis of [PTA-CH₂(CH₂)₆CH₃]I (La). To a solution of PTA (1 mmol, 0.157 g) in acetone under argon atmosphere, 1-iodooctane (1 mmol) was added. The resulting suspension was stirred for 3 days. The white product obtained was then filtered, washed with cold acetone and diethyl ether and dried under vacuum. The product was isolated as a white solid (yield 90%).

¹H NMR (400 MHz, dms_o-d₆, 25 °C): δ = 4.96 and 4.79 (AB system, J_{AB} = 11.2 Hz, 4H, N⁺CH₂N), 4.52 and 4.33 (AB system, J_{AB} = 12.0 Hz, 2H, NCH₂N), 4.34 (m, 2H, N⁺CH₂P), 3.93 (t, J = 13.7 Hz, 2H, NCH₂P), 3.82 (m, 2H, NCH₂P), 2.79 (m, 2H, N⁺CH₂R), 1.67 (m, 2H, CH₂), 1.29 (m, 10H, CH₂), 0.87 (t, J = 6.8 Hz, 3H, CH₃) ppm. ³¹P{¹H} NMR (162 MHz, dms_o-d₆, 25 °C): δ = -85.7 (s) ppm. ¹³C{¹H} NMR (101 MHz, dms_o-d₆, 25 °C): δ = 79.0 (s, 2C, N⁺CH₂N), 69.8 (s, 1C, NCH₂N), 61.8 (s, 1C, N⁺CH₂R), 52.2 (d, J = 31.9 Hz, 1C, N⁺CH₂P), 45.9 (d, J = 20.3 Hz, 2C, NCH₂P), 31.7 (s, 1C, C_{intrachain}), 28.9 (s, 2C, C_{intrachain}), 26.6 (s, 1C, C_{intrachain}), 22.5 (s, 1C, C_{intrachain}), 19.5 (s, 1C, N⁺CH₂CH₂R), 14.4 (s, 1C, CH₃) ppm. IR ν_{max}/cm⁻¹: 2923 (m, stretching C-H), 1465 and 1414 and 1370 (m, bending -C-H). ESI m/z (%): 269.9 [M]⁺ (100). Anal. calcd. (%) for C₁₄H₂₉IN₃P (397.27): C, 42.33; H, 7.36; N, 10.58. Found: C, 42.13; H, 7.16; N, 10.75.

Synthesis of TfOCH₂CH₂(CF₂)₅CF₃. To a solution of 1H,1H,2H,2H-Perfluoro-1-octanol (5 mmol) and pyridine (5 mmol) in 10 mL of dry dichloromethane under argon atmosphere and cooled to -78 °C, trifluoromethanesulfonic anhydride (7.5 mmol) was added dropwise. The resulting solution was stirred at -78 °C for 35 min. Then the reaction was allowed to warm to room temperature and stirred for 3 h. Then, the reaction was quenched with water (10 mL) and dichloromethane (10 mL). The aqueous phase was extracted with dichloromethane (2 × 10 mL). The organic phase was dried with MgSO₄ and the solvent evaporated. The crude organic residue was eluted with dichloromethane on silica gel to afford red-brown oil (74% yield).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ = 4.77 (t, J = 6.3 Hz, 2H, CH₂-O-), 2.66 (tt, J = 17.4 and 6.2 Hz, 2H, CH₂-CF₂) ppm. ¹⁹F{¹H} NMR (376 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ = -75.1 (s, TfO⁻), -81.29 (tt, J = 10.1 and 2.3 Hz, CF₃), -113.9 (m, CF₂), -122.1 (m, CF₂), -123.2 (s, CF₂), -123.8 (m, CF₂), -126.5 (m, CF₂) ppm.

Synthesis of [PTA-CH₂CH₂(CF₂)₅CF₃]TfO (Lb). To a cooled solution (0 °C) of PTA (1 mmol, 0.157 g) in acetone under argon atmosphere, TfOCH₂CH₂(CF₂)₅CF₃ (1 mmol, 0.496 g) was added dropwise and the resulting solution was stirred for 35 min at 0 °C. The solution was allowed to warm to room temperature and then evaporated. The remaining solution was precipitated with diethyl ether. The white solid resulting was filtered and washed with cold acetone and diethyl ether (89% yield).

^1H NMR (400 MHz, $\text{dms}\text{-d}_6$, 25 °C): δ = 5.08 and 4.90 (AB system, J_{AB} = 10.8 Hz, 4H, $\text{N}^+\text{CH}_2\text{N}$), 4.54 and 4.32 (AB system, J_{AB} = 13.2 Hz, 2H, NCH_2N), 4.42 (d, J = 5.2 Hz, 2H, $\text{N}^+\text{CH}_2\text{P}$), 3.96 (t, J = 13.7 Hz, 2H, NCH_2P), 3.80 (dd, J = 14.4, 8.5 Hz, 2H, NCH_2P), 3.20 (m, 2H, N^+CH_2), 2.93 (m, 2H, CH_2CF_2) ppm. $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ NMR (162 MHz, $\text{dms}\text{-d}_6$, 25 °C): δ = -85.0 (s) ppm. $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (101 MHz, $\text{dms}\text{-d}_6$, 25 °C): δ = 121.3–108.2 (m series, 6C, $-\text{CH}_2\text{-CF}_2\text{-CF}_2^-$, $-\text{CH}_2\text{-CF}_2\text{-CF}_2\text{-CF}_2^-$, $-\text{CH}_2\text{-(CF}_2)_2\text{-CF}_2^-$, $-\text{CH}_2\text{-(CF}_2)_3\text{-CF}_2^-$, $-\text{CH}_2\text{-(CF}_2)_4\text{-CF}_2\text{-CF}_3$), 79.3 (s, 2C, $\text{N}^+\text{CH}_2\text{N}$), 69.2 (s, 1C, NCH_2N), 52.7 (s, 1C, $\text{N}^+\text{CH}_2\text{R}$), 51.8 (d, J = 32.7 Hz, 1C, $\text{N}^+\text{CH}_2\text{P}$), 45.4 (d, J = 20.5 Hz, 2C, NCH_2P), 21.8 (t, J_{CF} = 20.9 Hz, 1C, $\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2\text{R}$) ppm. $^{19}\text{F}\{^1\text{H}\}$ NMR (376 MHz, $\text{dms}\text{-d}_6$, 25 °C): δ = -77.8 (s, TfO^-), -80.2 (t, J = 8.6 Hz, CF_3), -112.8 (m), -121.7 (s, CF_2), -122.4 (s, CF_2), -122.6 (s, CF_2), -125.8 (s, CF_2) ppm. IR $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3004 and 2916 (w, stretching C-H), 1467 and 1420 (w, bending -C-H), 1224 (s, stretching C-F), 1142 (s, asymmetric stretching C-F). MALDI MS m/z (%): 504.1 $[\text{M}]^+$ (100). Anal. calcd. (%) for $\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{F}_{16}\text{N}_3\text{O}_3\text{PS}$ (653.04): C, 27.58; H, 2.47; N, 6.43; S, 4.91. Found: C, 27.69; H, 2.76; N, 6.72; S, 5.30.

IV.2.2.2. Synthesis of the gold complexes: $[\text{AuCl}(\text{PTA-R})]\text{X}$

To a solution of $[\text{AuCl}(\text{tht})]$ (0.5 mmol, 0.160 g) in dichloromethane (15 mL), the alkylated PTA La or Lb (0.5 mmol) was added. The resulting suspension was stirred for 4–5 h at room temperature. The solid formed in the round-bottom flask was filtered and washed with cold acetone (5 mL) and diethyl ether (10 mL) to eliminate all the tetrahydrothiophene. The white solid was then dried in air and stored at 5 °C.

$[\text{AuCl}(\text{PTA-CH}_2(\text{CH}_2)_6\text{CH}_3)]\text{I}$ (1a). Yield: 90%, white solid. ^1H NMR (400 MHz, $\text{dms}\text{-d}_6$, 25 °C): δ = 5.08 and 4.90 (AB system, J_{AB} = 10.8 Hz, 4H, $\text{N}^+\text{CH}_2\text{N}$), 4.54 and 4.32 (AB system, J_{AB} = 13.2 Hz, 2H, NCH_2N), 4.42 (d, J = 5.2 Hz, 2H, $\text{N}^+\text{CH}_2\text{P}$), 3.96 (t, J = 13.7 Hz, 2H, NCH_2P), 3.80 (dd, J = 14.4, 8.5 Hz, 2H, NCH_2P), 3.20 (m, 2H, N^+CH_2), 2.93 (m, 2H, CH_2CF_2) ppm. $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ NMR (162 MHz, $\text{dms}\text{-d}_6$, 25 °C): δ = -85.0 (s) ppm. $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (101 MHz, $\text{dms}\text{-d}_6$, 25 °C): δ = 121.3–108.2 (m series, 6C, $-\text{CH}_2\text{-CF}_2\text{-CF}_2^-$, $-\text{CH}_2\text{-CF}_2\text{-CF}_2\text{-CF}_2^-$, $-\text{CH}_2\text{-(CF}_2)_2\text{-CF}_2^-$, $-\text{CH}_2\text{-(CF}_2)_3\text{-CF}_2^-$, $-\text{CH}_2\text{-(CF}_2)_4\text{-CF}_2\text{-CF}_3$), 79.3 (s, 2C, $\text{N}^+\text{CH}_2\text{N}$), 69.2 (s, 1C, NCH_2N), 52.7 (s, 1C, $\text{N}^+\text{CH}_2\text{R}$), 51.8 (d, J = 32.7 Hz, 1C, $\text{N}^+\text{CH}_2\text{P}$), 45.4 (d, J = 20.5 Hz, 2C, NCH_2P), 21.8 (t, J_{CF} = 20.9 Hz, 1C, $\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2\text{R}$) ppm. $^{19}\text{F}\{^1\text{H}\}$ NMR (376 MHz, $\text{dms}\text{-d}_6$, 25 °C): δ = -77.8 (s, TfO^-), -80.2 (t, J = 8.6 Hz, CF_3), -112.8 (m), -121.7 (s, CF_2), -122.4 (s, CF_2), -122.6 (s, CF_2), -125.8 (s, CF_2) ppm. IR $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3004 and 2916 (w, stretching C-H), 1467 and 1420 (w, bending -C-H), 1224 (s, stretching C-F), 1142 (s, asymmetric stretching C-F). MALDI MS m/z (%): 504.1 $[\text{M}]^+$ (100). Anal. calcd. (%) for $\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{F}_{16}\text{N}_3\text{O}_3\text{PS}$ (653.04): C, 27.58; H, 2.47; N, 6.43; S, 4.91. Found: C, 27.69; H, 2.76; N, 6.72; S, 5.30.

$[\text{AuCl}(\text{PTA-CH}_2\text{CH}_2(\text{CF}_2)_5\text{CF}_3)]\text{TfO}$ (1b). Yield: 93%, white solid. ^1H NMR (400 MHz, $\text{dms}\text{-d}_6$, 25 °C): δ = 5.09 and 4.88 (AB system, J_{AB} = 11.6 Hz, 4H, $\text{N}^+\text{CH}_2\text{N}$), 4.75 (d, J = 5.2 Hz, 2H, $\text{N}^+\text{CH}_2\text{P}$), 4.61 and 4.53 (AB system, J_{AB} = 14.4 Hz, 2H, NCH_2N), 4.38 (t, J = 14.2 Hz, 2H, NCH_2P), 4.24 (m, 2H, NCH_2P), 2.94 (t, J = 7.4 Hz, 2H, $\text{N}^+\text{CH}_2\text{R}$), 1.67 (m, 2H, CH_2), 1.27 (m, 10H, CH_2), 0.86 (t, J = 6.8 Hz, 3H, CH_3) ppm. $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ NMR (162 MHz, $\text{dms}\text{-d}_6$, 25 °C): δ = -29.8 (s) ppm. $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (101 MHz, $\text{dms}\text{-d}_6$, 25 °C): δ = 78.3 (s, 2C, $\text{N}^+\text{CH}_2\text{N}$), 68.6 (s, 1C, NCH_2N), 61.1 (s, 1C, $\text{N}^+\text{CH}_2\text{R}$), 53.0 (d, J = 31.9 Hz, 1C, $\text{N}^+\text{CH}_2\text{P}$), 48.3 (d, J = 20.3 Hz, 2C, NCH_2P), 31.2 (m, 1C, $\text{C}_{\text{intrachain}}$), 28.4 (m, 2C,

$C_{intrachain}$), 26.1 (s, 1C, $C_{intrachain}$), 22.1 (s, 1C, $C_{intrachain}$), 19.2 (s, 1C, $N^+CH_2CH_2R$), 14.0 (s, 1C, CH_3) ppm. IR ν_{max}/cm^{-1} : 2921 (m, stretching C-H), 1454 and 1413 (m, bending -C-H), 319 (m, stretching Au-Cl). MALDI MS m/z (%): 502.3 $[M]^+$ (58.0). Anal. calcd. (%) for $C_{14}H_{29}AuClIN_3P$ (629.69): C, 26.70; H, 4.64; N, 6.67. Found: C, 26.34; H, 5.03; N, 6.66.

IV.2.2.3. Synthesis of the gold complexes $[AuCl(PTA-R)_2]X_2$

To a suspension of $[AuCl(PTA-CH_2-(CH_2)_6-CH_3)]I$ (0.15 mmol, 0.095 g) or $[AuCl(PTA-CH_2-CH_2-(CF_2)_5-CF_3)]TfO$ (0.15 mmol, 0.133 g) in acetone (15 mL) the corresponding alkylated PTA (La or Lb) (0.15 mmol) was added. The suspension was stirred for 5 h at room temperature. The resulting white solid was filtered, washed with diethyl ether and dried in air and finally stored at 5 °C.

$[AuCl(PTA-CH_2(CH_2)_6CH_3)_2]I_2$ (2a). Yield: 60%, white solid. 1H NMR (400 MHz, $dmsO-d_6$, 25 °C): δ = 5.18 and 4.84 (AB system, J_{AB} = 11.2 Hz, 8H, N^+CH_2N), 4.67 (s, 4H, N^+CH_2P), 4.65–6.40 (AB system, 4H, NCH_2N), 4.40–3.90 (m, 4H, NCH_2P), 2.91 (t, J = 7.6 Hz, 4H, N^+CH_2R), 1.71 (m, 4H, CH_2), 1.27 (m, 20H, CH_2), 0.86 (t, J = 6.8 Hz, 6H, CH_3) ppm. ^{31}P NMR (162 MHz, $dmsO-d_6$, 25 °C): δ = -57.8 (s) ppm. $^{13}C\{^1H\}$ NMR (101 MHz, $dmsO-d_6$, 25 °C): δ = 81.6 (s, 4C, N^+CH_2N), 74.6 (s, 2C, NCH_2N), 58.6 (s, 2C, N^+CH_2R), 48.5 (m, 2C, N^+CH_2P), 42.5 (s, 4C, NCH_2P), 31.7 (s, 2C, $C_{intrachain}$), 29.1 (s, 2C, $N^+CH_2CH_2R$), 28.7 (s, 2C, $C_{intrachain}$), 25.2 (s, 2C, $C_{intrachain}$), 22.5 (s, 4C, $C_{intrachain}$), 14.5 (s, 2C, CH_3) ppm. IR ν_{max}/cm^{-1} : 2923 and 2853 (m, stretching C-H), 1454 and 1417 (m, bending -C-H). Anal. calcd. (%) for $C_{28}H_{58}AuClI_2N_6P_2$ (1026.97): C, 32.75; H, 5.69; N, 8.18. Found: C, 33.08; H, 5.93; N, 8.51.

$[AuCl(PTA-CH_2CH_2(CF_2)_5CF_3)_2](TfO)_2$ (2b). Yield: 64%, white solid. 1H NMR 206 (400 MHz, $dmsO-d_6$, 25 °C): δ = 5.16 and 4.94 (AB system, J = 11.6 Hz, 8H, N^+CH_2N), 4.58 (m, 4H, N^+CH_2P), 4.51 and 4.32 (AB system, J = 12.8 Hz, 4H, NCH_2N), 4.14 (m, 4H, NCH_2P), 3.99 (m, 4H, NCH_2P), 3.30 (m, 4H, N^+CH_2R), 2.94 (m, 4H, CH_2) ppm. ^{31}P NMR (162 MHz, $dmsO-d_6$, 25 °C): δ = -59.7 ppm. $^{13}C\{^1H\}$ NMR (101 MHz, $dmsO-d_6$, 25 °C): δ = 120.3–107.8 (m series, 12C, $-CH_2-CF_2-CF_2-$, $-CH_2-CF_2-CF_2-CF_2-$, Biomedicines 2021, 9, x FOR PEER REVIEW 6 of 23- $CH_2-(CF_2)_2-CF_2-$, $-CH_2-(CF_2)_3-CF_2-$, $-CH_2-(CF_2)_4-CF_2-CF_3$), 79.5 (s, 4C, N^+CH_2N), 68.9 (s, 2C, NCH_2N), 52.7 (s, 2C, N^+CH_2P), 52.7 (s, 2C, N^+CH_2R), 47.0 (m, 4C, NCH_2P), 21.9 (d, J_{CF} = 21.0 Hz, 2C, $N^+CH_2CH_2CF_2$) ppm. $^{19}F\{^1H\}$ NMR (376 MHz, $dmsO-d_6$, 25 °C): δ = -77.8 (s, TfO^-), -80.2 (m, CF_3), -112.8 (s, CF_2), -121.7 (s, CF_2), -122.4 and -122.6 (s, CF_2), -125.8 (s, CF_2) ppm. IR ν_{max}/cm^{-1} : 2997 (w, stretching C-H), 1423 (w, bending -C-H), 1227 (s, stretching C-F), 1144 (s, asymmetric stretching C-F), 325 (w, stretching Au-Cl). MALDI MS m/z (%): 504.5 $[PTA-R]^+$ (100), 736.5 $[M-AuCl(PTA-R)]^+$ (32.77). Anal. calcd. (%) for $C_{30}H_{32}AuClF_{32}N_6O_6P_2S_2$ (1538.01): C, 23.41; H, 2.10; N, 5.46; S, 4.17. Found: C, 23.58; H, 2.15; N, 5.71; S, 4.53.

IV.2.2.4. Synthesis of the gold complexes $[Au(R'S)(PTA-R)]X$

To a solution of 2-mercaptopyridine (0.20 mmol) in ethanol under argon atmosphere, NaOEt was added (0.22 mmol). The solution was stirred for 15 min. Maintaining inert atmosphere, $[AuCl(tht)]$ (0.20 mmol, 0.064 g) was added and the suspension formed was stirred for 2 h. Then

the resulting solid and the solution were separated by removing the liquid phase. The solid, settled on the bottom of the schlenk, was washed two times with ethanol. After removal of ethanol, the corresponding alkylated PTA (La or Lb) was added in acetone (15mL). The mixture was stirred overnight, and the solution was evaporated, precipitated with diethyl ether, and filtered. The resulting solid was dried in air and stored at low 5 °C.

[Au(C₅H₅NS)(PTA-CH₂(CH₂)₆CH₃)]I (3a). Yield: 55%, yellow solid. ¹H NMR (300 MHz, dms_o-d₆, 25 °C): δ = 7.97 (d, J = 3.6 Hz, 1H, H₆), 7.42–7.32 (m, 2H, H_{4,5}), 6.81 (t, J = 6.2 Hz, 1H, H₃), 5.07 and 4.87 (AB system, J_{AB} = 16 Hz, 4H, N⁺CH₂N), 4.69 (s, 2H, N⁺CH₂N), 4.58–4.14 (m, 8H, NCH₂N⁺NCH₂P), 2.93 (m, 2H, N⁺CH₂R), 1.7 (m, 2H, CH₂), 1.30 (m, 10H, CH₂), 0.86 (t, J = 6.8 Hz, 3H, CH₃) ppm. ³¹P NMR (121.45 MHz, dms_o-d₆, 25 °C): δ = -36.8 ppm. δ = ¹³C{¹H} NMR (75.4 MHz, dms_o-d₆, 25 °C): δ = 136.9, 129.1 and 116.5 (s, C₅H₅S), 80.1 and 79.1 (s, 2C, N⁺CH₂N), 69.1 (d, J = 24 Hz, 1C, N⁺CH₂P), 61.8 (s, 1C, N⁺CH₂R), 48.1 (d, J = 10 Hz, 2C, NCH₂P), 31.6 (s, 1C, C_{intra-chain}), 28.9 (s, 2C, C_{intra-chain}), 26.4 (s, 1C, C_{intra-chain}), 22.5 (s, 1C, C_{intra-chain}), 19.5 (s, 1C, N⁺CH₂CH₂R), 14.4 (s, 1C, CH₃) ppm. Anal. calcd. (%) for C₁₉H₃₃AuI₄N₄PS (704.40): C, 32.40; H, 4.72; N, 7.95; S, 4.40. Found: C, 23.58; H, 2.15; N, 5.71; S, 4.53.

[Au(C₅H₅NS)(PTA-CH₂CH₂(CF₂)₅CF₃)](TfO) (3b). Yield: 50%, yellow solid. ¹H NMR (400 MHz, dms_o-d₆, 25 °C): δ = 8.22 (d, J = 4.3 Hz, 1H, H₆), 7.57 (m, 1H, H₄), 7.49 (m, 1H, H₃), 7.07 (t, J = 5.6 Hz, 1H, H₅), 5.24–4.99 (m, 4H, NCH₂N), 4.77–4.70 (m, 2H, N⁺CH₂P), 4.58–4.54 (m, 2H, NCH₂N), 4.39–4.13 (m, 4H, NCH₂P), 3.0 (m, 2H, CH₂-CF₂). ³¹P{¹H} NMR (162 MHz, dms_o-d₆, 25 °C): δ = -36.8 (s) ppm. ¹³C{¹H} NMR (75.4 MHz, dms_o-d₆, 25 °C): δ = 167–110.4 (m series, 6C, -CH₂-CF₂-CF₂-, -CH₂-CF₂-CF₂-CF₂-, -CH₂-(CF₂)₂-CF₂-, -CH₂-(CF₂)₃-CF₂-, -CH₂-(CF₂)₄-CF₂-CF₃), 133.6, 127.8 and 119.3 (s, C₅H₅NS), 80.2 (s, 2C, N⁺CH₂N), 68.9 (s, 1C, NCH₂N), 49.5 (s, 1C, N⁺CH₂R), 56.1 (d, J = 12.8 Hz, 1C, N⁺CH₂P), 47.5 (d, J = 14.3 Hz, 2C, NCH₂P), 21.9 (t, JCF = 20.7 Hz, 1C, N⁺CH₂CH₂R) ppm. ¹⁹F{¹H} NMR (376 MHz, dms_o-d₆, 25 °C): δ = -77.8 (s, TfO⁻), -80.1 (m, CF₃), -112.7 (m), -121.67 (s), -122.6 (m), -125.7 (m) ppm. Biomedicines 2021, 9, x FOR PEER REVIEW 7 of 23. Anal. calcd. (%) for C₂₀H₂₀AuF₁₆N₄O₃PS₂ (960.44): C, 25.01; H, 2.10; N, 5.83; S, 6.68. Found: C, 25.29; H, 1.94; N, 5.18; S, 6.74.

IV.2.2.5. Distribution coefficient (*log D*_{7,4})

The n-octanol-water coefficients of the phosphane derivatives were determined as previously reported using a shake-flask method [34]. Briefly: Buffered-saline distilled water (100 mL, phosphate buffer [PO₄³⁻] = 10 mM, [NaCl] = 0.15 M, pH 7.4) and n-octanol (100 mL) were shaken together for 72 h to allow saturation of both phases. 1 mg of the complexes was dissolved in 5 mL of the aqueous phase and 5 mL of the organic phase were added, mixing for 10 min. The concentration of the complexes in the organic and aqueous phases were then determined using UV absorbance spectroscopy. $\log D_{7,4} = \log\{\frac{\text{compound(organic phase)}}{\text{compound(aqueous phase)}}\}$.

IV.2.2.6. Solution chemistry

The stability of the gold complexes has been analyzed by absorption UV spectroscopy recorded on a Thermo Scientific spectrophotometer. Solutions of the new complexes (6 mM in DMSO) were diluted with PBS to a final concentration of 3×10^{-5} M in PBS (pH = 7.4). The samples were then incubated at 37 °C and then monitored measuring the electronic spectra over 24 h.

IV.2.2.7. Cell culture, cell treatment and cytotoxicity determination

Human Caco-2 cell line (TC7 clone) was kindly provided by Dr. Edith Brot-Laroche (Université Pierre et Marie Curie-Paris 6, UMR S 872, Les Cordeliers, France). Human fibroblast cells were kindly provided by Dr. Julio Montoya (Unidad de Bioquímica, Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza, Spain). Caco-2 cells (passages 40–70) and fibroblasts (passages 10–30) were maintained in a humidified atmosphere of 5% CO₂ at 37 °C. Cells were grown in Dulbecco's Modified Eagles medium (DMEM) (Gibco Invitrogen, Paisley, UK) supplemented with 20% fetal bovine serum (FBS), 1% non-essential amino acids, 1% penicillin (1000 U/mL), 1% streptomycin (1000 µg/mL) and 1% amphotericin (250 U/mL). The cells were passaged enzymatically with 0.25% trypsin-1 mM EDTA. Caco-2 cells were sub-cultured on 25 cm² plastic flasks at a density of 1.2×10^4 cells/cm², while fibroblasts were sub-cultured on 75 cm² plastic flasks at a density of 1×10^4 cells/cm². Culture medium was replaced every 2 days.

Gold complex was diluted in dimethyl sulfoxide (DMSO) to a stock solution at 20 mM and then re-diluted to a working solution at 2.5 mM before diluting it in cell culture medium to treat cells at desired concentrations. A range of concentrations of complex 0.75–25 µM in Caco-2 and 1.25–20 µM in fibroblasts was used to determine IC₅₀ values.

The influence of hyperthermia was studied by incubating cells at 40 °C for 1 h immediately after treating them with the gold complexes.

For cytotoxicity screening assays, Caco-2 cells were seeded in 96-well plates at a density of 4×10^3 cells/well. Culture medium was replaced with medium containing drug panel 24 h post-seeding and cells were incubated for 72 h. In fibroblasts, culture medium containing metal gold complexes was added 10 days post-seeding. Antiproliferative effect was measured with MTT assay as previously described by Mármol et al. [16]. Absorbance at 540/620 nm was measured with SPECTROstar Nano (BMG Labtech). To determine the selectivity index (SI) the IC₅₀ value in fibroblasts was divided by IC₅₀ value in Caco-2, obtaining a ratio cancerous/normal cells toxicity.

IV.2.2.8. Apoptosis measurement

Caco-2 cells were seeded in 75 cm² flasks at a density of 1×10^4 cells/cm² and then exposed to drug panel for 48 h, then collected and stained with Annexin V-FITC and propidium iodide according to manufacturer's instruction. Cells were then transferred to flow cytometry tubes and washed twice with phosphate saline buffer (PBS), followed by

a resuspension in 100 μL of annexin V binding buffer (100 mM Hepes/NaOH pH 7.4, 140 nM NaCl, 2.5 mM CaCl_2). 5 μL annexin V-FITC and 5 μL propidium iodide (PI) were added to each tube. After 15 min of incubation at room temperature covered from light, 400 μL of annexin binding buffer were added to each sample and signal intensity was analyzed within 1 h with BECKMAN COULTER GALLIOS (Brea, CA, USA). Data were analyzed with BD FACSDivaTM.

IV.2.2.9. Propidium Iodide staining of DNA content and cell cycle analysis

Caco-2 cells were seeded in 25 cm^2 flasks at a density of 1×10^4 cells/ cm^2 and 24 h post-seeding, were exposed to drug panel for 48 h. Cells were fixed as described by Sánchez-de-Diego et al. [15] before staining them with 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PI solution. Signal intensity was analyzed with a BECKMAN COULTER GALLIOS (Brea, CA, USA) equipped with a blue solid diode laser (488 nm) and a red solid diode laser (635 nm), collecting fluorescence with a 620 nm long pass filter. Cell distribution was displayed on a linear scale and analyzed with ModFit LTTM verity software, which determined the percentage of cells in every cycle phase.

IV.2.2.10. Mitochondrial membrane potential assay by flow cytometry

Caco-2 cells were seeded in 75 cm^2 flasks at a density of 1×10^4 cells/ cm^2 and 24 h post-seeding medium was replaced with medium containing drug panel and incubated for 48 h. Then, cells were washed twice and resuspended in PBS at a concentration of 106 cells/mL before incubation with 5 μL of 10 μM 1,1',3,3,3'-hexamethylindodicarbocyanine iodide (DiIC1). After 15 min incubation at 37 $^\circ\text{C}$, 400 μL were added and fluorescence was measured at excitation wavelength of 633 nm and emission of 658 nm with BECKMAN COULTER GALLIOS (Brea, CA, USA) equipped with a blue solid diode laser (488 nm) and a red solid diode laser (635 nm).

IV.2.2.11. Determination of caspase 3 and p53 proteins

Caco-2 cells were seeded in 75 cm^2 flask at a density of 1×10^4 cells/ cm^2 and, 24 h later, exposed to drug panel for 48 h. Then cells were collected and processed following instructions by Sánchez-de-Diego et al. [15] Finally, 50 μL of every sample were incubated with 5 μL anti-active caspase-3 (BD Pharmigen, Clone C92-605) and 5 μL p53 antibody (Miltenyi, Clone REA609). Fluorescence was measured by flow cytometry using a BECKMAN COULTER GALLIOS (Brea, CA, USA) equipped with a blue solid diode laser (488 nm) and a red solid diode laser (635 nm). For caspase-3 determination excitation wavelength was set at 488 nm and emission at 525 nm and for p53 analysis excitation at 635 nm and emission at 660 nm.

IV.2.2.12. Intracellular levels of reactive oxygen species (ROS)

Caco-2 cells were seeded in 96-wells plate at a density of 4×10^3 cells/well and intracellular ROS levels were determined with the dichlorofluorescein assay [35]. Cells were exposed to drug panel for 1, 3 and 24 h and then incubated with $20 \mu\text{M}$ 2'-7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) in DMEM. The generation of oxidized derivative DCF was monitored by measuring the increase of fluorescence for 1 h, at an emission wavelength of 520 nm and excitation of 485 nm, with a FLUOstar Omega (BMG Labtech, Ortenberg, Germany) multiplate reader. Results were expressed as percentage of fluorescence respect to control, considering fluorescence intensity as a reflection of intracellular ROS levels.

IV.2.2.13. Thioredoxin reductase 1 (TrxR1) activity assay

Recombinant Human TrxR1 (Sigma-Aldrich SRP6081, St. Louis, MO, USA) was incubated in a 96 well plate with different concentration of Au complex previously dissolved in $25 \mu\text{L}$ of PBS at pH 7.4. The cell solution was incubated in shake motion for 5 min at 37°C . After incubation time, procedure in Thioredoxin Reductase Assay Kit (Sigma-Aldrich CS0170, St. Louis, MO, USA) was followed. Finally, reaction was started by adding $6 \mu\text{L}$ DNTB and absorbance at 405 nm was recorded every 30 s for 22 min as a measure of Thioredoxin Reductase Activity.

IV.2.2.14. Statistical analysis

All assays were performed at least three times. Data are presented as mean \pm SD. Means were compared using one-way analysis of variance (ANOVA). Significant differences at $p < 0.05$ were compared using a Bonferroni's Multiple Comparison Test. The statistical analysis and the graphics were performed using the GraphPad Prism Version 5.02 program on a PC computer.

IV.2.3. Results and discussion

IV.2.3.1. Synthesis of the PTA molecules

The N-alkyl PTA molecule [PTA- $\text{CH}_2(\text{CH}_2)_6\text{CH}_3$]I (**La**) was synthesized by reacting 1,3,5-triaza-7-phosphaadamantane (PTA) with 1-iodooctane in acetone degassed under argon for a long period of time. The initial use of heat, in order to improve the reaction rate, lead to PTA decomposition. After stirring for 3 days at room temperature, an air-stable solid precipitated from solution, which was isolated and characterized without further purification. Similar [PTA-R]I phosphanes with longer chains ($\text{R} = \text{C}_n\text{H}_{2n+1}$, $n = 12, 16, 18$) have been previously synthesized [36] under continuous bubbling of argon for 20 h. The occurrence of the reaction was monitored by means of ^1H NMR and $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ NMR. In the $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ NMR spectrum a singlet shifted downfield from -102 ppm in the original PTA to around -85 ppm (alkylated PTA) was observed. The ^1H NMR shows a typical pattern for N-alkylated PTA molecules [34,36–39], due to the splitting of

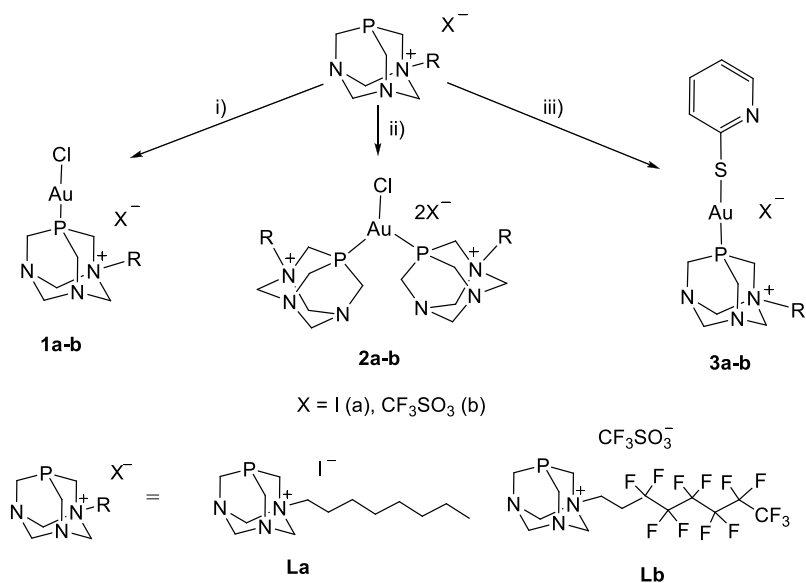
different signals consequence of the reduction of the symmetry in the PTA molecule and the appearance of the signals related to the aliphatic chain (see experimental).

Any attempt to N-alkylation with the corresponding perfluorinated chain, by reacting PTA with 1H,1H,2H,2H-Perfluoro-1-iodooctane, turned out to be infructuous, leading to PTA oxidation. However, the use of more reactive alkyl triflates, such as TfOCH₂CH₂(CF₂)₅CF₃, which undergo facile displacement of the triflate anion via C-O bond cleavage [40], afforded [PTA-CH₂CH₂(CF₂)₅CF₃]TfO (**Lb**) in high yield. Similar NMR spectra to that found for **La** were obtained for **Lb**, although only the signals due to methylene groups –CH₂ α (3.20 ppm) and –CH₂ β (2.93 ppm) to quaternary nitrogen atom, are visible in the ¹H NMR spectrum. The IR spectrum gave additional evidence for the N-perfluorinated alkylation showing bands at 1224 and 1142 cm⁻¹, corresponding respectively to C-F bonds symmetric and asymmetric stretching frequencies. Besides, ¹⁹F{¹H} NMR showed six signals, due to the –(CF₂)₅CF₃ chain and ¹³C{¹H} NMR multiplets in the region of 121.3–108.2 ppm that correspond to 6C of the perfluorinated chain.

IV.2.3.2. Synthesis of gold(I) derivatives

Coordination of the phosphanes to gold(I) is achieved by the reaction of **La** and **Lb** with [AuCl(tht)] (tht = tetrahydrothiophene) (Scheme 1, (i)) after the displacement. The ¹H NMR spectra are markedly affected by the presence of the Au-Cl unit, similarly to related chloro gold(I) derivatives with alkylated PTA molecules [34,38]. Thus, the AB system corresponding to the methylene NCH₂N⁺ protons remains at a similar chemical shift, meanwhile the remaining protons appear as multiplets due to the overlap of doublets, displaced to low field in comparison to those of the free phosphanes. Downfield displacement is also detected in their ³¹P{¹H} NMR spectra in the relation to the corresponding free phosphane, which is more pronounced in **1a**, with a singlet resonance at δ = –30 ppm, being δ = –35.8 ppm for the related perfluorinated counterpart **1b**. The Au-Cl vibrations at around 333–320 cm⁻¹ are visible in their IR spectra and the corresponding molecular peaks are observed in the MALDI⁺ mass spectra, without the presence of additional peaks due to species obtained from an interchange between both anions.

The reaction of **La** or **Lb** with the corresponding chloro gold complexes **1a** and **1b** afforded [AuCl(PTA–R₂)]X₂ (**2a**, **2b**, Scheme 1, (ii)), where two phosphanes are coordinated to the Au-Cl unit in a trigonal disposition. Similar pattern than that found in the precursors is observed in their ¹H NMR spectra, with even higher signals overlapping. The ³¹P{¹H} NMR spectra display upfield displacement of the resonances with respect to the chlorine gold precursors. The Au-Cl vibration at 320 cm⁻¹ is only observed in the IR spectrum of complex **2b**, being the same band absent in complex **2a**. This fact could point to the existence of a fast anion interchange between chlorine and iodine in solution, affording the isolation of [AuI(PTA–R)₂]ClI. This occurrence can be confirmed with the MALDI⁺ experiment, since the presence of the peak with *m/z* of 594.7 can be assigned to the loss of [PTA–R]I and chlorine units.



Scheme 1. Synthesis of gold complexes. (i) [AuCl(tht)], (ii) [AuCl(PTA-R)]X, (iii) HSC₅NH₄ + NaOEt + [AuCl(tht)], then [PTA-R]X.

The synthesis of the thiolate complexes **3a** and **3b** was performed as previously reported by some of us [13]. So, starting from the insoluble oligomeric or polymeric $\{[Au(\text{thiolate})]_n\}$, prepared in situ by deprotonation of pyridine-2-thiol and subsequent addition of [AuCl(tht)], followed by the addition of the phosphanes once the subproducts were removed by decantation of the supernatant, afforded the new thiolate derivatives [Au(PTA-R)(SNC₅H₄)]X (X = I, **3a**; X = TfO, **3b**) (Scheme 1, (iii)), which were fully characterized by NMR, IR spectroscopy.

IV.2.3.3. Solution stability

The stability of the complexes was analyzed by UV-vis absorption spectroscopy under physiological relevant conditions. Solutions suitable for spectrophotometric analyses were prepared by diluting dimethylsulfoxide (DMSO) stock solutions of the complexes with PBS (phosphate buffered saline) at pH = 7.4. The resulting solutions were monitored over 24 h at 37 °C. The UV-visible absorption spectra of the complexes show an absorption maximum at ca. 210–220 nm (Figure S39), which can be tentatively assigned to the intraligand transition characteristic of the phosphane, as similar absorption bands are also observed in related Au(PTA) complexes [18]. For all the complexes no changes were observed in the UV-vis absorption spectra with time, without any changes in shape or displacement in the absorbance maximum (no apparent red- or blue shift), in addition to lacking absorbance at around 500 nm (characteristic of gold reduction), thus indicating a substantial stability in the selected conditions.

IV.2.3.4. Lipophilicity

These new derivatives are mono or dicationic species, and subsequently they belong to the class of delocalized lipophilic cations (DLCs) [41], characterized by a delocalized positive charge, lipophilic character and rigid structure. These molecules display rapid accumulation in mitochondria leading to alterations in their functions, in response to the negative charge inside

the transmembrane potentials [42,43]. In addition, tuning the lipophilicity and hydrophilicity character of the DLC moieties, can selectively target cancer cells due to their higher mitochondrial membrane potential compared to normal cells [44]. Previous studies based on cationic gold(I) derivatives have revealed the relevance of the lipophilicity in the cellular uptake and cytotoxicity, and how intermediate values in the lipophilic character lead to more promising conditions to avoid severe side-effects [7,45,46].

The lipophilicity can be measured by the partition coefficient water/n-octanol, logD, by experimental procedures such as the shake flask method, which affords the distribution of the drug between an equal amount of n-octanol and water (or buffered aqueous solution). The new PTA derivatives display values of logD (at pH = 7.4) in the range -0.12 to 0.82 (Table 1), being higher in the cases of the polyfluorinated phosphanes that implies higher lipophilicity in comparison with the alkylated counterparts.

Table 1. Distribution coefficients and IC₅₀ (μM) ^[a] values of the complexes on Caco-2/TC7 cells.

Complex	logD _{7.4}	Caco-2/TC7	
		37 °C	40 °C
La		49.32 ± 0.02	47.08 ± 0.92
Lb		27.23 ± 7.56	23.97 ± 6.60
1a	0.08	16.41 ± 3.11	13.04 ± 4.24
1b	0.63	5.98 ± 1.80	4.46 ± 0.79
2a	-0.12	12.34 ± 1.18	10.39 ± 0.51
2b	0.82	10.65 ± 0.60	9.00 ± 0.39
3a	0.35	2.49 ± 0.31	2.05 ± 0.32
3b	0.44	5.11 ± 1.25	4.26 ± 0.34

^[a] Mean ± SE of at least three determinations.

IV.2.3.5. Biological studies

The potential anticancer properties of these new gold(I) derivatives were analyzed using human carcinoma cell line Caco-2. The cytotoxic effect of the gold complexes on these cells was evaluated by determining IC₅₀ values (necessary concentration to reduce two-fold cell viability) (Table 1) and then analyzing induced cell death and potential cellular target.

IV.2.3.5.1. Antiproliferative activity of gold(I) derivatives with PTA

The results showed that our compounds exhibit an IC₅₀ in the range of other gold complexes previously studied [47–49], thus they have potential antiproliferative properties. Although every tested compound suffered a decrease in the IC₅₀ value when cells were incubated at 40 °C for 1 h, this decrease was especially significant for **2a** and **2b**. However, the presence of the perfluorinated chain in the complexes entailed significance differences in the IC₅₀ values compared to the alkylated counterparts. IC₅₀ decreased in **Lb**, **1b** and **2b**, but increased in **3b** (Table 1).

A correlation between lipophilicity and cytotoxicity was found, obtaining higher IC₅₀ values in compounds **1a** and **2a**, which display the lower logD values. Higher lipophilicity correlates with more cytotoxic compounds and species **3a** and **3b**, with the lower IC₅₀ values, showed intermediate lipophilic character (Table 1). When increasing lipophilic character, with increasing

logD values, the activities of the complexes describe an inverted U-shaped curve (Figure S40, Supplementary). Accordingly, the highest anticancer activity should be expected for complexes with intermediate logD values, around 0.4.

Complexes **3a** and **3b** triggered the best activity, exhibiting the lowest IC₅₀ values despite being the only couple of complexes that did not show a lower value for the perfluorinated chain complex and only a slight decrease in the IC₅₀ values in hyperthermia conditions. Contrary, complexes **2a** and **2b** showed worse IC₅₀ values, but the trend follows as expected a decrease in the activity of **2b** in comparison to **2a**, since **Lb** showed higher toxicity than **La** and a significant reduction of IC₅₀ values with hyperthermia. To elucidate the relationship in the activity of complex pairs in deep, the cytotoxic activity in relation to selectivity of **2a**, **2b**, **3a** and **3b**, was analyzed.

IC₅₀ values in fibroblasts showed that complexes **3a** (12.11 ± 0.11 μM) and **3b** (12.82 ± 1.48 μM) had a selectivity index (SI) of 4.86 and 2.51, respectively, thus being more selective towards cancerous cells than complexes **2a** (13.47 ± 0.97 μM) and **2b** (11.59 ± 1.05 μM), whose SI were 1.09 and 1.72, respectively (Table 2). Moreover, at their IC₅₀ values in Caco-2, **3a** (2.5 μM) and **3b** (5.1 μM) did not compromise fibroblasts viability. On the contrary, complexes **2a** and **2b** caused a nearly two-fold reduction in the viability of fibroblasts when treated at 12.3 μM and 10.5 μM, respectively. These results suggest that, unlike **2a** and **2b**, **3a** and **3b** could selectively exert their cytotoxic effect in cancerous cells without causing several side effects in normal cells.

Table 2. Selectivity of complexes **2a**, **2b**, **3a**, and **3b** towards cancerous cells. IC₅₀ (μM) [a] values on fibroblasts are presented. Selectivity Index (SI) was calculated as IC₅₀ fibroblasts/IC₅₀ Caco-2.

Complex	Fibroblasts	
	IC ₅₀	SI
2a	13.47 ± 0.97	1.09
2b	11.59 ± 1.05	1.72
3a	12.11 ± 0.11	4.86
3b	12.82 ± 1.48	2.51

[a] Mean ± SE of at least three determinations.

Taking into consideration these analyses, we chose complexes **3a** and **3b** to dig into the study of the influence of temperature and perfluorinated chains in the cytotoxic and anticancer properties of these gold compounds.

IV.2.3.5.2. Cell death induced by gold(I) derivatives with PTA

Since the complexes compromised cell proliferation, different flow cytometry determinations were performed in order to assess the type of cell death that these gold compounds induced in Caco-2 cells, as well as confirm the previously suggested influence of temperature and fluorinated chains in the cytotoxic capacity of the complexes.

First, Annexin V/PI double staining showed that gold compounds were capable of inducing apoptosis in Caco-2 cells after 48 h of treatment, with prevalence of cells in early apoptotic stages (Figure 1). Moreover, statistical analysis of the results showed that 1 h of incubation at

40 °C immediately after exposure to gold complexes, significantly increased the amount of cells in early and late apoptosis, and this effect was also observed in complex **3b** compared to **3a** (Figure 1).

One of the first steps that leads to apoptosis is mitochondrial depolarization. Throughout the apoptotic process the mitochondrion undergoes the redistribution of hydrogen ions, reducing $\Delta\Psi_m$, which induce series of structural changes that finally lead to cytochrome c release. Results from DilC1(5) staining showed that both complexes **3a** and **3b** induced mitochondrion depolarization, since the number of Caco-2 cells with reduced $\Delta\Psi_m$ increased after 48 h exposure to both gold compounds (Figure 2). In addition, statistical analysis brought significant differences between hyperthermia and normothermia, as well as with perfluorinated and alkylated complexes (Figure 2). This confirmed results from Figure 1, suggesting that complex **3b** exert a higher cytotoxic effect than **3a** and that 1 h incubation with complexes at 40 °C increase the apoptotic effect, regardless of the presence of perfluorinated or alkylated chains in gold compounds.

Mitochondrial depolarization and cytochrome c release finally leads to caspase-3 activation, which starts the apoptotic process. Flow cytometry determinations confirmed previous results, since incubation with both gold complexes for 48 h increased the percentage of cells with active caspase-3 (Figure 3). This suggests that **3a** and **3b** could induce caspase-3 activation upon $\Delta\Psi_m$ reduction, finally leading to apoptosis in Caco-2 cells. Moreover, significant changes were found again with hyperthermia treated cells and with the perfluorinated-chain compound treated cells.

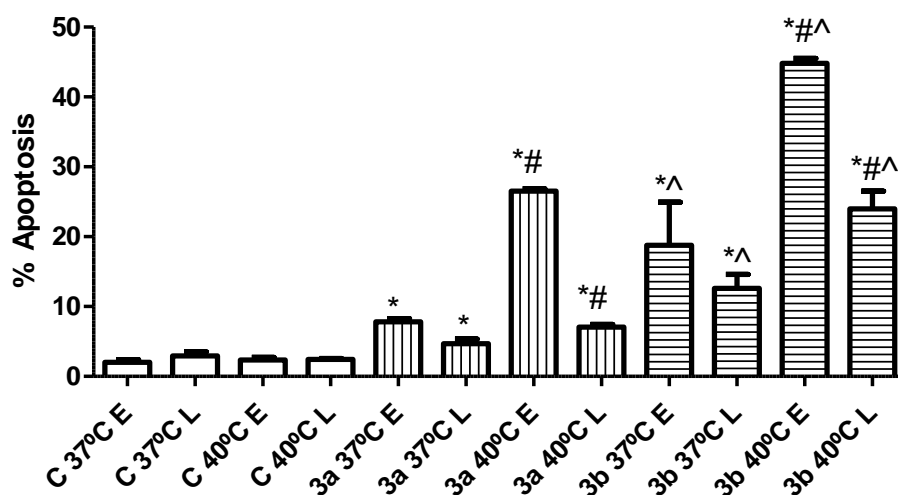


Figure 1. Caco-2 cell death studies by flow cytometry after incubation with **3a** (5.0 μM) and **3b** (10.2 μM) for 48 h at 37 °C or 1 h at 40 °C plus 47 h at 37 °C. Results of apoptotic state are expressed as percentage of cells going through early (E) and late (L) apoptosis for each condition. * $p < 0.05$ compared to respective temperature control. # $p < 0.05$ compared to equivalent treatment at 37 °C. ^ $p < 0.05$ compared to alkylated counterpart at same temperature.

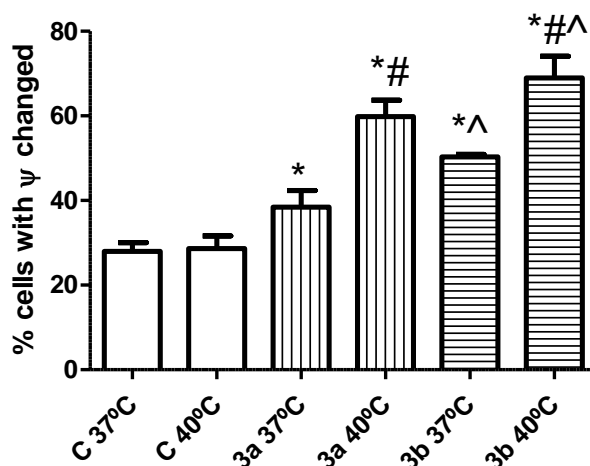


Figure 2. Percentage of Caco-2 cells with disturbed mitochondrial potential (Ψ) after incubation with **3a** (5.0 μ M) and **3b** (10.2 μ M) for 48 h at 37 °C or 1 h at 40 °C plus 47 h at 37 °C. * $p < 0.05$ compared to respective temperature control. # $p < 0.05$ compared to equivalent treatment at 37 °C. ^ $p < 0.05$ compared to alkylated counterpart at same temperature.

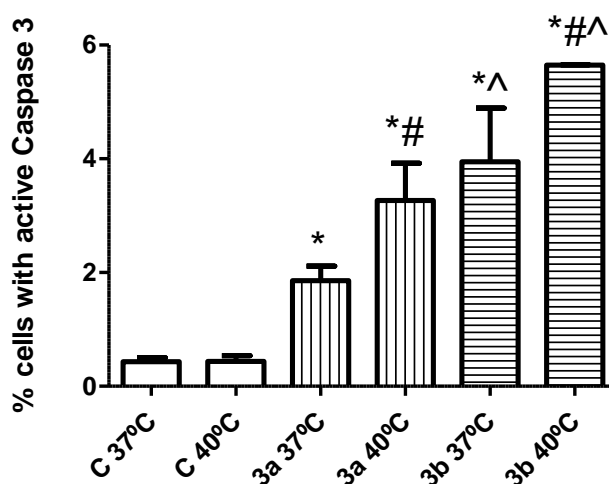


Figure 3. Percentage of Caco-2 cells with presence of active caspase-3 after incubation with **3a** (5.0 μ M) and **3b** (10.2 μ M) for 48 h at 37 °C or 1 h at 40 °C plus 47 h at 37 °C. * $p < 0.05$ compared to respective temperature control. # $p < 0.05$ compared to equivalent treatment at 37 °C. ^ $p < 0.05$ compared to alkylated counterpart at same temperature.

IV.2.3.5.3. Effect of gold(I) derivatives with PTA on cell cycle

Apoptosis events frequently are accompanied by cell cycle disturbances and previous studies with gold complexes suggested that treated cells may stop progression through cell cycle phases [18,50,51] at different checkpoints along them.

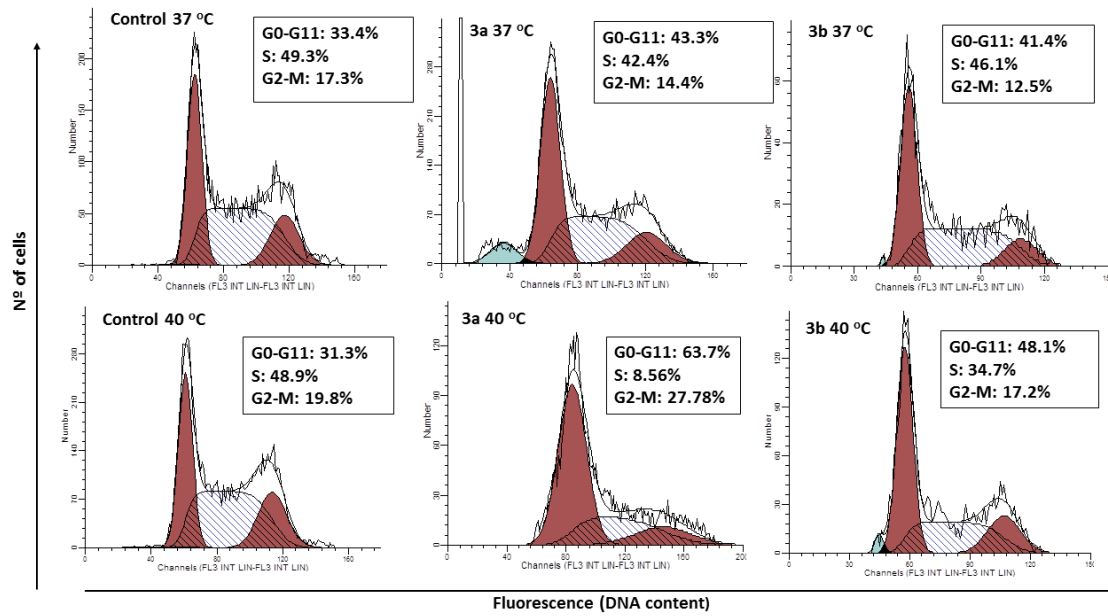


Figure 4. Flow cytometry histograms of PI stained Caco-2 cells after 48 h treatment with **3a** (5.0 μ M) and **3b** (10.2 μ M) at 37 °C or 1 h at 40 °C plus 47 h at 37 °C. Distribution of cells along cell cycle phases.

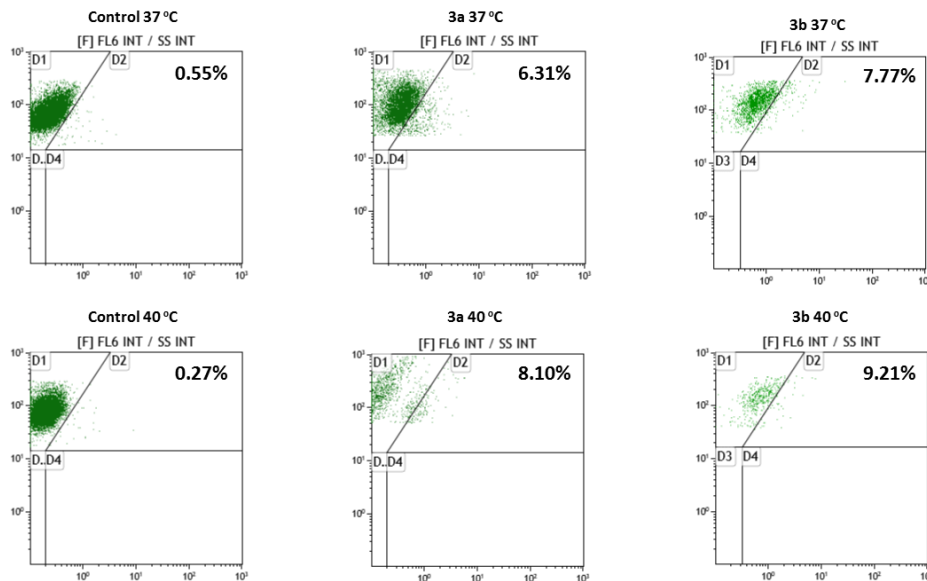


Figure 5. Flow cytometry cytograms of anti-p53 fluorescence in Caco-2 cells after exposure to **3a** (5.0 μ M) and **3b** (10.2 μ M) for 48 h at 37 °C or for 1 h at 40 °C plus 47 h at 37 °C. Quadrant D2 correspond to cells with active p53, which percentage respect to total cells is represented.

Analysis by flow cytometry showed that after 48 h incubation with complexes **3a** and **3b** could disturb normal progression through cell cycle, increasing amount of cells in G₀-G₁ phase (Figure 4). In addition, hyperthermia and fluorinated chains seemed to enhance G₁ phase arrest.

Along the cell cycle, cells go through different checkpoints that ensure order, integrity, and fidelity in the previous events before progress through cell cycle and promoting to the next phase [52]. One of the main checkpoint mechanisms in G₁ phase is led by p53, a transcription

factor that targets transcription of genes involved in G₁ arrest. Levels of p53 are regulated by MDM2, a ubiquitin ligase that ensures p53 proteasome-dependent turnover. When genotoxic stress is detected, this checkpoint response is started, activating upstream events that lead MDM2 activation thus promoting p53 accumulation and sustained G₁ arrest [53]. Moreover, p53 can induce apoptosis cell death in response to DNA damage [54]. Taking all this in consideration, the presence of p53 in cells treated with complexes **3a** and **3b** was determined, observing that these gold derivatives could induce p53 accumulation, increasing the number of cells with p53 with respect to non-treated cells (Figure 5). These results correlate with previous showed in Figure 4 and incubation with gold derivatives at hyperthermia increased p53 in cells, as well as polyfluorinated chains did compared to the alkylated counterpart (Figure 5).

IV.2.3.5.4. Effect of gold(I) derivatives with PTA on intracellular redox state

Previous studies with gold derivatives had shown disturbances in ROS balance when cancerous cells were treated with metal complexes [16,55,56], commonly increasing intracellular ROS levels, since different gold(I) derivatives have been proved to interact with thioredoxin reductase (TrxR) inhibiting its antioxidant activity [14,56]. Our results did not bring significant changes in intracellular ROS levels when cells were treated with complexes **3a** and **3b** for 1 h and 3 h, but a significant increase was observed when treated for 24 h with IC₅₀ values (Figure 6).

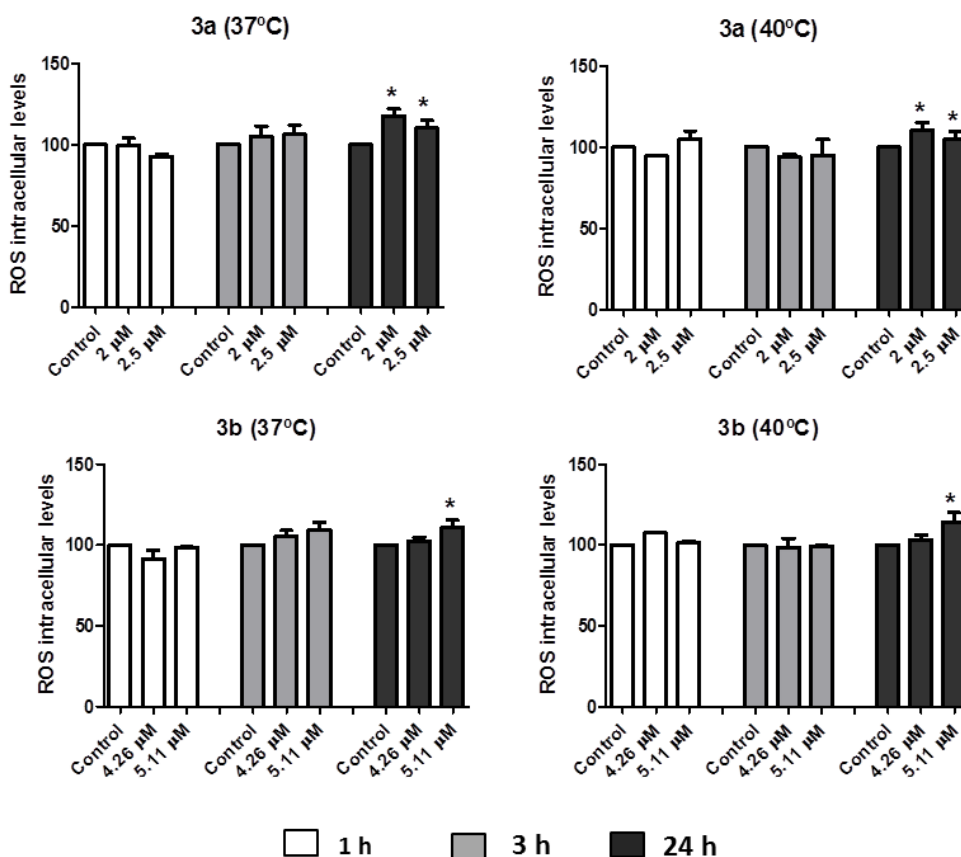


Figure 6. Measurements of ROS levels in Caco-2 cells after exposure to **3a** and **3b** complexes for 1, 3 or 24 h at 37 °C or hyperthermia, * $p < 0.05$ compared to its respective control.

To elucidate whether this ROS increase could be caused by TrxR, recombinant human TrxR was incubated with both derivatives at their respective IC₅₀ values, detecting an inhibition in TrxR activity (Figure 7). Therefore, our results suggest that these gold(I) derivatives could interact with TrxR, inhibiting its antioxidant activity, hence increasing intracellular ROS levels.

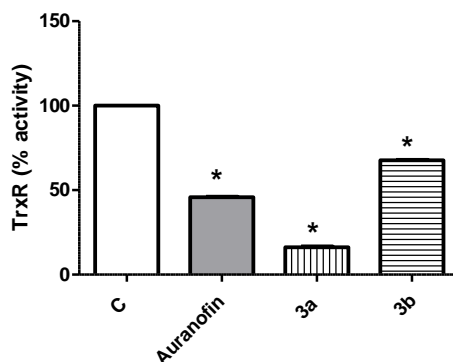
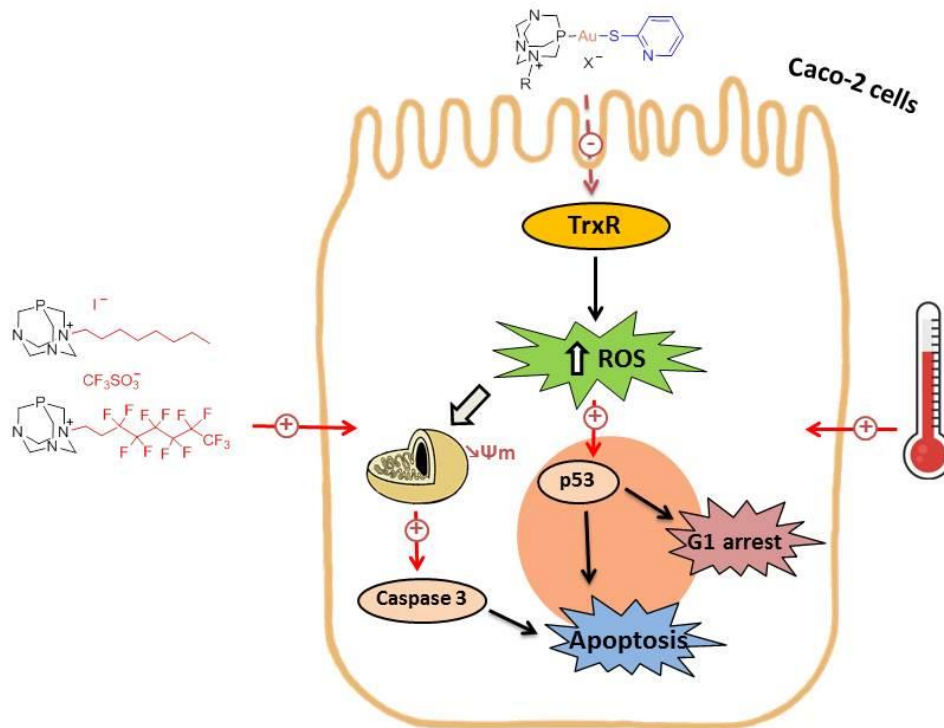


Figure 7. Inhibitory effect of auranofin (25 μ M), **3a** and **3b** complexes on Thioredoxin reductase 1 (TrxR1) at IC₅₀ concentrations. TrxR activity was measured as the increase of absorbance at 412 nm per minute. Values represent the percentage of activity related to control, * $p < 0.05$ compared to control.

IV.2.4. Conclusions

Two families of gold derivatives with phosphane ligands derived from 1,3,5-triaza-7-phosphaadamantane (PTA) functionalized with long hydrocarbon chains and with the homologous fluorinated chains were prepared with the purpose of knowing the influence of the fluorine atoms and an increase of the temperature, hyperthermia, in the activity. The studied gold(I) complexes showed antiproliferative effects on human colon carcinoma cells (Caco-2/TC7 cell line), probably by inhibiting cellular TrxR activity, causing a dysfunction in the intracellular redox state. This event produces disturbances in cell cycle by p53 activation. Finally, apoptosis is triggered through mitochondrial depolarization and the consequent activation of caspase-3. Moreover, the results suggest that this cytotoxic effect is enhanced by hyperthermia, obtaining lower IC₅₀ values and higher cell death rates when incubating cells for 1 h at 40 °C after the addition of the drug. The presence of perfluorinated chains appeared also to be important since gold(I) complexes with fluorinated chains brought higher cytotoxic results than their alkylated counterparts.



Graphical Abstract

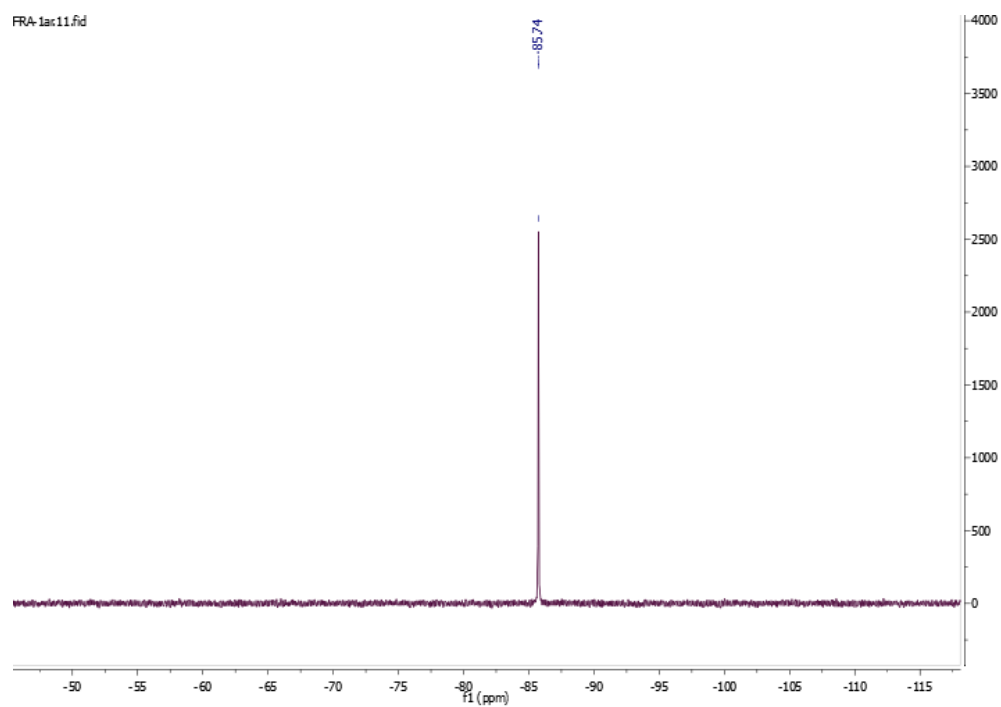
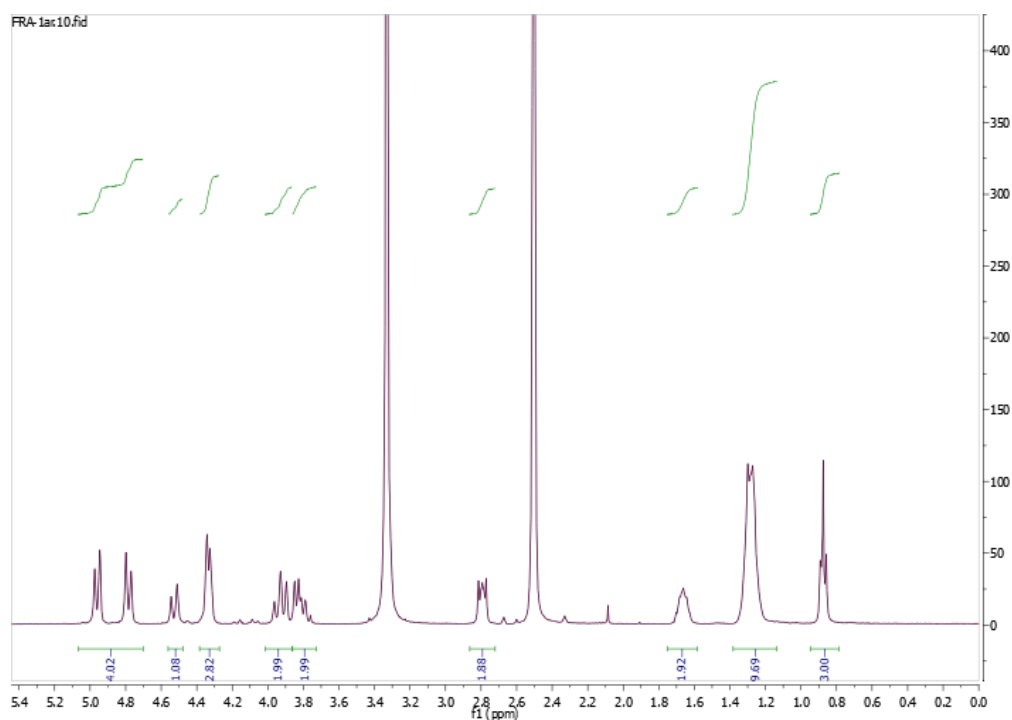
REFERENCES:

1. Roth, K.G.; Mambetsariev, I.; Kulkarni, P.; Salgia, R. The Mitochondrion as an Emerging Therapeutic Target in Cancer. *Trends Mol. Med.* **2020**, *26*, 119–134. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2019.06.009>.
2. Seyfried, T.N.; Flores, R.E.; Poff, A.M.; D'Agostino, D.P. Cancer as a metabolic disease: Implications for novel therapeutics. *Carcinogenesis* **2013**, *35*, 515–527. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgt480>.
3. Neuzil, J.; Dong, L.-F.; Rohlena, J.; Truksa, J.; Ralph, S.J. Classification of mitocans, anti-cancer drugs acting on mitochondria. *Mitochondrion* **2013**, *13*, 199–208. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2012.07.112>.
4. Panda, V.; Khambat, P.; Patil, S. Mitocans as Novel Agents for Anticancer Therapy: An Overview. *Int. J. Clin. Med.* **2011**, *2*, 515–529. <https://doi.org/10.4236/ijcm.2011.24086>.
5. Erxleben, A. Mitochondria-Targeting Anticancer Metal Complexes. *Curr. Med. Chem.* **2019**, *26*, 694–728. <https://doi.org/10.2174/0929867325666180307112029>.
6. Bindoli, A.; Rigobello, M.P.; Scutari, G.; Gabbiani, C.; Casini, A.; Messori, L. Thioredoxin reductase: A target for gold compounds acting as potential anticancer drugs. *Coord. Chem. Rev.* **2009**, *253*, 1692–1707. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2009.02.026>.
7. McKeage, M.J.; Maharaj, L.; Berners-Price, S.J. Mechanisms of cytotoxicity and antitumor activity of gold(I) phosphine complexes: The possible role of mitochondria. *Coord. Chem. Rev.* **2002**, *232*, 127–135. [https://doi.org/10.1016/s0010-8545\(02\)00048-6](https://doi.org/10.1016/s0010-8545(02)00048-6).
8. Barnard, P.J.; Berners-Price, S.J. Targeting the mitochondrial cell death pathway with gold compounds. *Coord. Chem. Rev.* **2007**, *251*, 1889–1902.
9. Zhang, J.M.; Zhang, B.X.; Li, X.M.; Han, X.; Liu, R.J.; Fang, J.G. Small molecule inhibitors of mammalian thioredoxin reductase as potential anticancer agents: An update. *Med. Res. Rev.* **2019**, *39*, 5–39. <https://doi.org/10.1002/med.21507>.
10. Arner, E.S.J.; Holmgren, A. Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. *Eur. J. Biochem.* **2000**, *267*, 6102–6109. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2000.01701.x>.
11. Rigobello, M.P.; Messori, L.; Marcon, G.; Agostina Cinellu, M.; Bragadin, M.; Folda, A.; Scutari, G.; Bindoli, A. Gold complexes inhibit mitochondrial thioredoxin reductase: Consequences on mitochondrial functions. *J. Inorg. Biochem.* **2004**, *98*, 1634–1641. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2004.04.020>.
12. Gutierrez, A.; Catiuela, C.; Laguna, A.; Gimeno, M.C. Bioactive gold(I) complexes with 4-mercaptoproline derivatives. *Dalton Trans.* **2016**, *45*, 13483–13490. <https://doi.org/10.1039/c6dt02000c>.
13. Atrian-Blasco, E.; Gascon, S.; Rodriguez-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*, 8562–8579. <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.7b01370>.
14. 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*, 96–102. <https://doi.org/10.1002/cmdc.200900370>.
15. Sanchez-de-Diego, C.; Marmol, I.; Perez, R.; Gascon, S.; Rodriguez-Yoldi, M.J.; Cerrada, E. The anticancer effect related to disturbances in redox balance on Caco-2 cells caused by an alkynyl gold(I) complex. *J. Inorg. Biochem.* **2017**, *166*, 108–121. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2016.11.009>.
16. Marmol, I.; Virumbrales-Munoz, M.; Quero, J.; Sanchez-De-Diego, C.; Fernandez, 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>.

17. Cerrada, E.; Fernandez-Moreira, V.; Gimeno, M.C. Gold and platinum alkynyl complexes for biomedical applications. *Adv. Organomet. Chem.* **2019**, *71*, 227–258.
18. Marmol, I.; Castellnou, P.; Alvarez, R.; Gimeno, M.C.; Rodriguez-Yoldi, M.J.; Cerrada, E. Alkynyl Gold(I) complexes derived from 3-hydroxyflavones as multi-targeted drugs against colon cancer. *Eur. J. Med. Chem.* **2019**, *183*. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.111661>.
19. Mora, M.; Gimeno, M.C.; Visbal, R. Recent advances in gold-NHC complexes with biological properties. *Chem. Soc. Rev.* **2019**, *48*, 447–462. <https://doi.org/10.1039/C8CS00570B>.
20. 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/10.1016/j.ejmech.2018.01.065>.
21. Diez-Gonzalez, S.; Nolan, S.P. Stereoelectronic parameters associated with N-heterocyclic carbene (NHC) ligands: A quest for understanding. *Coord. Chem. Rev.* **2007**, *251*, 874–883. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2006.10.004>.
22. Liu, W.K.; Gust, R. Update on metal N-heterocyclic carbene complexes as potential anti-tumor Metallodrugs. *Coord. Chem. Rev.* **2016**, *329*, 191–213. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2016.09.004>.
23. Mirzadeh, N.; Reddy, T.S.; Bhargava, S.K. Advances in diphosphine ligand-containing gold complexes as anticancer agents. *Coord. Chem. Rev.* **2019**, *388*, 343–359. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2019.02.027>.
24. Bertrand, B.; Williams, M.R.M.; Bochmann, M. Gold(III) Complexes for Antitumor Applications: An Overview. *Chem. Eur. J.* **2018**, *24*, 11840–11851. <https://doi.org/10.1002/chem.201800981>.
25. Fantin, V.R.; Berardi, M.J.; Scorrano, L.; Korsmeyer, S.J.; Leder, P. A novel mitochondriotoxic small molecule that selectively inhibits tumor cell growth. *Cancer Cell* **2002**, *2*, 29–42. [https://doi.org/10.1016/S1535-6108\(02\)00082-X](https://doi.org/10.1016/S1535-6108(02)00082-X).
26. Chretien, D.; Benit, P.; Ha, H.H.; Keipert, S.; El-Khoury, R.; Chang, Y.T.; Jastroch, M.; Jacobs, H.T.; Rustin, P.; Rak, M. Mitochondria are physiologically maintained at close to 50 degrees C. *PLoS Biol.* **2018**, *16*, e2003992. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2003992>.
27. Wang, D.; Huang, H.; Zhou, M.; Lu, H.; Chen, J.; Chang, Y.-T.; Gao, J.; Chai, Z.; Hu, Y. A thermoresponsive nanocarrier for mitochondria-targeted drug delivery. *Chem. Commun.* **2019**, *55*, 4051–4054. <https://doi.org/10.1039/C9CC00603F>.
28. Ruan, L.F.; Zhou, M.X.; Chen, J.; Huang, H.; Zhang, J.Y.; Sun, H.Y.; Chai, Z.F.; Hu, Y. Thermoresponsive drug delivery to mitochondria in vivo. *Chem. Commun.* **2019**, *55*, 14645–14648. <https://doi.org/10.1039/c9cc07538k>.
29. Clavel, C.M.; Nowak-Sliwinska, P.; Paunescu, E.; Dyson, P.J. Thermoresponsive fluorinated small-molecule drugs: A new concept for efficient localized chemotherapy. *Medchemcomm* **2015**, *6*, 2054–2062. <https://doi.org/10.1039/c5md00409h>.
30. Clavel, C.M.; Paunescu, E.; Nowak-Sliwinska, P.; Dyson, P.J. Thermoresponsive organometallic arene ruthenium complexes for tumour targeting. *Chem. Sci.* **2014**, *5*, 1097–1101. <https://doi.org/10.1039/c3sc53185f>.
31. Clavel, C.M.; Paunescu, E.; Nowak-Sliwinska, P.; Griffioen, A.W.; Scopelliti, R.; Dyson, P.J. Modulating the Anticancer Activity of Ruthenium(II)-Arene Complexes. *J. Med. Chem.* **2015**, *58*, 3356–3365. <https://doi.org/10.1021/jm501655t>.
32. Cabrera, S.; Navas, F.; Matesanz, A.I.; Maroto, M.; Riedel, T.; Dyson, P.J.; Quiroga, A.G. Versatile Route to trans-Platinum(II) Complexes via Manipulation of a Coordinated 3-(Pyridin-3-yl)propanoic Acid Ligand. *Inorg. Chem.* **2019**, *58*, 7200–7208. <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.9b00126>.
33. Nowak-Sliwinska, P.; Weiss, A.; Paunescu, E.; Clavel, C.M.; Griffioen, A.W.; Dyson, P.J. Anti-angiogenic properties of chlorambucil derivatives with fluorous and hydrocarbon appendages. *MedChemComm* **2016**, *7*, 1596–1603. <https://doi.org/10.1039/c6md00271d>.
34. García-Moreno, E.; Cerrada, E.; Bolsa, M.J.; Luquin, A.; Laguna, M. Water-Soluble Phosphanes Derived from 1,3,5-Triaza-7-phosphaadamantane and Their Reactivity towards

- Gold(I) Complexes. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2013**, 2020-2030. <https://doi.org/10.1002/ejic.201201411>.
35. Ruiz-Leal, M.; George, S. An in vitro procedure for evaluation of early stage oxidative stress in an established fish cell line applied to investigation of PHAH and pesticide toxicity. *Mar. Environ. Res.* **2004**, *58*, 631–635. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2004.03.054>.
 36. Cortesi, R.; Bergamini, P.; Ravani, L.; Drechsler, M.; Costenaro, A.; Pinotti, M.; Campioni, M.; Marvelli, L.; Esposito, E. Long-chain cationic derivatives of PTA (1,3,5-triaza-7-phosphaadamantane) as new components of potential non-viral vectors. *Int. J. Pharma.* **2012**, *431*, 176–182. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.04.014>.
 37. Garcia-Moreno, E.; Gascon, S.; Atrian-Blasco, E.; Rodriguez-Yoldi, M.J.; Cerrada, E.; Laguna, M. Gold(I) complexes with alkylated PTA (1,3,5-triaza-7-phosphaadamantane) phosphanes as anticancer metallodrugs. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, *79*, 164–172. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.04.001>.
 38. Atrián-Blasco, E.; Gascón, S.; Rodríguez-Yoldi, M.J.; Laguna, M.; Cerrada, E. Synthesis of Gold(I) Derivatives Bearing Alkylated 1,3,5-Triaza-7-phosphaadamantane as Selective Anticancer Metallodrugs. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2016**, 2791–2803. <https://doi.org/10.1002/ejic.201600177>.
 39. Bergamini, P.; Marvelli, L.; Marchi, A.; Vassanelli, F.; Fogagnolo, M.; Formaglio, P.; Bernardi, T.; Gavioli, R.; Sforza, F. Platinum and ruthenium complexes of new long-tail derivatives of PTA (1,3,5-triaza-7-phosphaadamantane): Synthesis, characterization and antiproliferative activity on human tumoral cell lines. *Inorg. Chim. Acta* **2012**, *391*, 162–170. <https://doi.org/10.1016/j.ica.2012.04.031>.
 40. Jolly, P.I.; Fleary-Roberts, N.; O'Sullivan, S.; Doni, E.; Zhou, S.Z.; Murphy, J.A. Reactions of triflate esters and triflamides with an organic neutral super-electron-donor. *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10*, 5807–5810. <https://doi.org/10.1039/c2ob25116g>.
 41. Ott, I. On the medicinal chemistry of gold complexes as anticancer drugs. *Coord. Chem. Rev.* **2009**, *253*, 1670–1681. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2009.02.019>.
 42. Madak, J.T.; Neamati, N. Membrane Permeable Lipophilic Cations as Mitochondrial Directing Groups. *Curr. Top. Med. Chem.* **2015**, *15*, 745–766. <https://doi.org/10.2174/1568026615666150302105622>.
 43. Armstrong, J.S. Mitochondrial medicine: Pharmacological targeting of mitochondria in disease. *Br. J. Pharmacol.* **2007**, *151*, 1154–1165. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707288>.
 44. Chen, L.B. Mitochondrial Membrane Potential in Living Cells. *Ann. Rev. Cell Biol.* **1988**, *4*, 155–181. <https://doi.org/10.1146/annurev.cb.04.110188.001103>.
 45. Liu, J.J.; Galettis, P.; Farr, A.; Maharaj, L.; Samarasingha, H.; McGeachan, 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*, 303–310. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2007.09.003>.
 46. McKeage, M.J.; Berners-Price, S.J.; Galettis, P.; Bowen, R.J.; Brouwer, W.; Ding, L.; Zhuang, L.; Baguley, B.C. Role of lipophilicity in determining cellular uptake and antitumour activity of gold phosphine complexes. *Cancer Chem. Pharmacol.* **2000**, *46*, 343–350. <https://doi.org/10.1007/s002800000166>.
 47. Quero, J.; Cabello, S.; Fuertes, T.; Marmol, I.; Laplaza, R.; Polo, V.; Gimeno, M.C.; Rodriguez-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*, 10832–10845. <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.8b01464>.
 48. Kim, J.H.; Reeder, E.; Parkin, S.; Awuah, S.G. Gold(I/III)-Phosphine Complexes as Potent Antiproliferative Agents. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 1–18. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-48584-5>.
 49. Martin-Encinas, E.; Conejo-Rodríguez, V.; Miguel, J.A.; Martínez-Ilarduya, J.M.; Rubiales, G.; Knudsen, B.R.; Palacios, F.; Alonso, C. Novel phosphine sulphide gold(I) complexes: Topoisomerase I inhibitors and antiproliferative agents. *Dalton Trans.* **2020**, *49*, 7852–7861. <https://doi.org/10.1039/d0dt01467b>.

50. Abás, E.; Bellés, A.; Rodríguez-Diéguez, A.; Laguna, M.; Grasa, L. Selective cytotoxicity of cyclometalated gold(III) complexes on Caco-2 cells is mediated by G2/M cell cycle arrest. *Metallomics* **2021**, *13*, mfab034, doi:10.1093/mtomcs/mfab034.
51. Tu, S.P.; Sun, R.W.Y.; Lin, M.C.M.; Cui, J.T.; Zou, B.; Gu, Q.; Kung, H.F.; Che, C.M.; Wong, B.C.Y. Gold (III) Porphyrin Complexes Induce Apoptosis and Cell Cycle Arrest and Inhibit Tumor Growth in Colon Cancer. *Cancer* **2009**, *115*, 4459–4469. <https://doi.org/10.1002/cncr.24514>.
52. 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.
53. Kastan, M.B.; Bartek, J. Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature* **2004**, *432*, 316–323. <https://doi.org/10.1038/nature03097>.
54. Carvajal, L.A.; Manfredi, J.J. Another fork in the road-life or death decisions by the tumour suppressor p53. *EMBO Rep.* **2013**, *14*, 414–421. <https://doi.org/10.1038/embor.2013.25>.
55. Gonzalez, J.J.; Ortega, E.; Rothemund, M.; Gold, M.; Vicente, C.; de Haro, C.; Bautista, D.; Schobert, R.; Ruiz, J. Luminescent Gold(I) Complexes of 1-Pyridyl-3-anthracenylchalcone Inducing Apoptosis in Colon Carcinoma Cells and Antivascular Effects. *Inorg. Chem.* **2019**, *58*, 12954–12963. <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.9b01901>.
56. Reddy, T.S.; Priver, S.H.; Rao, V.V.; Mirzadeh, N.; Bhargava, S.K. Gold(I) and gold(III) phosphine complexes: Synthesis, anticancer activities towards 2D and 3D cancer models, and apoptosis inducing properties. *Dalton Trans.* **2018**, *47*, 15312–15323. <https://doi.org/10.1039/c8dt01724g>.

SUPPORTING INFORMATION:

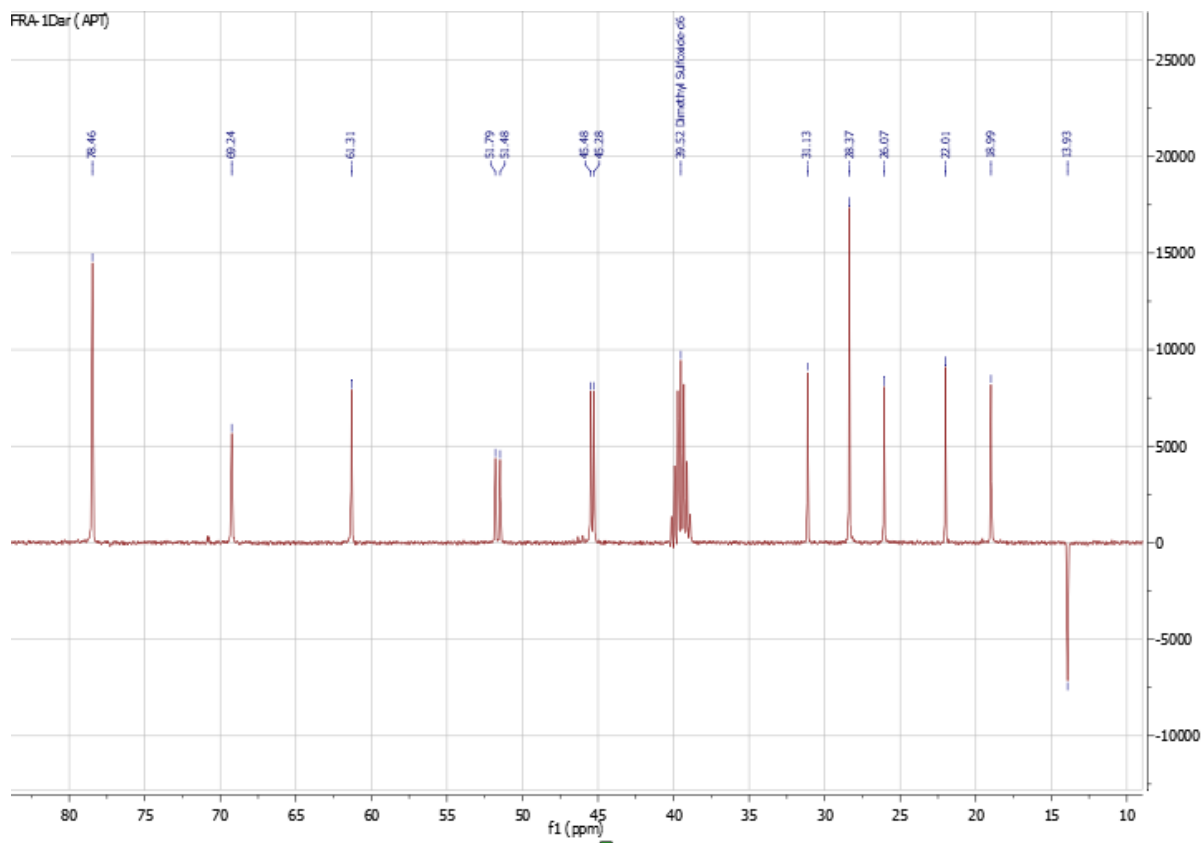


Figure S3. ^{13}C $\{^1\text{H}\}$ -APT spectrum of [PTA- CH_2 -(CH_2) $_6$ - CH_3]I (**La**) in dms0-d_6 .

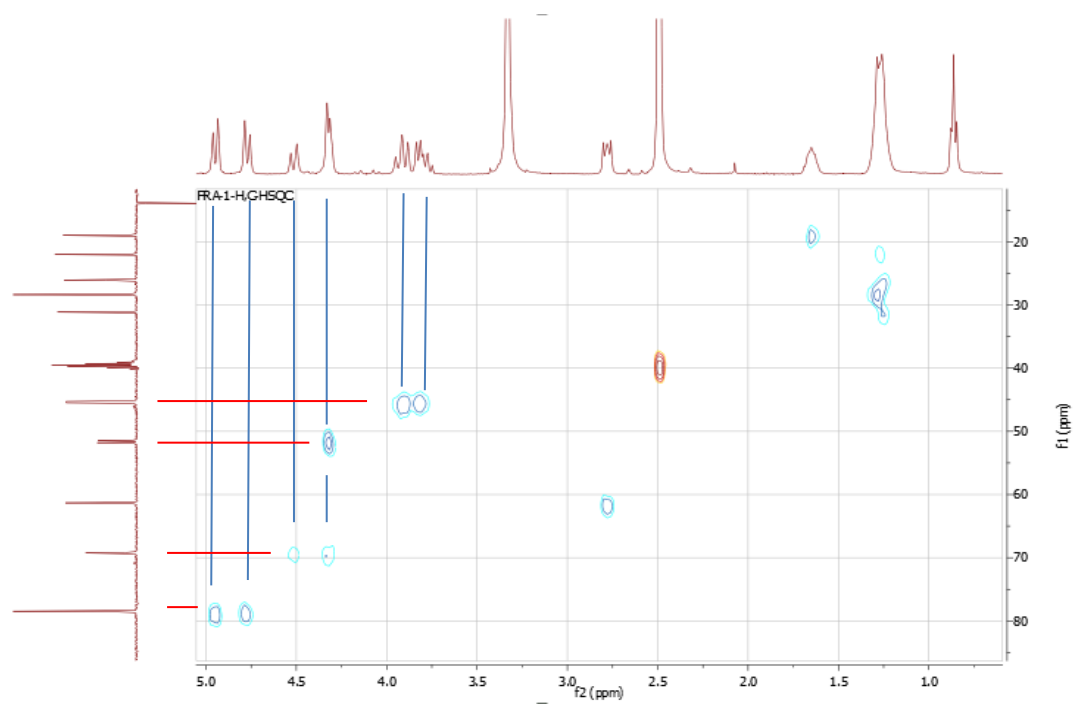


Figure S4. C,H-HSQC experiment of [PTA- CH_2 -(CH_2) $_6$ - CH_3]I (**La**) in dms0-d_6 .

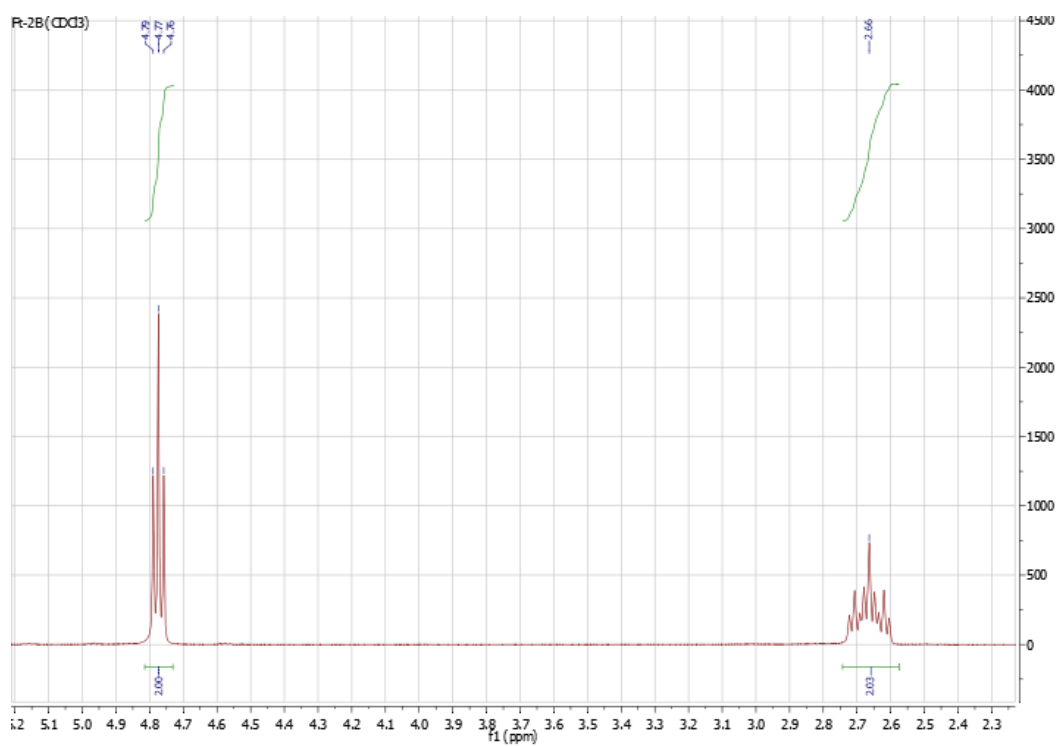


Figure S5. ^1H NMR spectrum of $\text{TfOCH}_2\text{CH}_2(\text{CF}_2)_5\text{CF}_3$ in CDCl_3 .

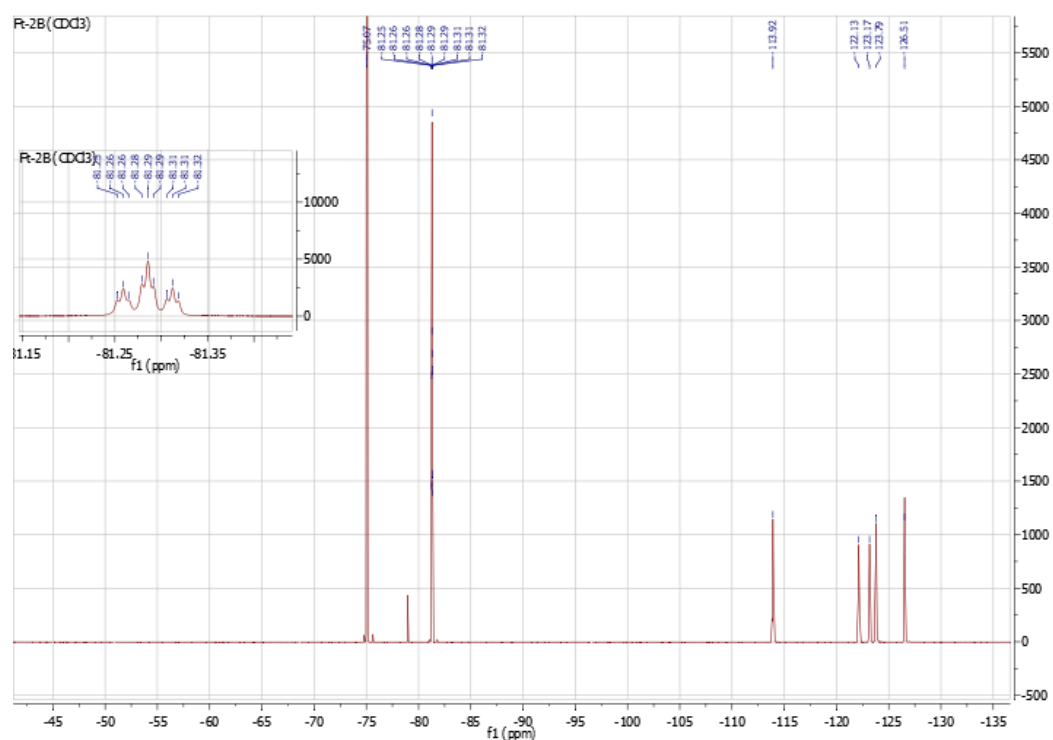


Figure S6. ^{19}F $\{^1\text{H}\}$ NMR spectrum of $\text{TfOCH}_2\text{CH}_2(\text{CF}_2)_5\text{CF}_3$ in CDCl_3 .

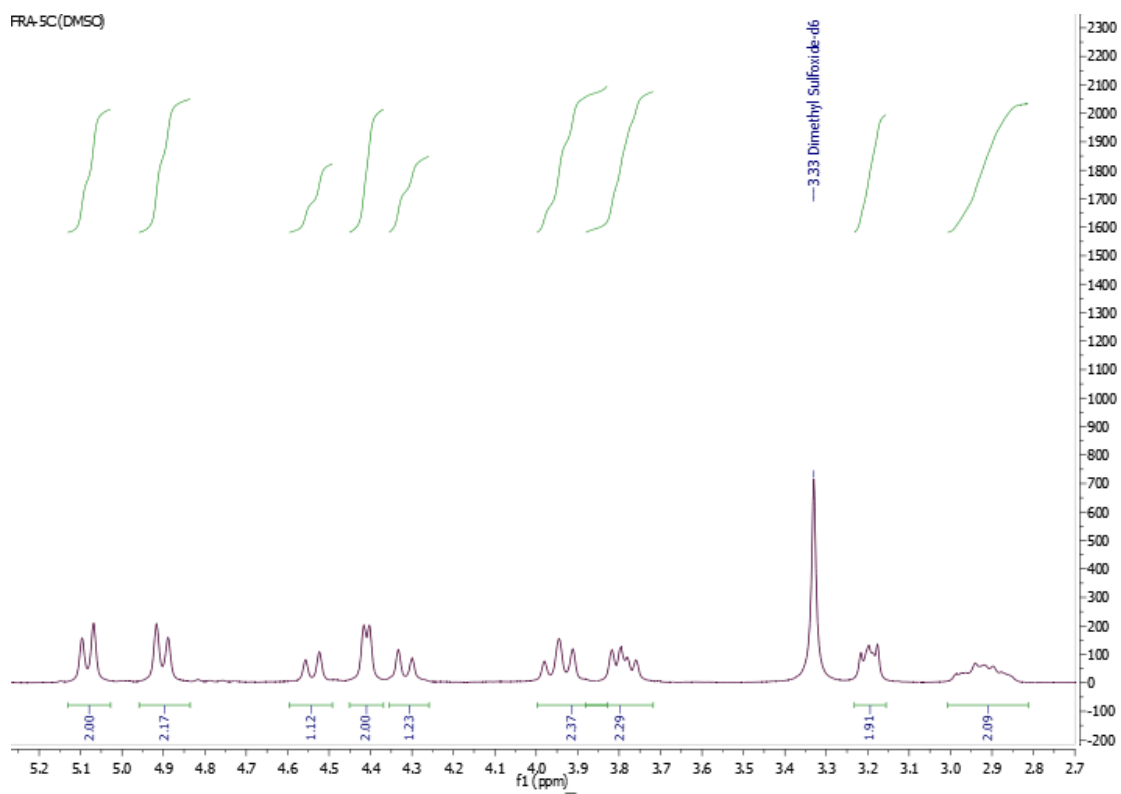


Figure S7. ^1H NMR spectrum of [PTA- $\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CF}_2)_5\text{CF}_3$]TfO (**Lb**) in dms0-d_6 .

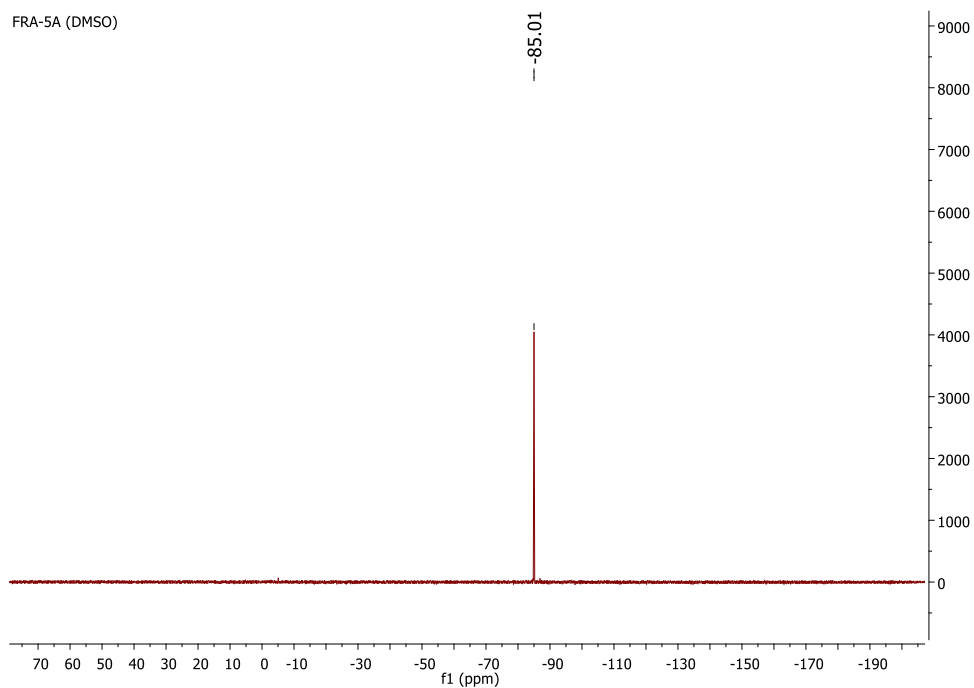


Figure S8. $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ NMR spectrum of [PTA- $\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CF}_2)_5\text{CF}_3$]TfO (**Lb**) in dms0-d_6 .

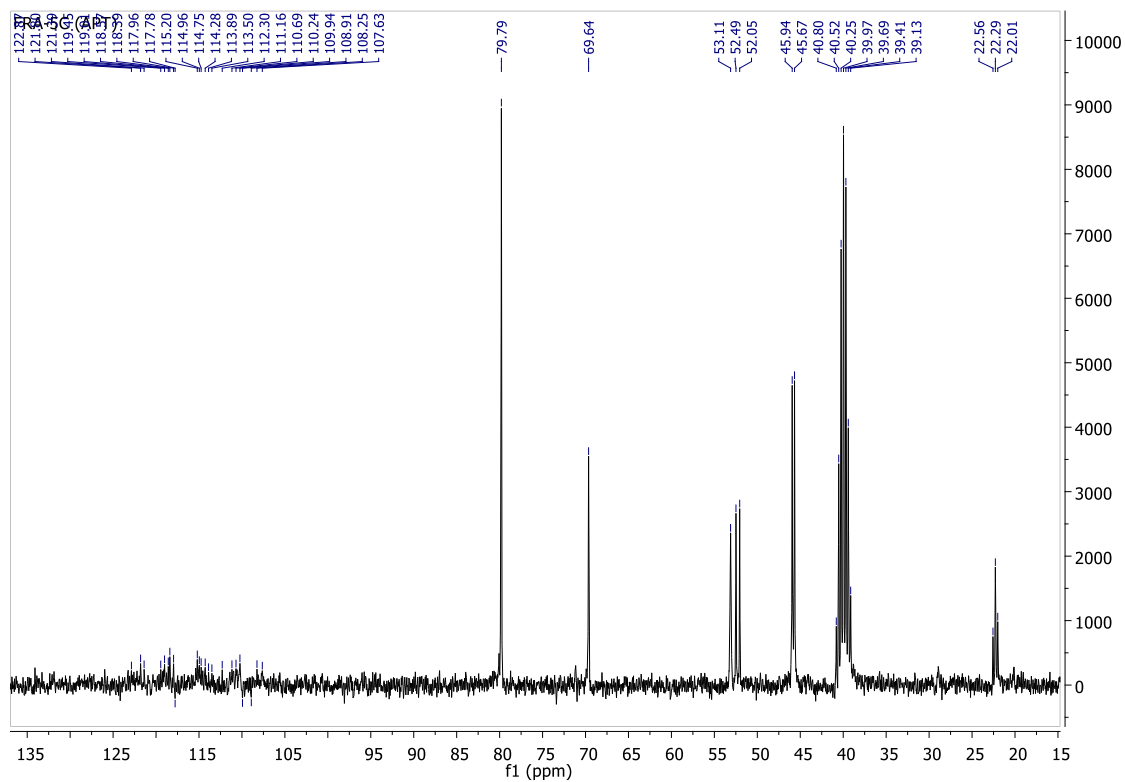


Figure S9. ^{13}C $\{^1\text{H}\}$ NMR spectrum of [PTA-CH₂CH₂(CF₂)₅CF₃]TfO (Lb) in dmsO-d₆.

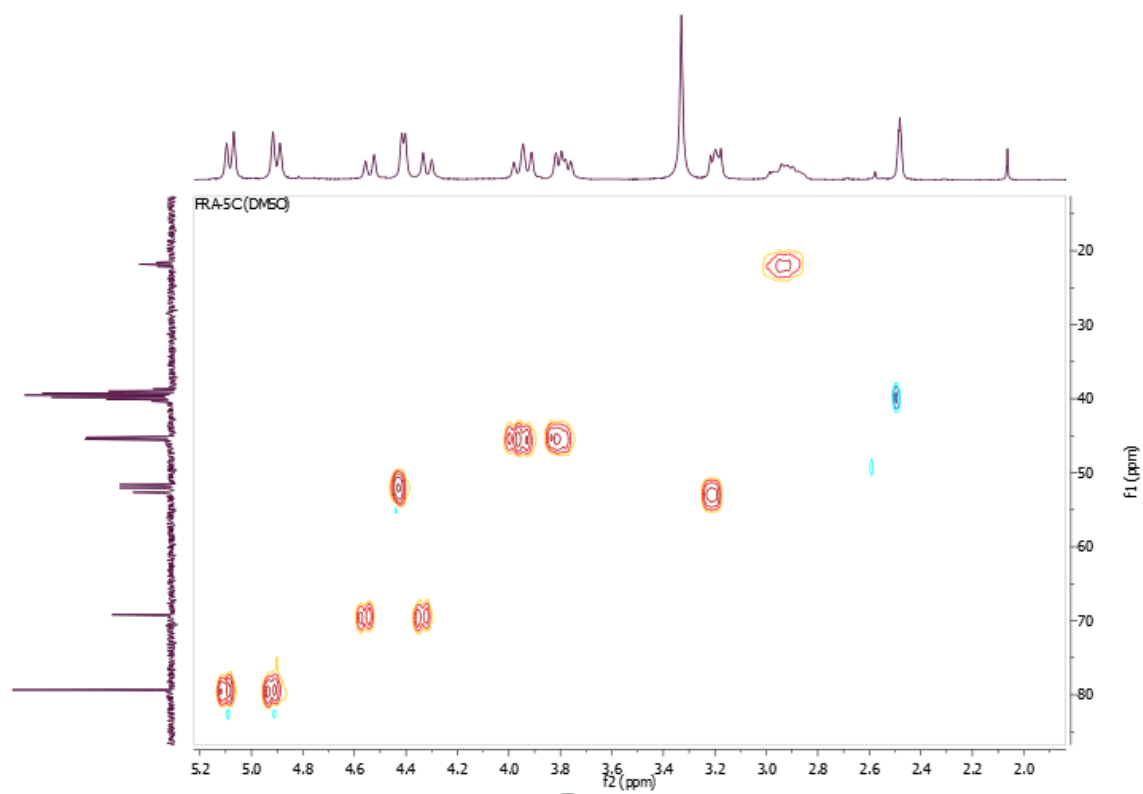


Figure S10. C,H-HSQC experiment of [PTA-CH₂CH₂(CF₂)₅CF₃]TfO (Lb) in dmsO-d₆.

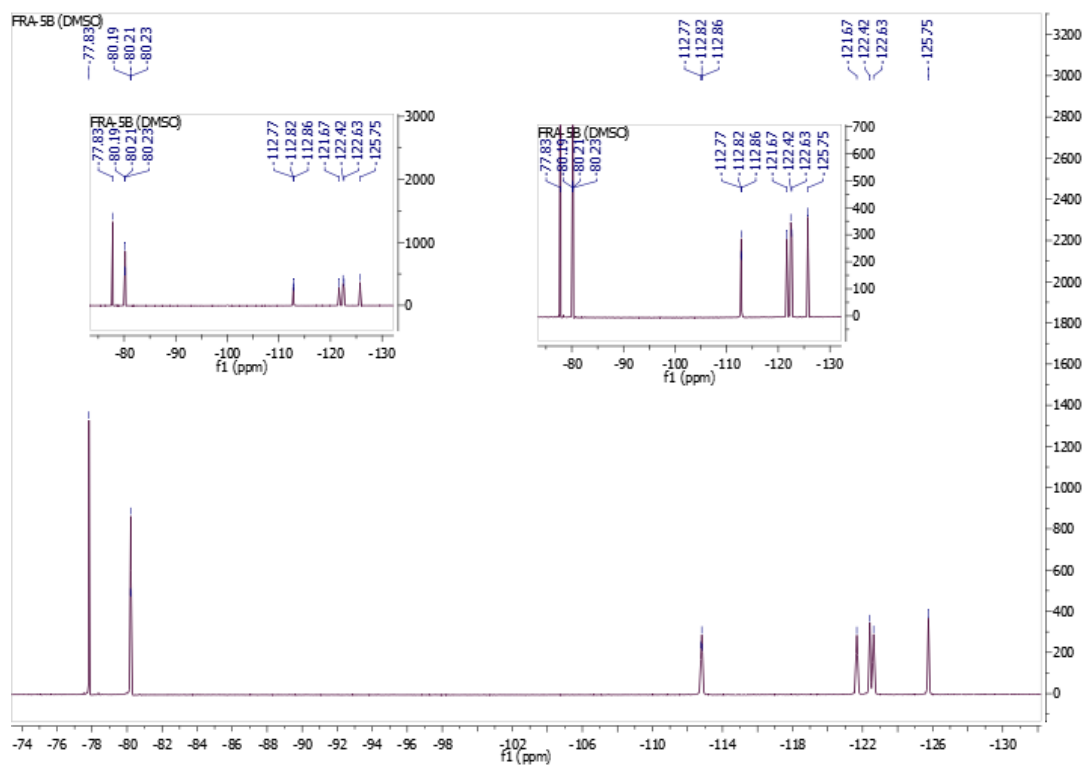


Figure S11. ^{19}F $\{^1\text{H}\}$ NMR spectrum of $[\text{PTA-CH}_2\text{CH}_2(\text{CF}_2)_5\text{CF}_3]\text{TfO}$ (**Lb**) in dmsO-d_6 .

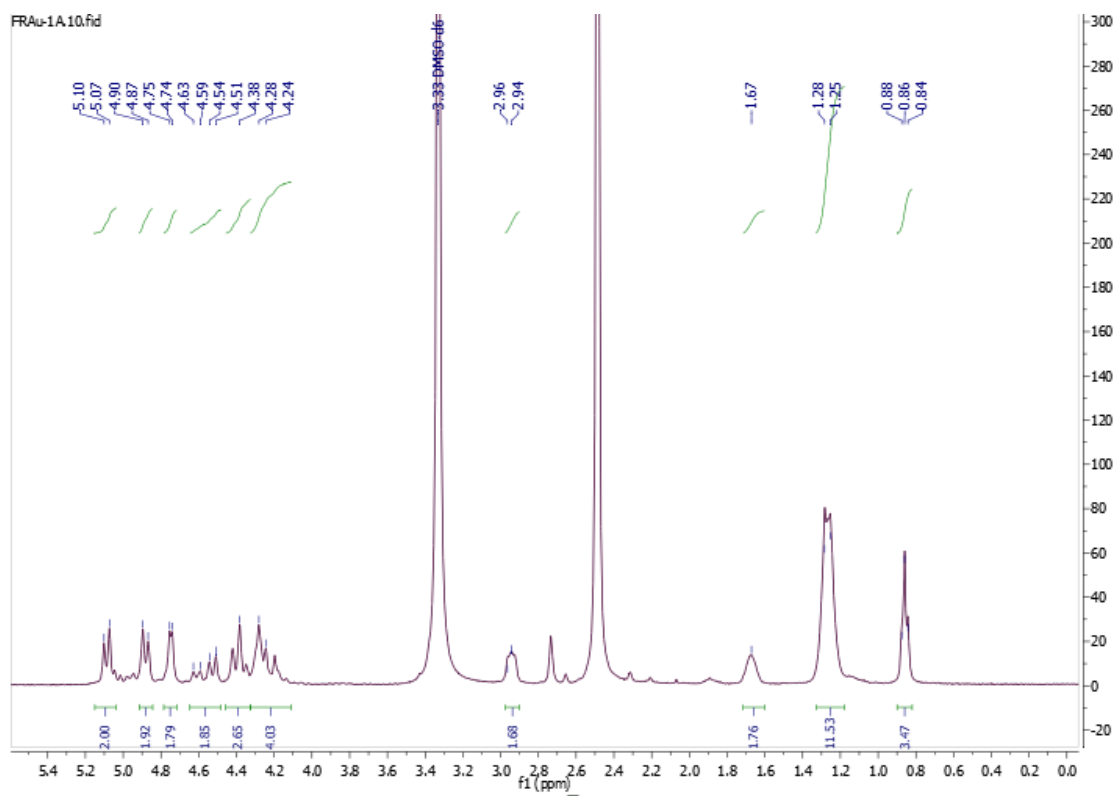


Figure S12. ^1H NMR spectrum of $[\text{AuCl}(\text{PTA-CH}_2(\text{CH}_2)_6\text{CH}_3)]\text{I}$ (**1a**) in dmsO-d_6 .

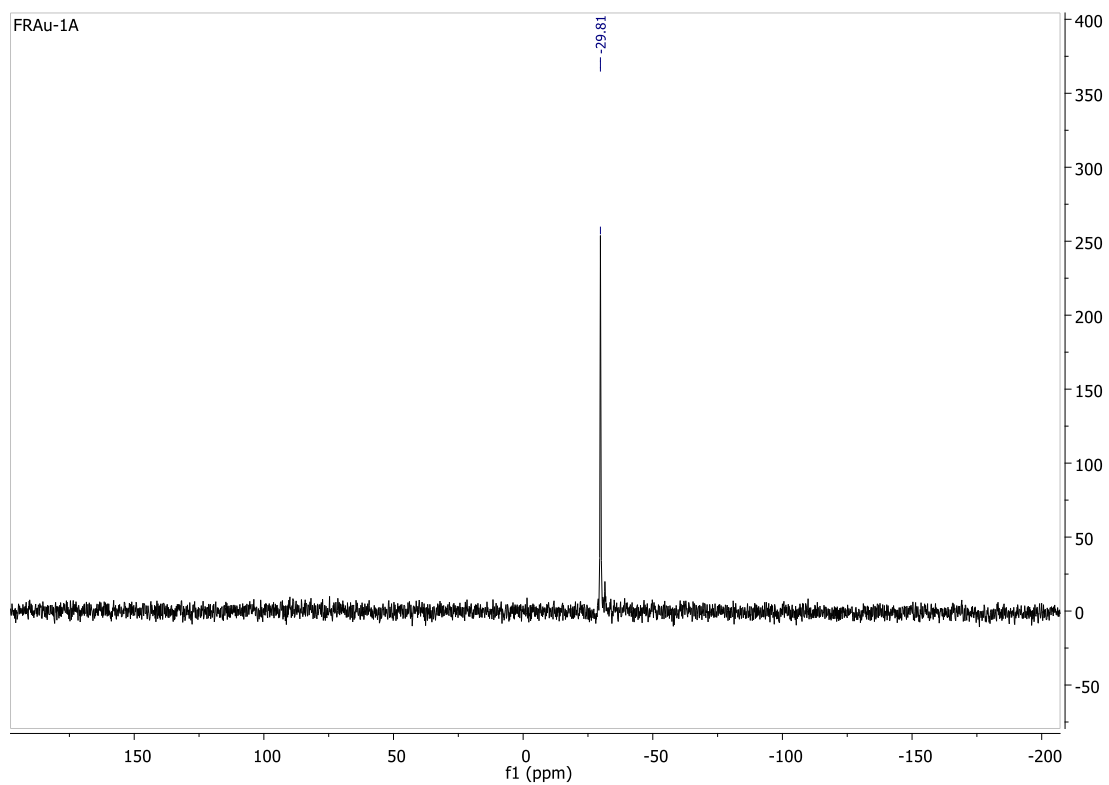
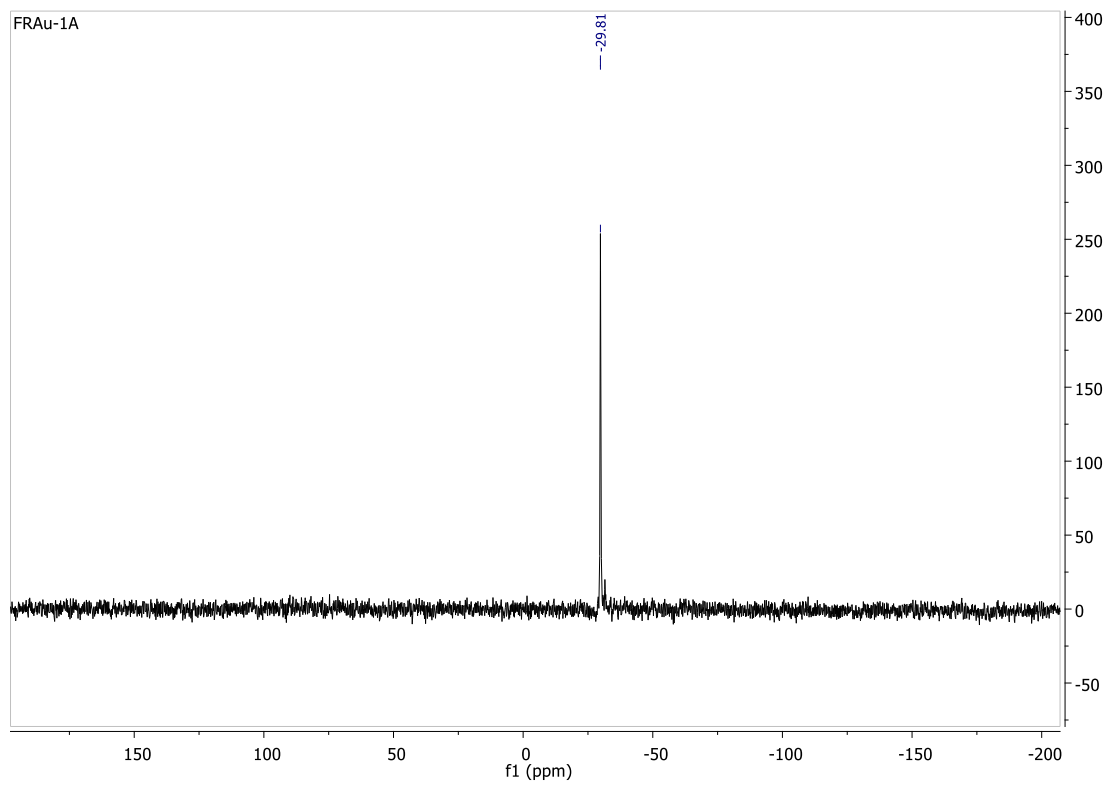


Figure S13. $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ NMR spectrum of $[\text{AuCl}(\text{PTA}-\text{CH}_2(\text{CH}_2)_6\text{CH}_3)]\text{I}$ (**1a**) in dms0-d_6 .

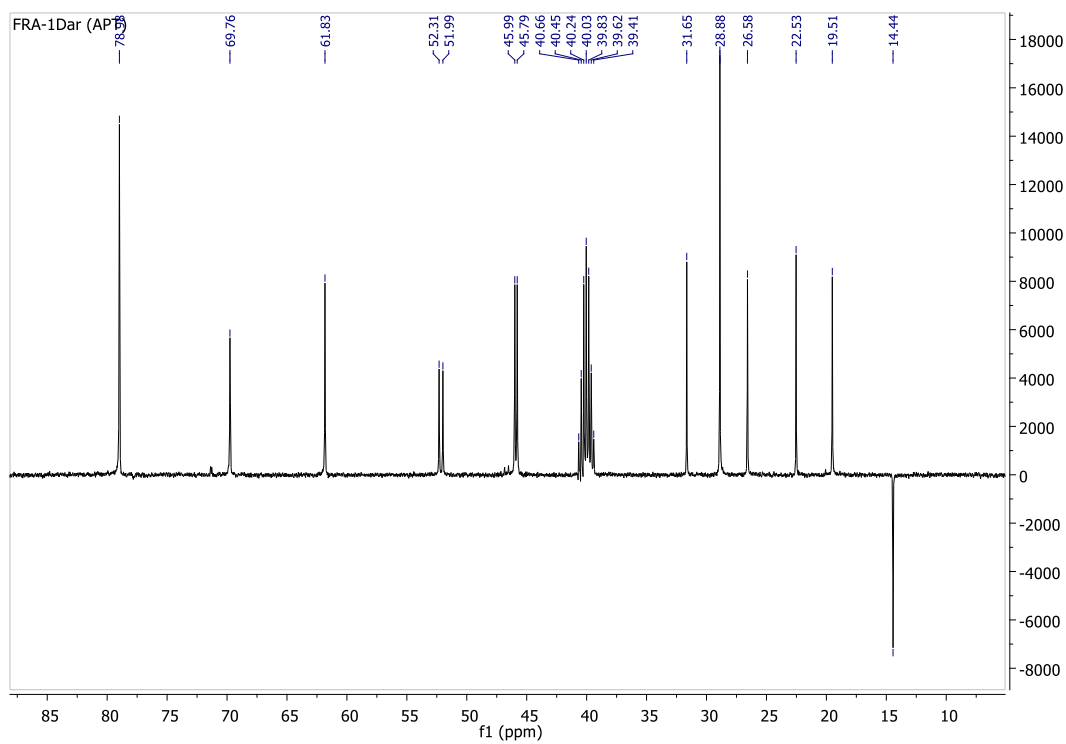


Figure S14. ^{13}C { ^1H }-APT spectrum of $[\text{AuCl}(\text{PTA-CH}_2(\text{CH}_2)_6\text{CH}_3)]\text{I}$ (1a) in dms0-d_6 .

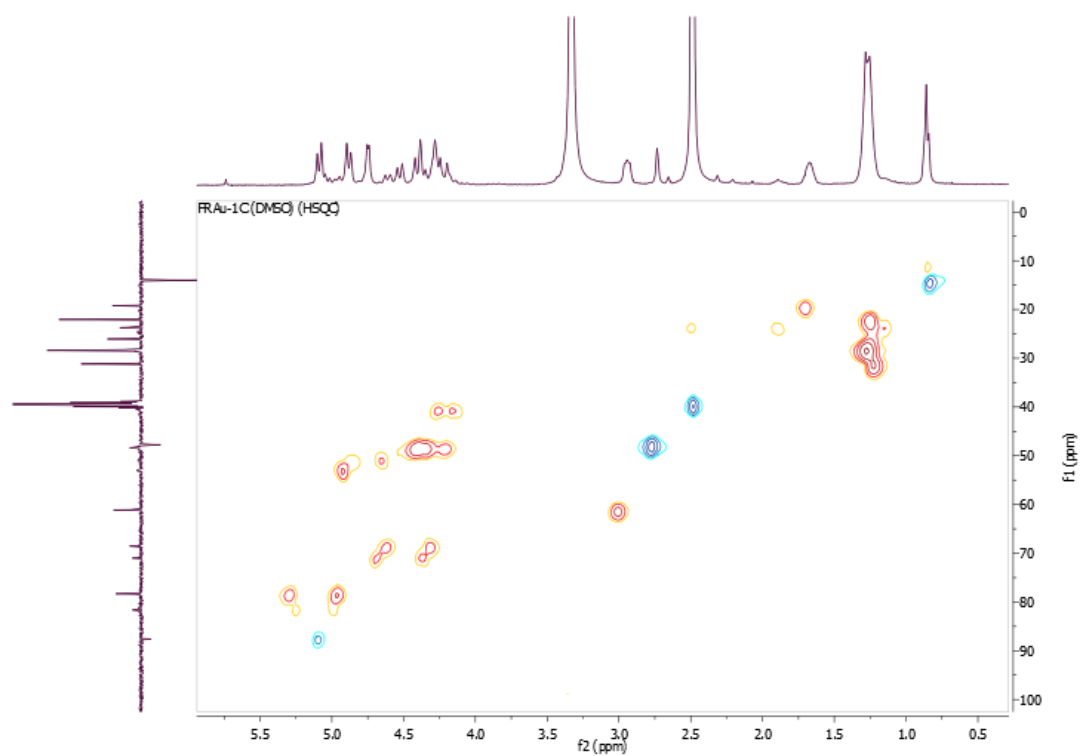


Figure S15. C,H-HSQC experiment of $[\text{AuCl}(\text{PTA-CH}_2(\text{CH}_2)_6\text{CH}_3)]\text{I}$ (1a) in dms0-d_6 .

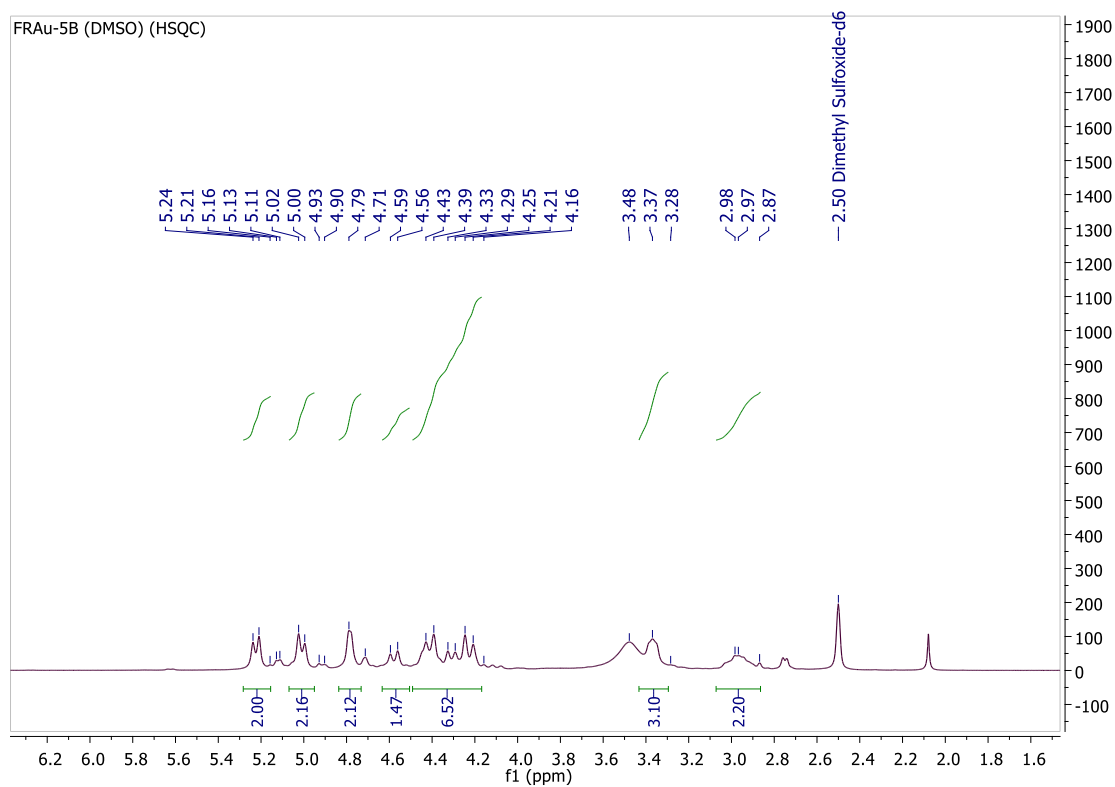


Figure S16 ^1H NMR spectrum of $[\text{AuCl}(\text{PTA-CH}_2\text{CH}_2(\text{CF}_2)_5\text{CF}_3)]\text{TfO}$ (**1b**) in dmsu-d_6 .

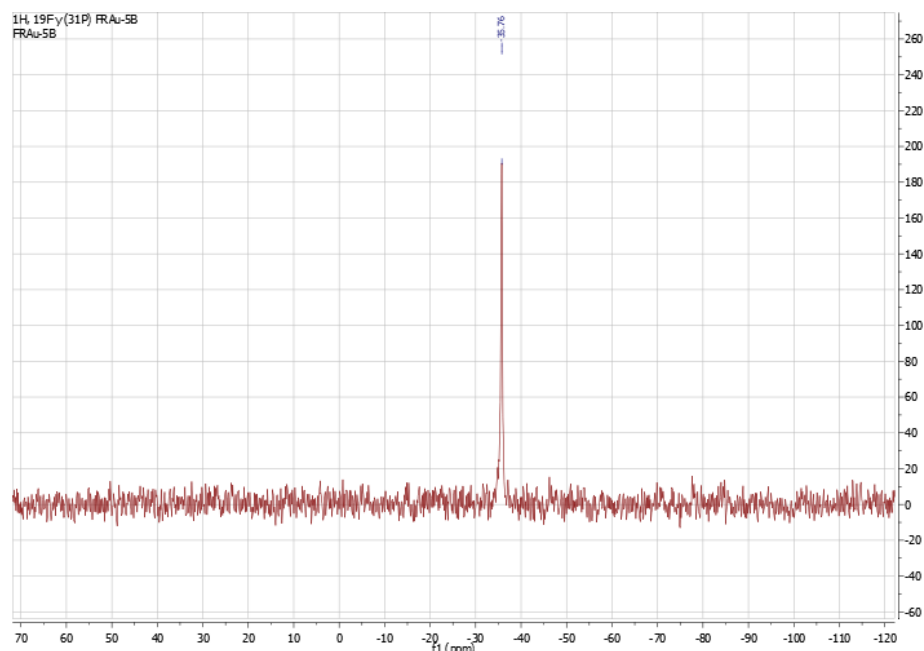


Figure S17. $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ NMR spectrum of $[\text{AuCl}(\text{PTA-CH}_2\text{CH}_2(\text{CF}_2)_5\text{CF}_3)]\text{TfO}$ (**1b**) in dmsu-d_6 .

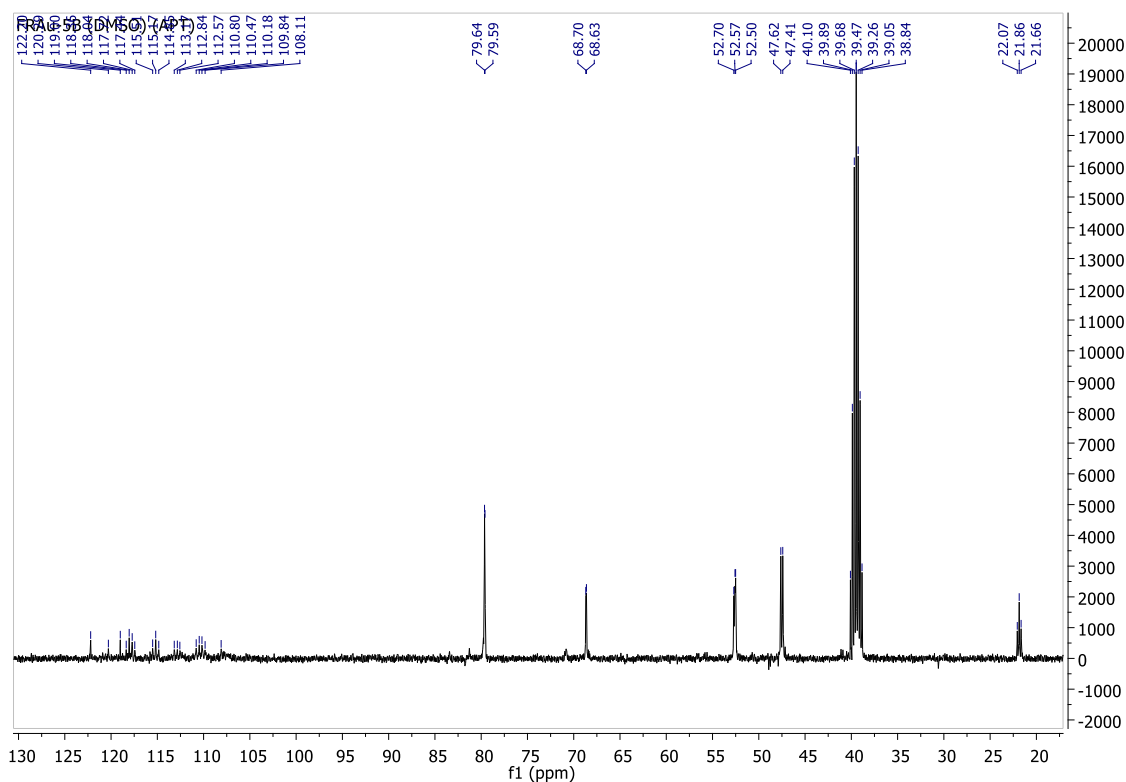


Figure S18. ^{13}C $\{^1\text{H}\}$ NMR spectrum of $[\text{AuCl}(\text{PTA}-\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CF}_2)_5\text{CF}_3)]\text{TfO}$ (**1b**) in dms0-d_6

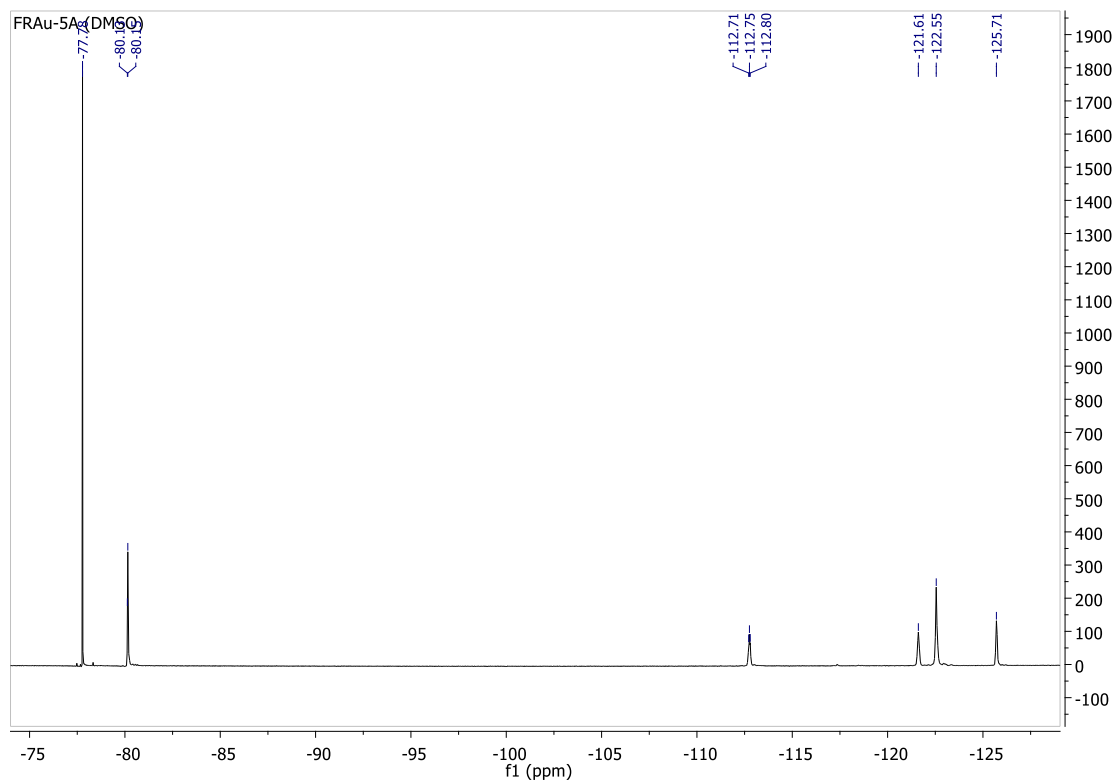


Figure S18. ^{19}F $\{^1\text{H}\}$ NMR spectrum of $[\text{AuCl}(\text{PTA}-\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CF}_2)_5\text{CF}_3)]\text{TfO}$ (**1b**) in dms0-d_6 .

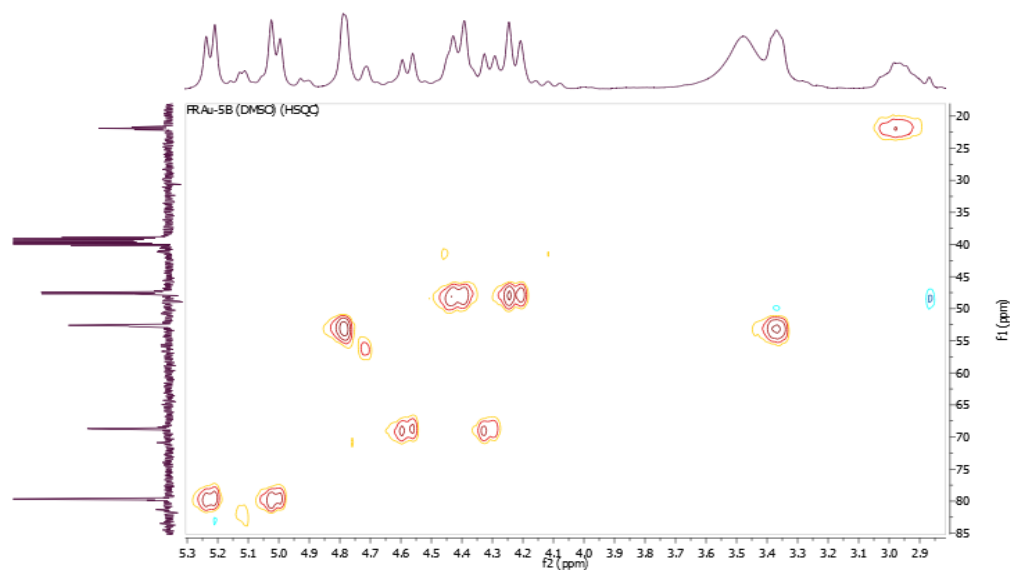


Figure S20. C,H-HSQC experiment of $[\text{AuCl}(\text{PTA-CH}_2\text{CH}_2(\text{CF}_2)_5\text{CF}_3)]\text{TfO}$ (**1b**) in dms0-d_6 .

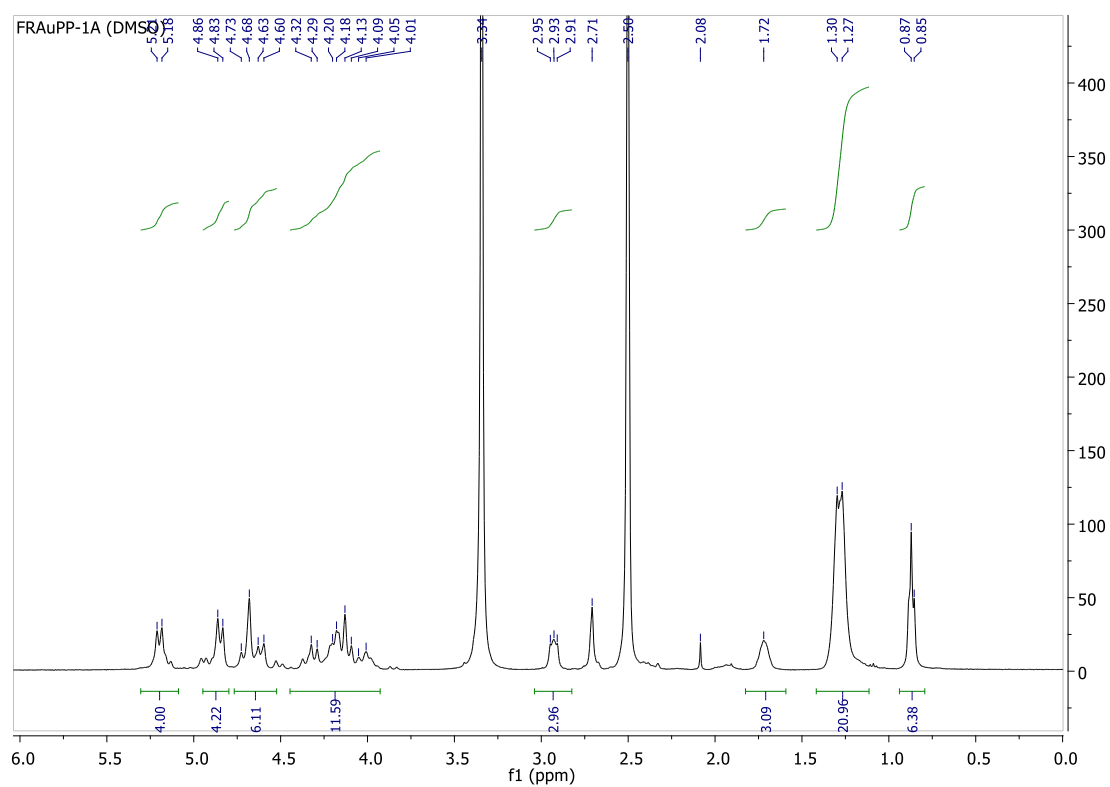


Figure S21 ^1H NMR spectrum of $[\text{AuCl}(\text{PTA-CH}_2(\text{CH}_2)_6\text{CH}_3)_2]\text{I}_2$ (**2a**) in dms0-d_6 .

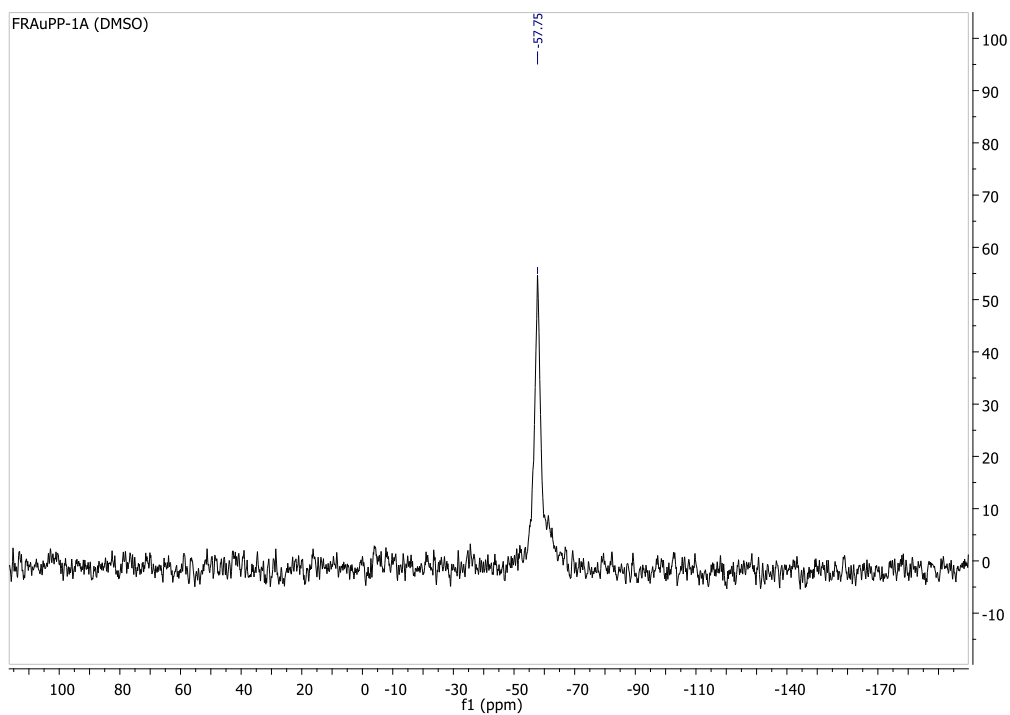


Figure S22. $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ NMR spectrum of (2a) in dms0-d₆.

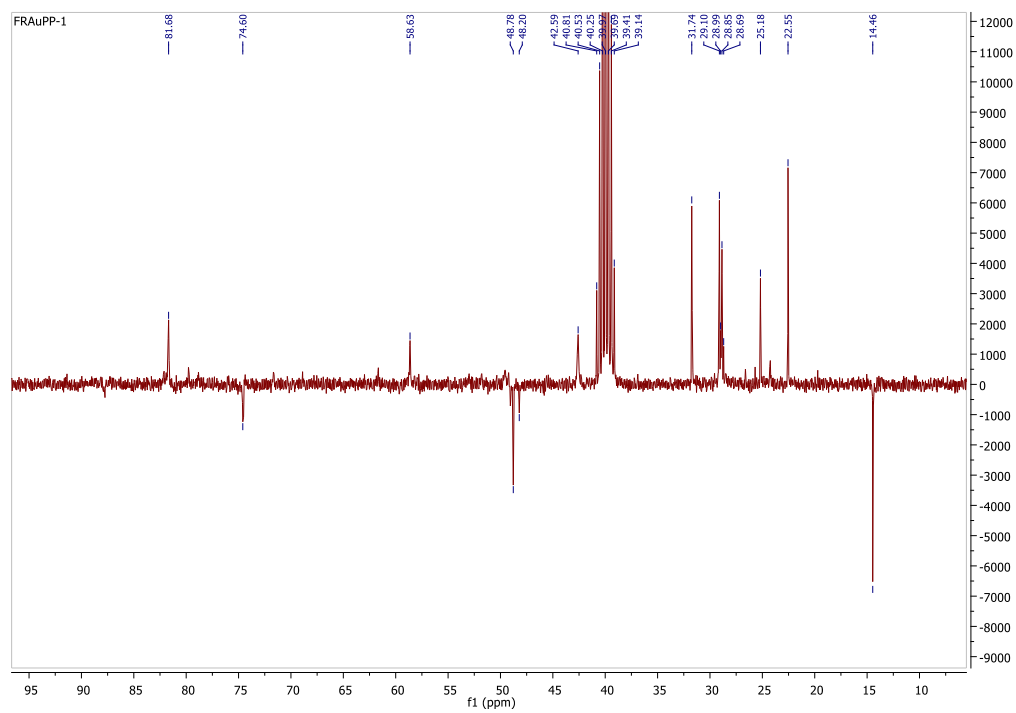


Figure S23. $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -APT spectrum of (2a) in dms0-d₆.

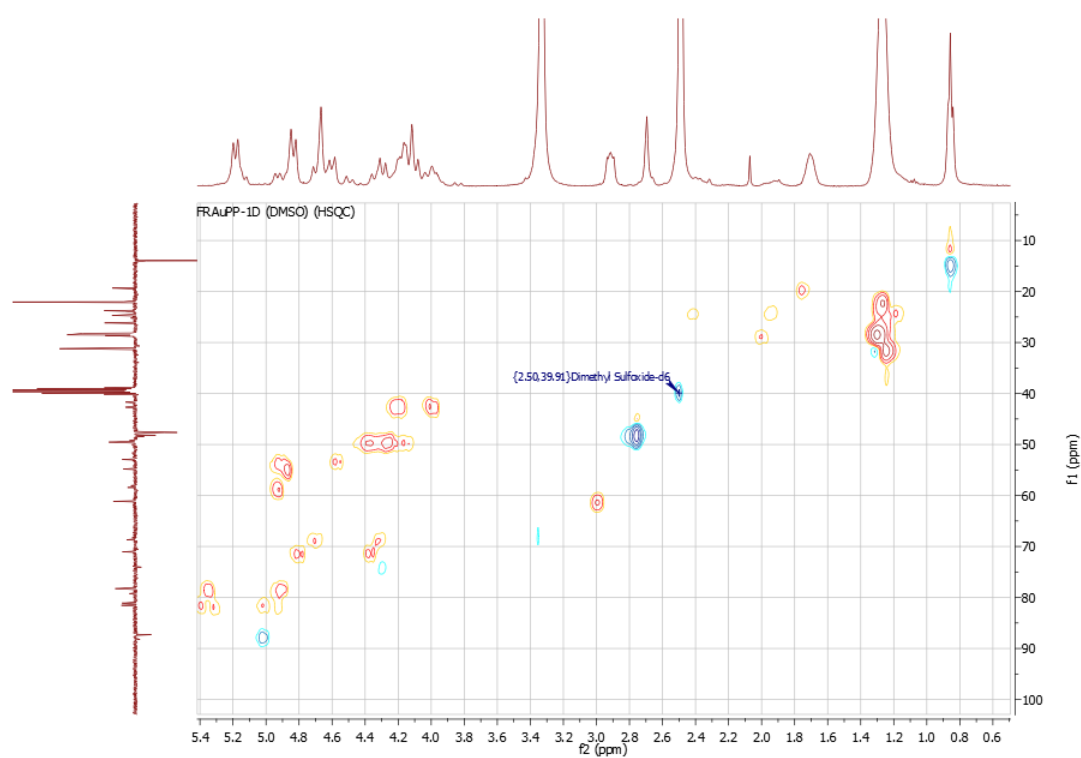


Figure S24. C,H-HSQC experiment of $[\text{AuCl}(\text{PTA-CH}_2(\text{CH}_2)_6\text{CH}_3)_2]\text{I}_2$ (**2a**) in dms0-d_6 .

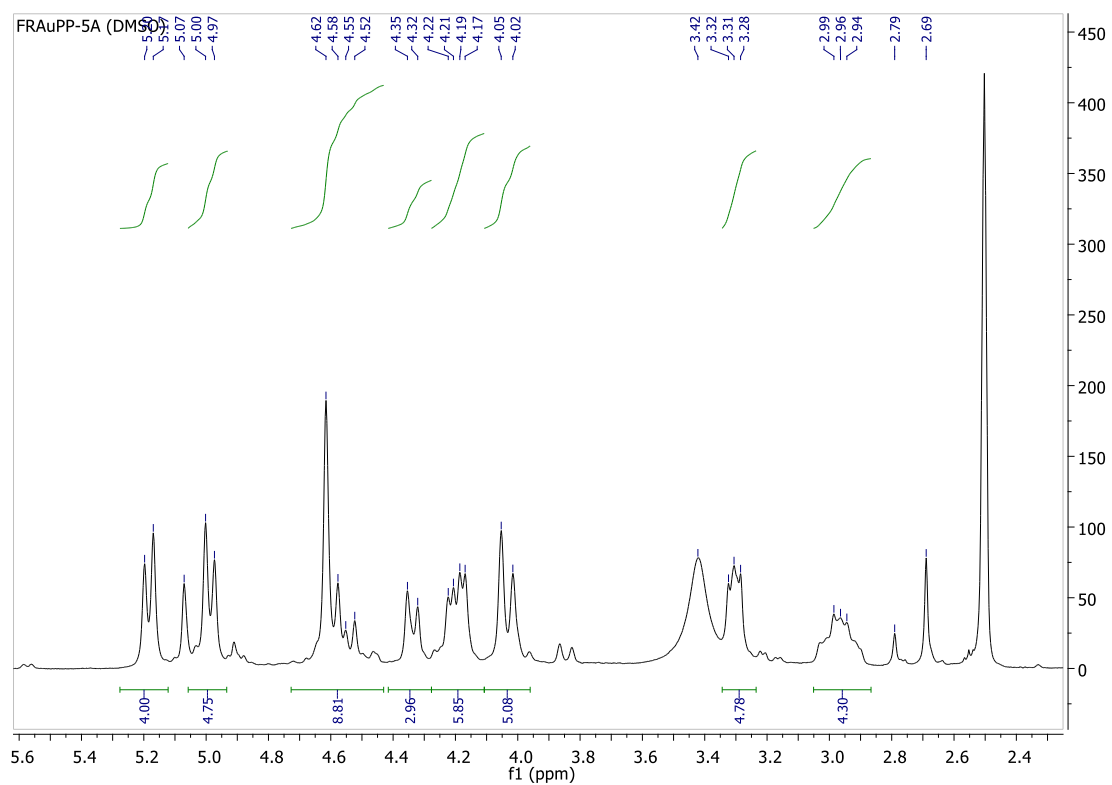


Figure S25. ^1H NMR spectrum of $[\text{AuCl}(\text{PTA-CH}_2\text{CH}_2(\text{CF}_2)_5\text{CF}_3)_2](\text{TfO})_2$ (**2b**) in dms0-d_6 .

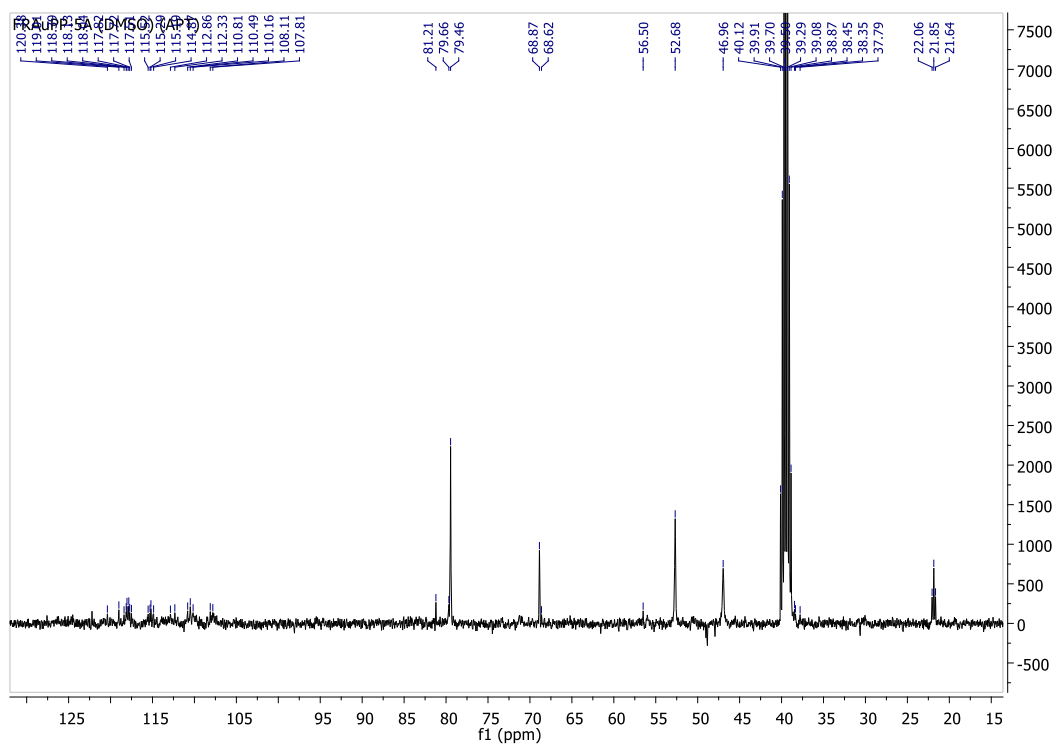


Figure S26. ^{13}C $\{^1\text{H}\}$ NMR spectrum of $[\text{AuCl}(\text{PTA-CH}_2\text{CH}_2(\text{CF}_2)_5\text{CF}_3)_2](\text{TfO})_2$ (**2b**) in dms0-d_6 .

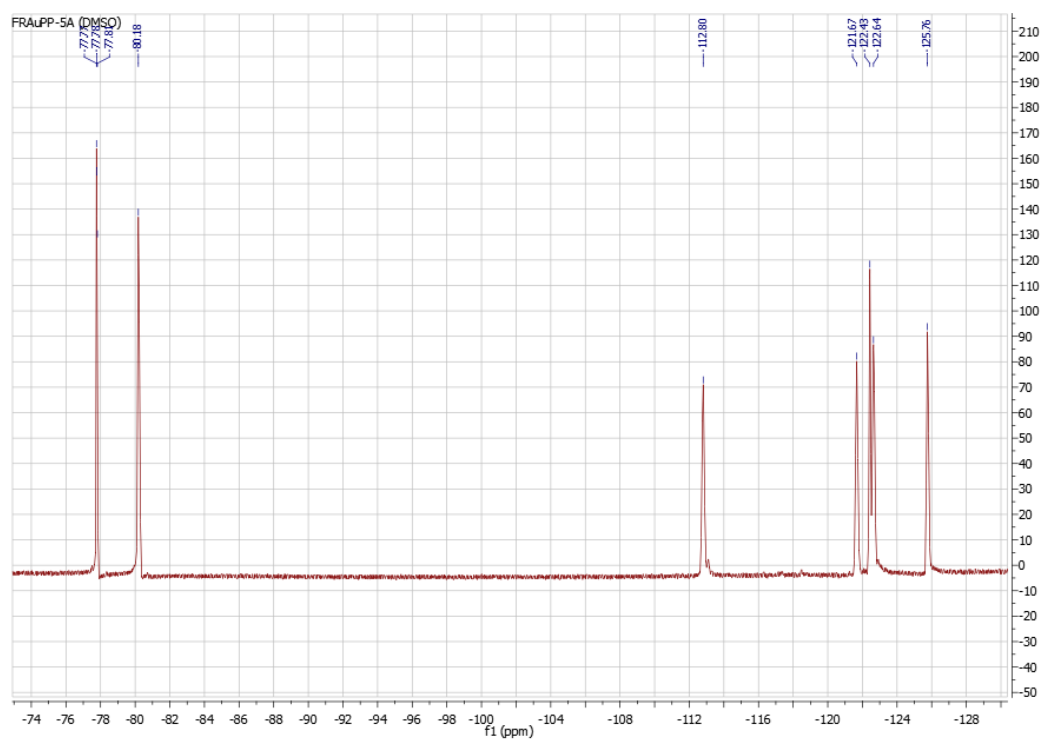


Figure S27. ^{19}F $\{^1\text{H}\}$ NMR of $[\text{AuCl}(\text{PTA-CH}_2\text{CH}_2(\text{CF}_2)_5\text{CF}_3)_2](\text{TfO})_2$ (**2b**) in dms0-d_6 .

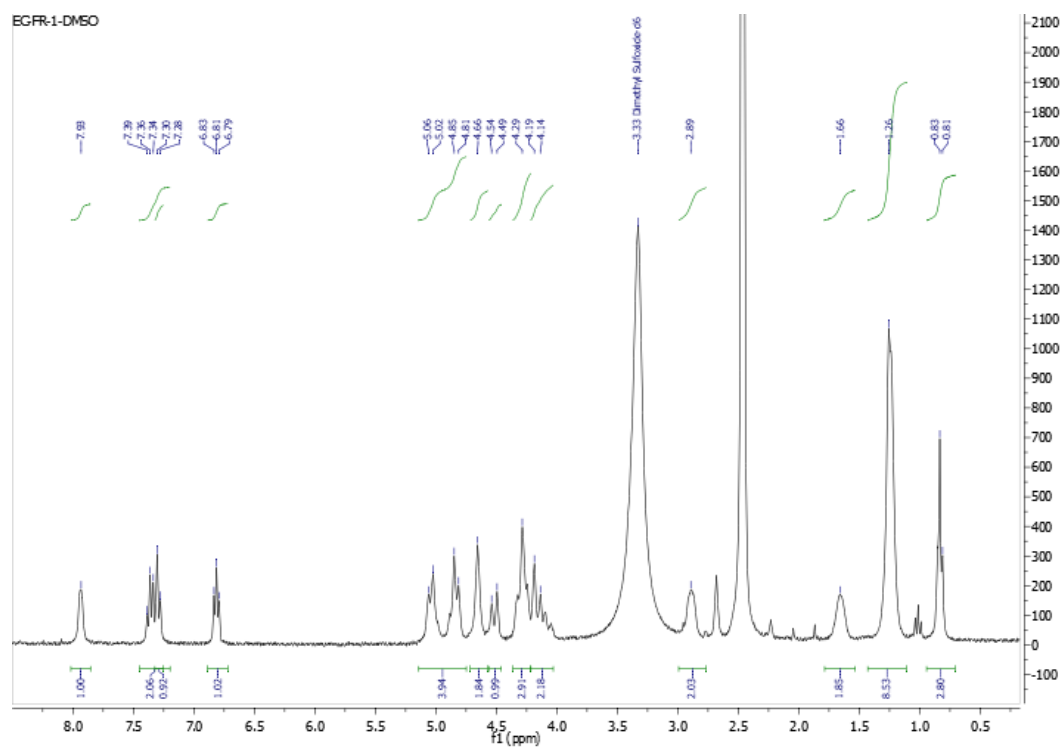


Figure S28. ^1H NMR spectrum of $[\text{Au}(\text{C}_5\text{H}_5\text{NS})(\text{PTA}-\text{CH}_2(\text{CH}_2)_6\text{CH}_3)]\text{I}$ (**3a**) in dms0-d_6 .

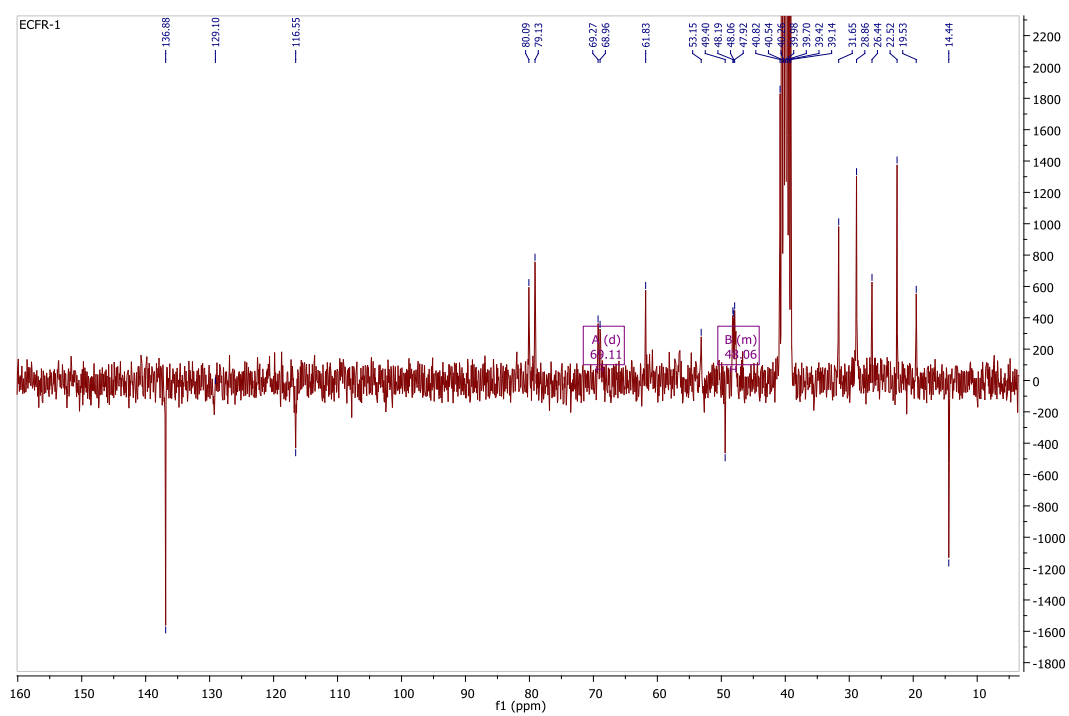


Figure S29. ^{13}C $\{^1\text{H}\}$ -apt NMR spectrum of $[\text{Au}(\text{C}_5\text{H}_5\text{NS})(\text{PTA}-\text{CH}_2(\text{CH}_2)_6\text{CH}_3)]\text{I}$ (**3a**) in dms0-d_6 .

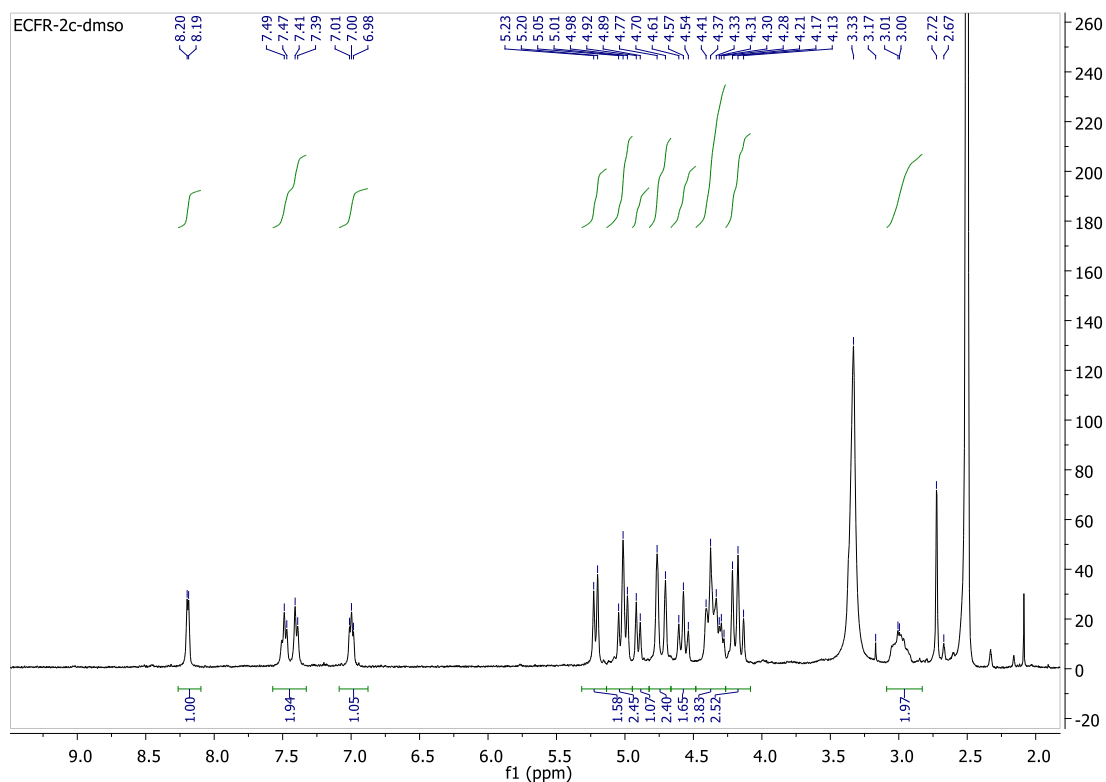


Figure S30. ^1H NMR spectrum of $[\text{Au}(\text{C}_5\text{H}_5\text{NS})(\text{PTA}-\text{CH}_2\text{CH}_2(\text{CF}_2)_5\text{CF}_3)]\text{TfO}$ (**3b**) in dms0-d_6 .

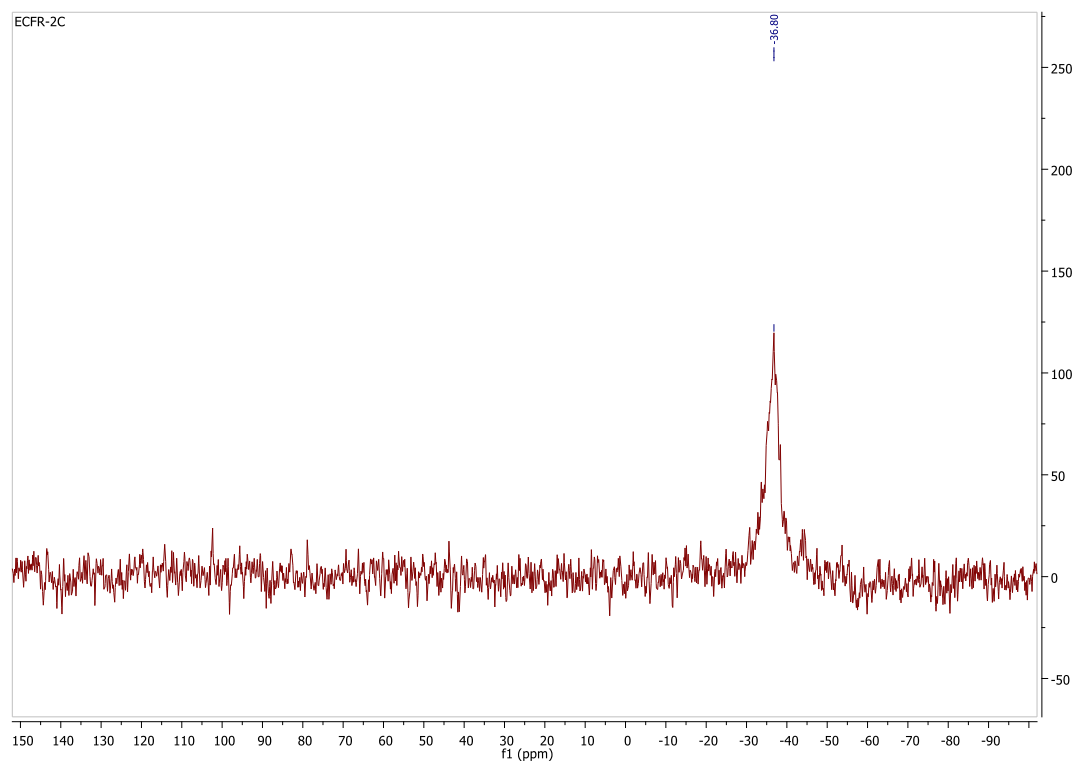
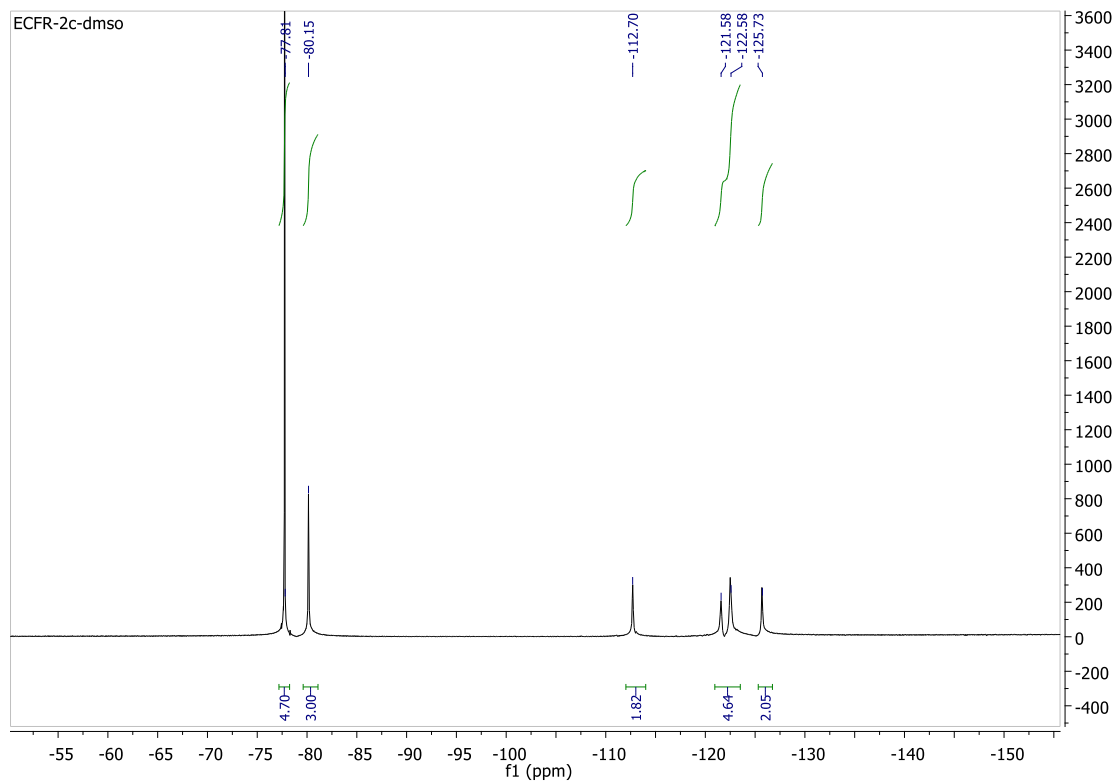
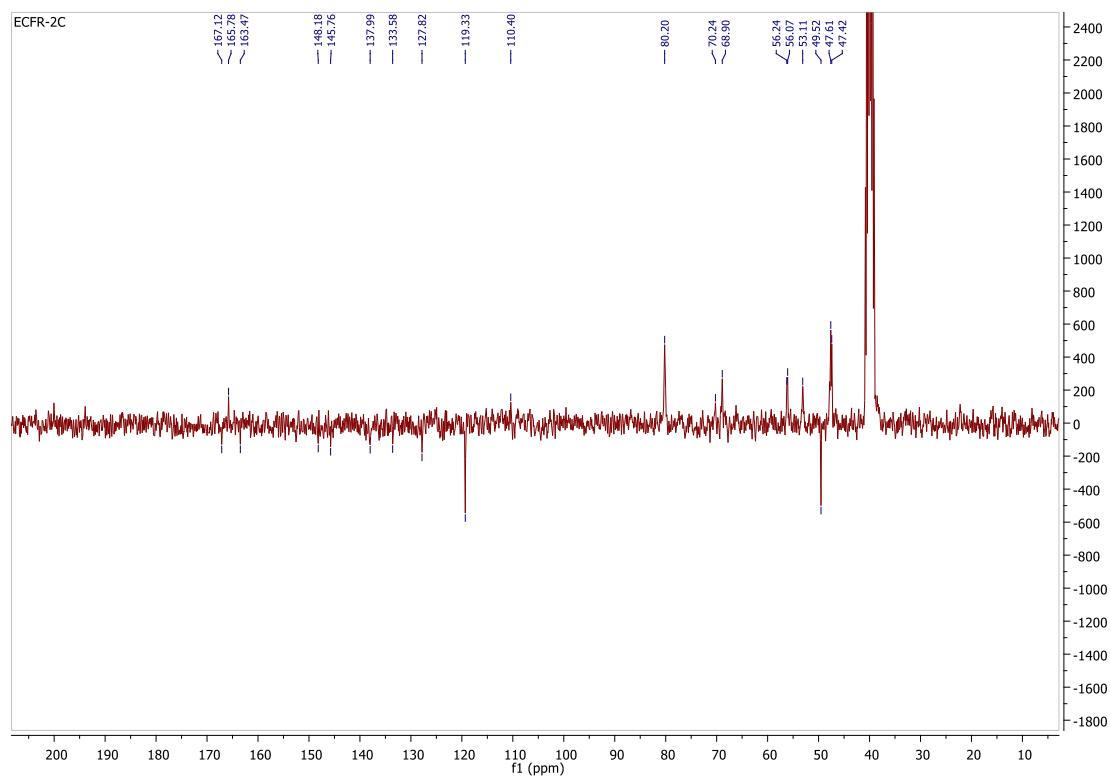
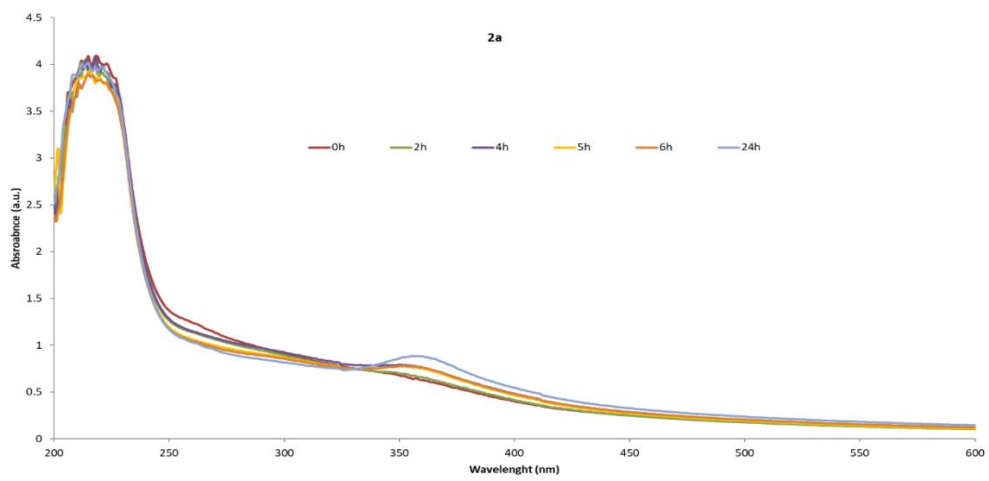
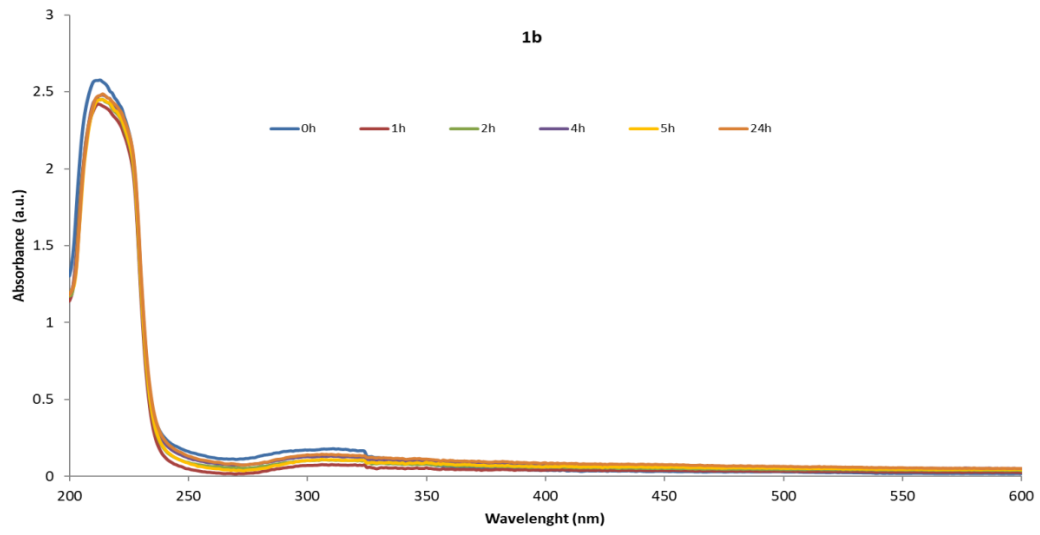
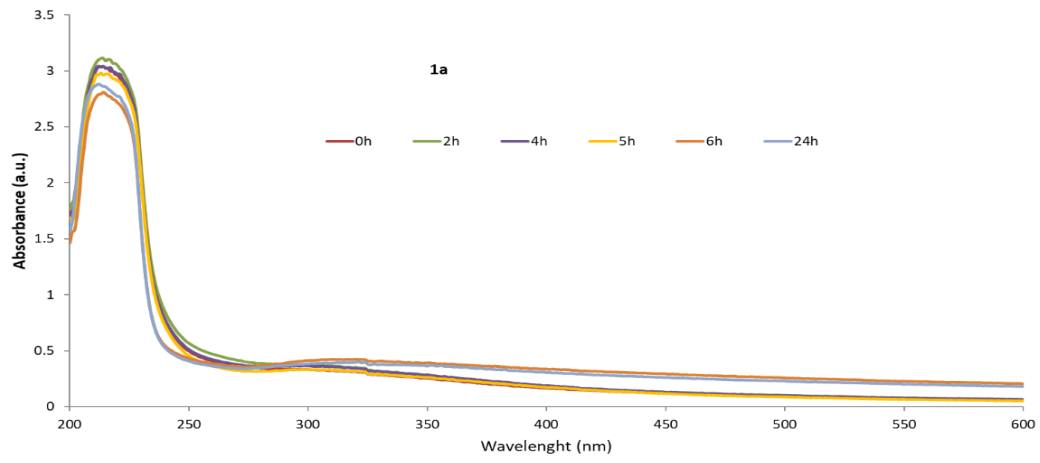


Figure S31. $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ NMR spectrum of **3b**.

Figure S32. $^{19}\text{F}\{^1\text{H}\}$ NMR spectrum of **3b**.Figure S33. $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -apt NMR spectrum of **3b**.



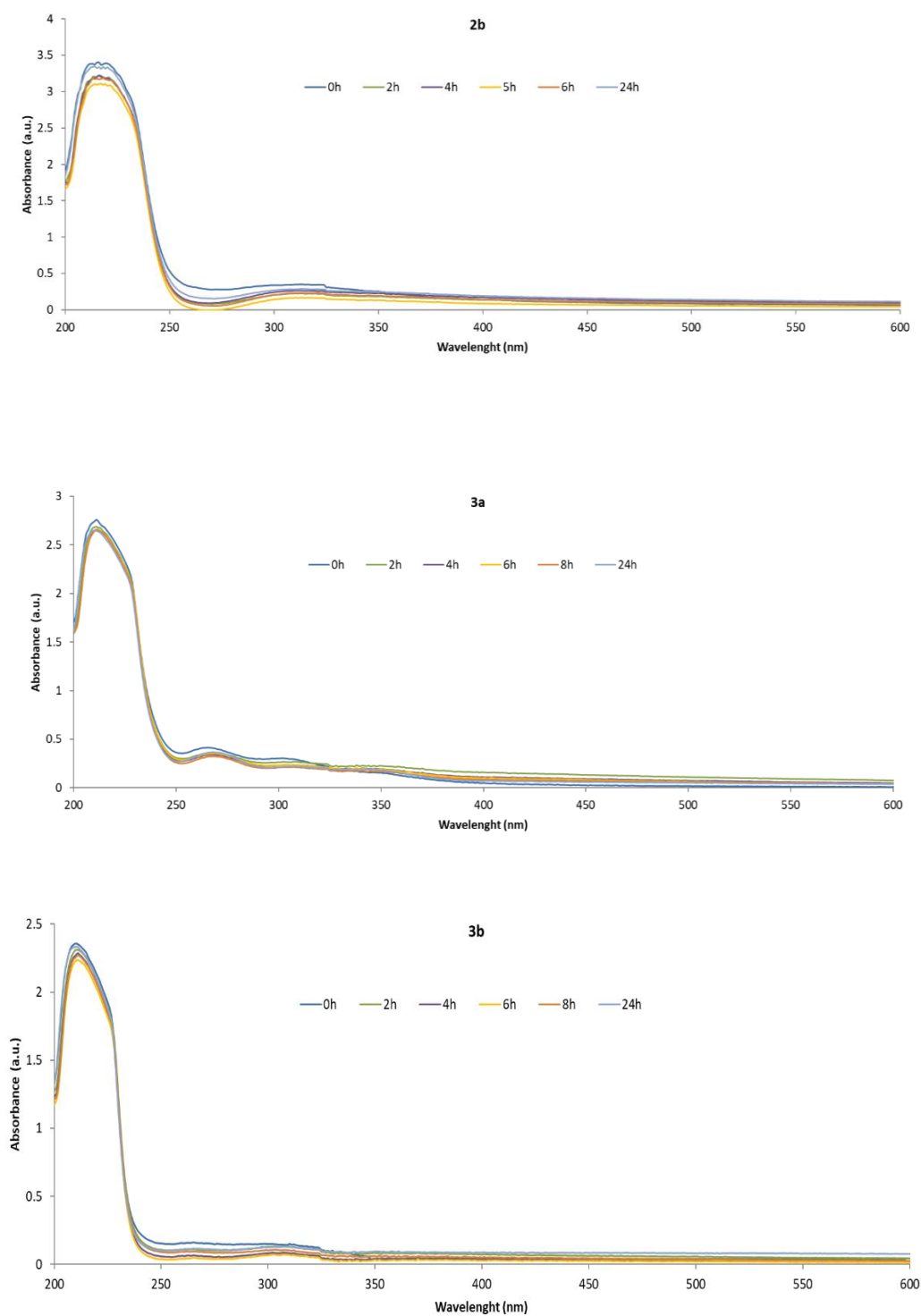


Figure S34. UV-Vis spectra of gold complexes recorded at different times for 24 h to test their stability under physiological conditions. [complex] = 30 μ M diluted in PBS at 37 $^{\circ}$ C.

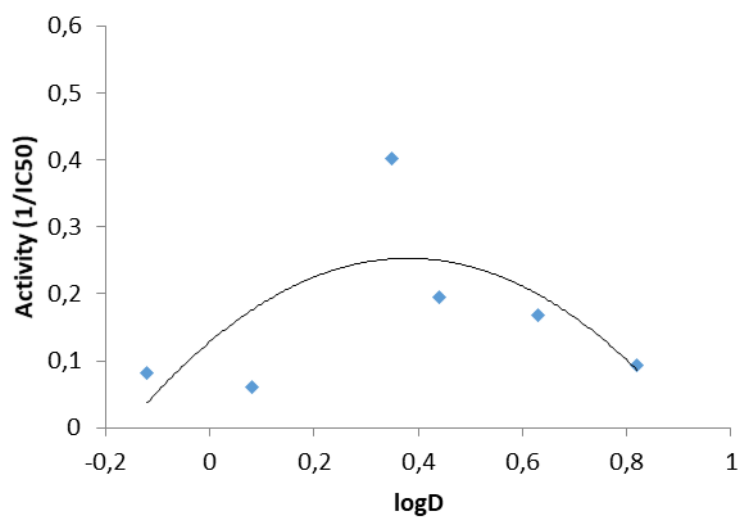


Figure S35. Correlation between cytotoxic activity of the complexes and $\log D_{7.4}$. The activities are calculated as the inverse of IC50 in Caco-2/PD7 cells.

IV.3. *Sulfonamide-derived dithiocarbamate gold(I) complexes induce apoptosis of colon cancer cells by activation of caspase 3 and redox imbalance*

Abstract: Two new families of dithiocarbamate gold(I) complexes derived from benzenesulfonamide with phosphine or carbene as ancillary ligands have been synthesized and characterized. In the screening of their in vitro activity on human colon carcinoma cells (Caco-2), we found that the more lipophilic complexes, those with the phosphine PPh₃, exhibited the highest anticancer activity also displaying significant cancer cell selectivity. [Au(S₂CNHSO₂C₆H₅)(PPh₃)] (**1**) and [Au(S₂CNHSO₂-p-Me-C₆H₄)(IMePropargyl)] (**8**) produce cell death probably by intrinsic apoptosis (mitochondrial membrane potential modification) and caspase 3 activation causing cell cycle arrest in the G1 phase with p53 activation. Besides, both complexes might act as a multi target anticancer drugs, since they inhibit the activity of the enzymes thioredoxin reductase (TrxR) and carbonic anhydrase (CA IX) with alteration of the redox balance and showing a pro-oxidant effect.

Keywords: dithiocarbamate; sulfonamide; thioredoxin reductase; gold(I); colon cancer; carbonic anhydrase

IV.3.1. *Introduction*

Carbonic anhydrases (CAs) consist of a family of metalloenzymes that catalyze the reversible hydration of carbon dioxide to HCO₃⁻ and H⁺. CAs are grouped into seven distinct classes (α , β , γ , δ , η , θ , ζ), being the α -class the best characterized and found primarily in vertebrates. Sixteen α -CA isoforms have been described in mammals. The expression of some of these isoforms, namely the transmembrane isoforms CAIX and CAXII, is induced by hypoxia and they are suggested to promote tumor cell invasion, cell proliferation and metastasis in colorectal cancer [1]. Both isoforms are overexpressed in an extensive variety of solid tumors which are associated with the hypoxic phenotype, such as colon cancer, among others [2,3], although CAXII is as well present under normal conditions in a wide variety of tissues. Therefore, the more specific expression in tumor tissues of CAIX compared to CAXII makes it an interesting target for designing chemotherapeutic agents [4-7]. Thus, its inhibition could lead to a reduced growth of the primary tumors, metastases, decreasing the population of cancer stem cells [8] and reducing the side effects [6]. To date, several types of molecules that act as carbonic anhydrase inhibitors have been described [9-13]. Among them, sulfonamides (R-SO₂NH₂) are the most known as inhibitors of human carbonic anhydrases [14]. Besides, sulfonamides constitute a significant class of chemicals with a wide array of biological activities, such as antibacterial [15-17], antifungal [18], antioxidant [19], anti-inflammatory [20] and anticancer activities [21-23].

Dithiocarbamates as organosulfur ligands play an important role not only as intermediates in chemical synthesis, but also as bioactive compounds with remarkable applications in medicine [24,25]. These include anticancer [26-30], antibacterial [31,32], antitubercular [33], antifungal [34], anti-inflammatory [35] and anti-Alzheimer activities [36,37] among others. Dithiocarbamates have been extensively used as ligands with transition metals because of their antitumor activity. Dithiocarbamate gold derivatives constitute one of the most studied families [38-40], particularly gold(III) derivatives, owing to their structural analogy with platinum(II) and their stability in biological environments. Thus, dithiocarbamate gold(III) complexes were found to overcome intrinsic and acquired cisplatin resistance by inhibition of RNA and DNA synthesis [41,42]. Other putative actions include the inhibition of thioredoxin reductase activity and an increase of ERK1/2 phosphorylation [41]. Glutathione [43], peptide transporters such as PEPT1 and PEPT2, upregulated in several human tumor cells, [44] and proteasome inhibitors [45-48] are equally observed targets of dithiocarbamate gold derivatives. Despite these promising antitumor activities, the detailed molecular mechanism remains unknown.

Dithiocarbamates, in addition to sulfonamide derivatives, are also considered as CA inhibitors [49-53]. Indeed, combination of both moieties in the same molecule has recently led to sulfonamide-dithiocarbamate hybrids as a potent class of carbonic anhydrase inhibitors [54,55]. In line with this approach, we have addressed the synthesis of dithiocarbamate ligands bearing the benzenesulfonamide moiety, their coordination to gold(I) centers and their evaluation as potential antitumor agents against the colon cancer cell line Caco-2. We have also studied putative anticancer mechanisms which include its antiproliferative effect, cell death effectors and known targets of metallic compounds such as carbonic anhydrase (CA) or thioredoxin reductase (TrxR1).

IV.3.2. Materials and Methods

IV.3.2.1. General

Commercial solvents and reagents were used without further purification. The starting material [AuCl(PPh₃)], [AuCl(TPPTS)] [56] and [AuBr(IRPropargyl)] (R = Me, Bn) [57] were prepared as previously reported. A Bruker Avance 400 or a Bruker ARX 300 spectrometers (Bruker, Billerica, MA, USA) were used to monitor ¹H, ¹³C{¹H} and ³¹P{¹H} chemical shifts (δ, ppm) and expressed as relative to the solvent peaks in the ¹H, ¹³C spectra or external 85% H₃PO₄ in ³¹P spectra. IR spectra were recorded in the range 4000–200 cm⁻¹ on a Perkin-Elmer Spectrum 100 spectrophotometer (PerkinElmer Life, Shelton, CT, USA) on solid samples using an attenuated total reflectance accessory.

IV.3.2.2. Synthesis of the dithiocarbamates p-RC₆H₄SO₂NHCS₂Na (R = H, L1; Me, L2; Cl, L3)

To an ice-cold water solution (20 mL) of the corresponding sulfonamide (10 mmol) was added CS₂ (10 mmol) and a water (10 mL) solution of NaOH (10 mmol). After 6 h of stirring, the solution

was filtered and evaporated to dryness. The residue was dissolved in ethanol and filtered through celite and the solution was reduced to minimum volume under vacuum. A white solid was obtained and washed with n-hexane. See Figures S1–S6 for RMN spectra.

$C_6H_5SO_2NHCS_2Na$ (**L1**). White solid in 78% yield. 1H NMR (400 MHz, D_2O , 25 °C) δ (ppm) = 7.73 (dd, 2H, $J_{H-H} = 7.6$; 1.2 Hz); 7.46–7.41 (m, 3H) ppm. $^{13}C\{^1H\}$ NMR (101 MHz): δ (ppm): 146.1 (s, ipso-Ph), 131.0 (s, p-Ph), 128.9 (s, m-Ph), 124.9 (s, o-Ph). IR (cm^{-1}): $\nu(NH)$ 3303, $\nu(N-CSS)$ 1546, $\nu(SO_2)_a$ 1206 cm^{-1} , $\nu(SO_2)_s$ 1151, $\nu(SCS)$ 978, 1003. Elemental analysis calcd. (%) for $C_7H_6NaNO_2S_3$ (Pm = 225.298) %C: 32.93 %H: 2.37 %N: 5.49 found: %C: 33.48; %H: 2.58; %N: 6.08.

p-Me- $C_6H_4SO_2NHCS_2Na$ (**L2**). White solid in 70% yield. 1H NMR (400 MHz, D_2O , 25 °C) δ (ppm) = 7.70 and 7.33 (AA'XX' system, 4H); 2.37 (s, 3H) ppm. $^{13}C\{^1H\}$ NMR (101 MHz): δ (ppm) = 143.1 (s, ipso-Ph), 141.9 (s, ipso-Ph), 129.3, 125.0 (s, Ph), 20.45 (s, Me). IR (cm^{-1}): $\nu(NH)$ 3208, $\nu(N-CSS)$ 1598, $\nu(SO_2)_a$ 1206, $\nu(SO_2)_s$ 1149, $\nu(SCS)$ 982, 966. Elemental analysis calcd. (%) for $C_8H_8NaNO_2S_3$ (Pm = 269.324) %C: 35.67 %H: 2.99 %N: 5.20 found: %C: 36.12; %H: 3.12; %N: 5.75.

p-Cl- $C_6H_4SO_2NHCS_2Na$ (**L3**). White solid in 58% yield. 1H NMR (400 MHz, D_2O , 25 °C) δ (ppm) = 7.78 and 7.52 (AA'XX' system, 4H) ppm. $^{13}C\{^1H\}$ NMR (100 MHz): δ (ppm) = 160.9 (CS), 143.8, 137.3 (s, ipso-Ph), 129.5, 127.7 (s, Ph), IR: $\nu(NH)$ 3208, $\nu(N-CSS)$ 1570, $\nu(SO_2)_a$ 1197, $\nu(SO_2)_s$ 1147, $\nu(SCS)$ 979, 966. Elemental analysis calcd. (%) for $C_7H_5ClNaNO_2S_3$ (Pm = 288.90) %C: 29.02 %H: 1.74 %N: 4.84 found: %C: 29.56; %H: 2.09; %N: 5.37.

IV.3.2.3. Synthesis of the complexes $[Au(S_2CNHSO_2-p-RC_6H_4)(PPh_3)]$ (R = H, 1; Me, 2; Cl, 3)

To a dichloromethane solution (10 mL) of $[AuClPPh_3]$ (0.2 mmol) was added the corresponding dithiocarbamate (0.2 mmol). After 2 h of stirring, the solution was filtered through celite and the solution was reduced to minimum volume under vacuum. A white solid was obtained and washed with n-hexane. See Figures S7–S12 for RMN spectra.

$[Au(S_2CNHSO_2C_6H_5)(PPh_3)]$ (**1**). White solid in 60% yield. 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$, 25 °C) δ (ppm) = 8.02 (dd, 2H, $J_{H-H} = 7.8$; 1.6 Hz); 7.53–7.37 (m, 18H); 3.89 (s, 1H, NH) ppm. $^{31}P\{^1H\}$ NMR (162 MHz): δ (ppm) = 32.6 (s). $^{13}C\{^1H\}$ NMR (75.4 MHz): δ (ppm) = 147.1 (s, $C_{ipso-Ph}$), 134.1 (d, 6C, C_o , $J = 13.6$ Hz, PPh_3), 131.9 (d, 3C, C_p , $J = 2.4$ Hz, PPh_3), 130.5 (s, C_p-Ph), 129.2 (d, 6C, C_m , $J = 11.8$ Hz, PPh_3), 128.3 (s, C_{ipso} , PPh_3), 128.4 and 126.0 (s, Ph). IR (cm^{-1}): $\nu(NH)$ 3255, $\nu(N-CSS)$ 1582, $\nu(SO_2)_a$ 1284, $\nu(SO_2)_s$ 1136, $\nu(SCS)$ 1010, 997, $\nu(Au-S)$ 273. Elemental analysis calcd. (%) for $C_{25}H_{21}AuNO_2PS_3$ (Pm = 691.548) %C: 43.42 %H: 3.06 %N: 2.03 found: %C: 42.96; %H: 3.24; %N: 2.05.

$[Au(S_2CNHSO_2-p-Me-C_6H_4)(PPh_3)]$ (**2**). White solid in 78% yield. 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$, 25 °C) δ (ppm) = 7.92 and 7.20 (AA'XX' system, 4H); 7.55–7.44 (m, 15H, PPh_3); 3.89 (s, 1H, NH); 2.38 (s, 3H) ppm. $^{31}P\{^1H\}$ NMR (162 MHz): δ (ppm) = 32.8 (s). $^{13}C\{^1H\}$ NMR (75.4 MHz): δ (ppm) = 145.4 (s, $C_{ipso-Ph}$), 14.8 (s, $C_{para-Ph}$), 134.1 (d, 6C, C_o , $J = 13.6$ Hz, PPh_3), 131.7 (d, 3C, C_p , $J = 2.4$ Hz, PPh_3), 129.1 (d, 6C, C_m , $J = 11.8$ Hz, PPh_3), 128.4 (s, C_{ipso} , PPh_3), 129.0 and 126.0 (s, Ph), 21.4 (s, Me). IR (cm^{-1}): $\nu(NH)$ 3268, $\nu(N-CSS)$ 1598, $\nu(SO_2)_a$ 1297, $\nu(SO_2)_s$ 1141, $\nu(SCS)$ 1020, 997, $\nu(Au-S)$ 270 cm^{-1} .

Elemental analysis calcd. (%) for $C_{26}H_{23}AuNO_2PS_3$ (Pm = 705.574) %C: 44.26 %H:3.29 %N: 1.99 found: %C: 44.16; %H: 3.41; %N: 2.13.

[$Au(S_2CNHSO_2-p-Cl-C_6H_4)(PPh_3)$] (**3**). White solid in 75% yield. 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$, 25 °C) δ (ppm) = 7.97 and 7.63 (AA'XX' system, 4H); 7.58–7.44 (m, 15H, PPh_3); 3.92 (s, 1H, NH) ppm. $^{31}P\{^1H\}$ NMR (162 MHz): δ (ppm) = 32.6 (s). $^{13}C\{^1H\}$ NMR (75.4 MHz): δ (ppm) = 145.7 (s, $C_{ipso-Ph}$), 136.5 (s, C-Cl), 134.1 (d, 6C, C_o , $J = 13.6$ Hz, PPh_3), 132.0 (d, 3C, C_p , $J = 2.6$ Hz, PPh_3), 129.3 (d, 6C, C_m , $J = 11.8$ Hz, PPh_3), 128.6 (s, C_{ipso} , $J = 62.4$ Hz, PPh_3), 128.2 and 127.6 (s, Ph). IR (cm^{-1}): $\nu(NH)$ 3267, $\nu(N-CSS)$ 1571, $\nu(SO_2)_a$ 1297, $\nu(SO_2)_s$ 1144, $\nu(SCS)$ 1013, 997, $\nu(Au-S)$ 269. Elemental analysis calcd. (%) for $C_{25}H_{20}AuClNO_2PS_3$ (Pm = 725.990) %C: 41.36 %H: 2.78 %N: 1.93 found: %C: 40.86 %H: 2.65 %N: 2.05.

IV.3.2.4. Synthesis of the complexes [$Au(S_2CNHSO_2-p-RC_6H_4)(TPPTS)$] (R = H, **4**; Me, **5**; Cl, **6**)

The corresponding dithiocarbamate (0.2 mmol) was added to 10 mL of a methanolic solution containing 0.2 mmol of [$AuClTPPTS$]. After 2 h of stirring, the solution was evaporated to dryness and dissolved in dichloromethane. This solution was filtered through *celite* and reduced to minimum volume under vacuum. A white solid was obtained and washed with n-hexane. See Figures S13–S18 for RMN spectra.

[$Au(S_2CNHSO_2C_6H_5)(TPPTS)$] (**4**). White solid in 74% yield. 1H NMR (400 MHz, $dmsO-d_6$, 25 °C) δ (ppm) = 7.97 and 7.63 (AA'XX' system, 4H); 7.58–7.44 (m, 15H, PPh_3); 3.92 (s, 1H, NH) ppm. $^{31}P\{^1H\}$ NMR (162 MHz): δ (ppm) = 33.4 (s). $^{13}C\{^1H\}$ NMR (101 MHz): δ (ppm) = 7.90–7.80 (m, 8H, $Ph + TPPTS$), 7.60–7.56 (m, 3H, $TPPTS$), 7.54–7.51 (m, 2H, Ph), 7.44–7.41 (m, 1H, Ph), 7.38–7.26 (m, 3H, $TPPTS$). $^{31}P\{^1H\}$ NMR (162 MHz): δ (ppm) = 33.4 (s). $^{13}C\{^1H\}$ NMR (75.4 MHz): δ (ppm) = 149.6 (d, $J = 12.1$ Hz, C-SO₃, $TPPTS$), 134.0 (d, $J = 12.5$ Hz, $TPPTS$), 131.1 (d, $J = 16.5$ Hz, $TPPTS$), 129.9 (m, $TPPTS$), 128.2 (d, $J = 60$ Hz, $TPPTS$), 129.7 and 129.5 (s, Ph), 21.4 (s, Me). IR (cm^{-1}): $\nu(N-CSS)$ 1460, $\nu(SO_2)_a$ 1310, $\nu(OSO)$ 1189, $\nu(SO)$ 1036 and 616, $\nu(SO_2)_s$ 1145, $\nu(SCS)$ 1012, 995, $\nu(Au-S)$ 270 cm^{-1} . Elemental analysis calcd. (%) for $C_{25}H_{18}AuNNa_3O_{11}S_6$ (Pm = 997.68) %C: 30.10 %H: 1.82 %N: 1.40 found: %C: 29.92 %H: 2.24 %N: 0.9.

[$Au(S_2CNHSO_2-p-Me-C_6H_4)(TPPTS)$] (**5**). White solid in 70% yield. 1H NMR (400 MHz, $dmsO-d_6$, 25 °C) δ (ppm) = 7.87–7.74 (m, 8H, $Ph + TPPTS$), 7.62–7.58 (m, 3H, $TPPTS$), 7.40–7.32 (m, 5H, $TPPTS + Ph$), 2.34 (s, 3H, Me). $^{31}P\{^1H\}$ NMR (162 MHz): δ (ppm) = 33.3 (s). $^{13}C\{^1H\}$ NMR (101 MHz): δ (ppm) = 149.6 (d, $J = 12.1$ Hz, C-SO₃, $TPPTS$), 134.1 (d, $J = 12.5$ Hz, $TPPTS$), 131.1 (d, $J = 16.5$ Hz, $TPPTS$), 130.5 (s, C_p-Ph), 129.8 (m, $TPPTS$), 127.8 and 125.7 (s, Ph). IR (cm^{-1}): $\nu(N-CSS)$ 1465, $\nu(SO_2)_a$ 1290, $\nu(OSO)$ 1189, $\nu(SO)$ 1036 and 617, $\nu(SO_2)_s$ 1148, $\nu(SCS)$ 1013, 996, $\nu(Au-S)$ 275 cm^{-1} . Elemental analysis calcd. (%) for $C_{26}H_{20}AuNNa_3O_{11}S_6$ (Pm = 1011.71) %C: 30.67 %H: 1.99 %N: 1.38 found: %C: 29.92 %H: 2.44 %N: 0.8.

[$Au(S_2CNHSO_2-p-Cl-C_6H_4)(TPPTS)$] (**6**). White solid in 75% yield. 1H NMR (400 MHz, $dmsO-d_6$, 25 °C) δ (ppm) = 7.89 and 7.61 (AA'XX' system, 4H, Ph); 7.84–7.74 (m, 6H, $TPPTS$), 7.59–7.51 (m, 3H, $TPPTS$), 7.36–7.242 (m, 3H, $TPPTS$). $^{31}P\{^1H\}$ NMR (162 MHz): δ (ppm) = 33.5 (s). IR (cm^{-1}): ν

(N-CSS) 1465, $\nu(\text{SO}_2)_a$ 1308, $\nu(\text{OSO})$ 1189, $\nu(\text{SO})$ 1036 and 616 $\nu(\text{SO}_2)_s$, 1147, $\nu(\text{SCS})$ 1011, 993, $\nu(\text{Au-S})$ 270 cm^{-1} . Elemental analysis calcd. (%) for $\text{C}_{25}\text{H}_{17}\text{AuClN}_3\text{O}_{11}\text{S}_6$ (Pm = 1032.13) %C: 29.09 %H: 1.66 %N: 1.36 found: %C: 28.57 %H: 2.04 %N: 0.84.

IV.3.2.5. Synthesis of the complexes $[\text{Au}(\text{S}_2\text{CNHSO}_2\text{-p-RC}_6\text{H}_4)(\text{IR}''\text{Propargyl})]$ (R = H, R'' = Me, 7, R'' = Bn, 9; R = Me, R'' = Me, 8; R'' = Bn, 10)

To a dichloromethane solution (10 mL) of $[\text{AuCl}(\text{NHC})]$ (0.2 mmol) was added the corresponding dithiocarbamate (0.2 mmol). After 1 h of stirring, the solution was filtered through *celite* and the solution was reduced to minimum volume under vacuum. A white solid was obtained after addition of pentane. See Figures S19–S26 for RMN spectra.

$[\text{Au}(\text{S}_2\text{CNHSO}_2\text{C}_6\text{H}_5)(\text{IMePropargyl})]$ (7). Cream solid in 60% yield. ^1H NMR (400 MHz, dmsO-d_6 , 25 °C) δ (ppm) = 7.85–7.82 (m, 2H, *Ph*), 7.60–7.56 (m, 3H, *Ph*), 7.54 (d, $J = 1.9$ Hz, 1H, $\text{CH}_{\text{imidazole}}$), 7.48 (d, $J = 1.9$ Hz, 1H, $\text{CH}_{\text{imidazole}}$), 7.34 (s_{br}, 1H, -NH-), 5.00 (d, $J = 2.6$ Hz, 2H, CH_2), 3.77 (s, 3H, CH_3), 3.59 (t, $J = 2.6$ Hz, 1H, $\text{C}\equiv\text{CH}$). $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ APT RMN (101 MHz) δ : 173.0 (s, NCHN), 144.6 (s, *ipso-Ph*), 132.2 (s, *p-Ph*), 129.38 (s, *m-Ph*), 126.0 (s, *o-Ph*), 123.6 (s, CH_{im}), 121.75 (s, CH_{im}), 78.6 (s, $\text{C}\equiv\text{CH}$), 77.7 (s, $\text{C}\equiv\text{CH}$), 40.3 (s, $\text{CH}_2\text{-C}\equiv\text{CH}$), 38.2 (s, CH_3). IR (cm^{-1}): $\nu(-\text{NH-})$ 3352, $\nu(\text{C}\equiv\text{CH})$ 3257, $\nu(\text{C}\equiv\text{C})$ 2123, $\nu(\text{N-CSS})$ 1566, $\nu(\text{SO}_2, a)$ 1288, $\nu(\text{SO}_2, s)$ 1156, $\nu(\text{CSS})$ 1010, 997, $\nu(\text{Au-S})$: 263. Elemental analysis calcd. (%) for $\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{AuN}_3\text{O}_2\text{S}_3$ (Pm = 549.43) %C: 30.61 %H: 2.57 %N: 7.65 found: %C: 29.92 %H: 2.80 %N: 7.24.

$[\text{Au}(\text{S}_2\text{CNHSO}_2\text{-p-Me-C}_6\text{H}_4)(\text{IMePropargyl})]$ (8). Cream solid in 89% yield. ^1H NMR (400 MHz, dmsO-d_6 , 25 °C) δ (ppm) = 7.71 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H, *Ph*), 7.54 (d, $J = 1.9$ Hz, 1H, CH_{im}), 7.48 (d, $J = 1.9$ Hz, 1H, CH_{im}), 7.36 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H, *Ph*), 7.25 (s, br, 1H, -NH-), 5.00 (d, $J = 2.6$ Hz, 2H, CH_2), 3.77 (s, 3H, CH_3), 3.59 (t, $J = 2.6$ Hz, 1H, $\text{C}\equiv\text{CH}$), 2.37 (s, 3H, CH_3). $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR (101 MHz): δ (ppm) = 172.51 (s, NCHN), 141.83 (s, *p-Ph*), 141.38 (s, *ipso-Ph*), 129.24 (s, *m-Ph*), 125.53 (s, *o-Ph*), 123.02 (s, CH_{im}), 121.25 (s, $\text{CH}_{\text{imidazole}}$), 78.12 (s $\text{C}\equiv\text{CH}$), 77.21 (s, $\text{C}\equiv\text{CH}$), 39.78 (s, $\text{CH}_2\text{-C}\equiv\text{CH}$), 37.67 (s, CH_3), 20.74 (s, $\text{CH}_3\text{-Ph}$). IR (cm^{-1}): (-NH-) 3358; $\nu(\text{C}\equiv\text{CH})$ 3261, $\nu(\text{N-CSS})$ 1561, $\nu(\text{SO}_2, a)$ 1299, $\nu(\text{SO}_2, s)$ 1164, $\nu(\text{CSS})$ 1003, 997, $\nu(\text{Au-S})$: 255. Elemental analysis calcd. (%) for $\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{AuN}_3\text{O}_2\text{S}_3$ (Pm = 563.46) %C: 31.97 %H: 2.86 %N: 7.46 found: %C: 30.40 %H: 2.82 %N: 7.44.

$[\text{Au}(\text{S}_2\text{CNHSO}_2\text{C}_6\text{H}_5)(\text{IBnPropargyl})]$ (9). Cream solid in 84% yield. ^1H NMR (400 MHz, dmsO-d_6 , 25 °C) δ (ppm) = 7.85–7.81 (m, 2H, *Ph*), 7.62–7.57 (m, 5H, 3H *Ph* + 2 CH_{im}), 7.39–7.36 (m, 6H, Ph_{Bn} + 1H, -NH-), 5.37 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{-Ph}_{\text{Bn}}$), 5.03 (d, $J = 2.6$ Hz, 2H, CH_2), 3.62 (t, $J = 2.6$ Hz, 1H, $\text{C}\equiv\text{CH}$). $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ APT RMN (101 MHz) δ : 201.29 (s, SCS), 172.57 (s, NCHN), 144.11 (s, *ipso-Ph*), 136.43 (s, *ipso-Ph}_{\text{Bn}}*), 131.76 (s, *p-Ph*), 128.90 (s, *m-Ph*), 128.76 (s, *m-Ph}_{\text{Bn}}*), 127.64 (s, *o-Ph}_{\text{Bn}}*), 127.53 (s, *p-Ph}_{\text{Bn}}*), 125.54 (s, *o-Ph*), 122.09 (s, $\text{CH}_{\text{imidazole}}$), 121.86 (s, $\text{CH}_{\text{imidazole}}$), 77.96 (s $\text{C}\equiv\text{CH}$), 77.36 (s, $\text{C}\equiv\text{CH}$), 53.82 (s, $\text{CH}_2\text{-Ph}_{\text{Bn}}$), 39.37 (s, $\text{CH}_2\text{-C}\equiv\text{CH}$). IR (cm^{-1}): $\nu(-\text{NH-})$ 3346; $\nu(\text{C}\equiv\text{CH})$ 3256; $\nu(\text{C}\equiv\text{C})$ 2131; $\nu(\text{N-CSS})$ 1559; $\nu(\text{SO}_2, a)$ 1297; $\nu(\text{SO}_2, s)$ 1156; $\nu(\text{CSS})$ 1002, 996, $\nu(\text{Au-S})$: 270. Elemental analysis calcd. (%) for $\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{AuN}_3\text{O}_2\text{S}_3$ (Pm = 625.53) %C: 38.40 %H: 2.90 %N: 6.72 found: %C: 37.89 %H: 2.95 %N: 6.68.

[Au(S₂CNHSO₂-*p*-Me-C₆H₄)(IBnPropargyl)] (**10**). Cream solid in 80% yield. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, 25 °C) δ (ppm) = 7.72 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H, *Ph*), 7.62 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H, CH_{imidazole}), 7.59 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H, CH_{imidazole}), 7.38–7.35 (m, 7H, 2*Ph* + *Ph*_{Bn}), 7.27 (s_{ancho}, 1H, -NH-), 5.37 (s, 2H, CH₂-Ph_{Bn}), 5.03 (d, *J* = 2.6 Hz, 2H, CH₂-C≡CH), 3.63 (t, *J* = 2.6 Hz, 1H, C≡CH), 2.37 (s, 3H, CH₃). ¹³C{¹H} APT RMN (101 MHz) δ: 172.51 (s, NCHN), 141.82 (s, *ipso-Ph*), 141.36 (s, *p-Ph*), 136.32 (s, *ipso-Ph* (Bn)), 129.27 (s, *m-Ph*), 128.76 (s, *m-Ph*_{Bn}), 128.16 (s, *o-Ph*_{Bn}), 127.64 (s, *p-Ph*_{Bn}), 125.58 (s, *o-Ph*), 122.09 (s, CH_{imidazole}), 121.86 (s, CH_{imidazole}), 78.00 (s C≡CH), 77.35 (s, C≡CH), 53.80 (s, CH₂-Ph_{Bn}), 40.08 (s, CH₂-C≡CH), 20.89 (s, CH₃). IR (cm⁻¹): ν(-NH-) 3355, ν(C≡CH) 3260, ν(C≡C) 2137, ν(N-CSS) 1527, ν(SO₂, a) 1298, ν(SO₂, s) 1156, υ (CSS) 1005, 995, ν Au-S): 304. Elemental analysis calcd. (%) for C₂₁H₂₀AuN₃O₂S₃ (Pm = 639.56) %C: 39.44 %H: 3.15 %N: 6.57 found: %C: 38.93 %H: 3.17 %N: 6.16.

IV.3.2.6. Distribution coefficient (*log P*_{7.4})

The n-octanol–water coefficients of the complexes were determined using a shake-flask method as reported previously [58]. Briefly, 100 mL of buffered-saline (0.15 M NaCl, 10 mM phosphate [PO₄³⁻] buffer, pH 7.4) and 100 mL of n-octanol were shaken for 72 h. The addition of 1 mg of the complexes followed by centrifugation and separation of both phases gave two solutions which were analyzed by UV absorbance spectroscopy to determine their concentration in each phase. The corresponding value of log P was defined as log{[compound(organic)]/[compound(aqueous)]}.

IV.3.2.7. Solution chemistry

The stability of the new derivatives was analyzed by absorption UV spectroscopy. The spectra of the complexes were recorded on a Thermo Scientific spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Solutions of the complexes (5 × 10⁻⁵ M) in PBS (pH 7.4) were prepared from their stock solutions in dimethylsulfoxide (10 mM). The final concentration of DMSO in the test cell was 0.5%. The samples were then incubated at 37 °C and their UV spectra registered over 24 h.

IV.3.2.8. Culture, treatment and cytotoxicity determination in cells

Human Caco-2 cell line (TC7 clone) was kindly provided by Dr. Edith Brot-Laroche (Université Pierre et Marie Curie-Paris 6, UMR S 872, Les Cordeliers, France). Human epithelial fibroblasts cells (NHDF-Ad, Lonza[®]) were kindly provided by Dr. Gracia Mendoza (Aragon Health Research Institute, IIS Aragón, Spain). Caco-2 cells (passages 40–70) and fibroblasts (passages 10–30) were maintained in a humidified atmosphere of 5% CO₂ at 37 °C. and grown in medium following the method used by Quero et al. [59]. Caco-2 cells were sub-cultured on 25 cm² plastic flasks at a density of 1.2 × 10⁴ cells/cm², while fibroblasts were sub-cultured on 75 cm² plastic flasks at a density of 1 × 10⁴ cells/cm². Culture medium was replaced every 2 days.

Gold complexes were diluted in dimethyl sulfoxide (DMSO) as a 10 mM stock solution, and then diluted in cell culture medium at the desired concentrations.

For cytotoxicity screening assays, Caco-2 cells were seeded in 96-well plates at a density of 4×10^3 cells/well. Culture medium was replaced with medium containing drug panel 24 h post-seeding and cells were incubated for 24, 48 and 72 h. An initial range of complex concentrations 1.25–20 μ M in undifferentiated Caco-2 and 5–50 μ M in differentiated Caco-2 were used to determine IC_{50} values. For specific determinations in undifferentiated Caco-2 cells, range of concentrations was adjusted depending on the assayed compound: 0.5–2.5 μ M for complexes 1, 2 and 3; 15–40 μ M (complex 4); 35–60 μ M (complex 5); 10–50 μ M (complex 6); 20–40 μ M (complex 7); 1.25–7.5 μ M (complex 8); 2.5–12.5 μ M (complex 9) and 1.25–20 μ M (complex 10). In differentiated Caco-2 and fibroblasts, culture medium containing metal gold complexes was added 15 days post-seeding and the cells were incubated for 72 h. Antiproliferative effect was measured with MTT assay as previously described by Mármol et al. [60]. Absorbance at 540/620 nm was measured with SPECTROstar Nano (BMG Labtech, Ortenberg, Germany). To determine the selectivity index (SI) the IC_{50} value differentiated Caco-2 cells was divided by IC_{50} value in undifferentiated Caco-2, obtaining a ratio normal/cancerous cells toxicity.

IV.3.2.9. Apoptosis measurement

Caco-2 cells were seeded in 75 cm² flasks at a density of 1×10^4 cells/cm² and then exposed to the drug panel for 48 or 72 h depending on the compound tested and stained with annexin V-FITC and sodium iodide propidium according to the manufacturer's instructions. Cells were then transferred to flow cytometry tubes and washed twice with phosphate-buffered saline (PBS), and resuspended in 100 μ L of annexin V binding buffer (100 mM Hepes/NaOH pH 7.4, 140 nM NaCl, 2.5 mM CaCl₂). 5 μ L of annexin V-FITC and 5 μ L propidium iodide (PI) were added to the tube. After 15 min incubation at room temperature protected from light, 400 μ L annexin binding buffer were added to each sample and signal intensity was analyzed within 1 h with BECKMAN COULTER GALLIOS (Brea, CA, USA). Data was analyzed with BD FACSDiva™ [59].

IV.3.2.10. Propidium Iodide staining of DNA content and cell cycle analysis

Once the cells were seeded in 25 cm² flasks at a density of 1×10^4 cells/cm², they were exposed, after 24 post-seeding, to the drug panel for 48 or 72 h. Cells were fixed according to the previously described methods [59,60] before staining them with 50 μ g/mL PI solution. Signal intensity was analyzed with a BECKMAN COULTER GALLIOS (Brea, CA, USA) equipped with a blue solid diode laser (488 nm) and a red solid diode laser (635 nm), collecting fluorescence with a 620 nm long pass filter. Cell distribution was displayed on a linear scale and analyzed with ModFit LT™ verity software, which determined the percentage of cells in every cycle phase.

IV.3.2.11. Mitochondrial membrane potential assay

Caco-2 cells were seeded in 75 cm² flasks at a density of 1×10^4 cells/cm² and 24 h post-seeding medium was replaced with medium containing drug panel and incubated for 48 or 72 h. Cells were then washed twice and resuspended in PBS at a concentration of 10^6 cells/mL before incubation with 5 μ L of 10 μ M 1,1',3,3,3'-hexamethylindodicarbocyanine iodide (DiIc1). After 15 min incubation at 37 °C, 400 μ L PBS were added and fluorescence was measured by flow cytometry at excitation wavelength of 633 nm and emission of 658 nm with BECKMAN COULTER GALLIOS (Brea, CA, USA) equipped with a blue solid diode laser (488 nm) and a red solid diode laser (635 nm) [59].

IV.3.2.12. Determination of caspase 3 and p53 proteins

Caco-2 cells were seeded in 75 cm² flask at a density of 1×10^4 cells/cm² and, 24 h later, exposed to drug panel for 48 or 72 h. Then cells were collected and processed as previously described [59,61]. Finally, 50 μ L of every sample were incubated with 5 μ L anti-active caspase-3 (BD Pharmigen, Clone C92-605) and 5 μ L p53 antibody (Miltenyi, Clone REA609). Fluorescence was measured by flow cytometry using a BECKMAN COULTER GALLIOS (Brea, CA, USA) equipped with a blue solid diode laser (488 nm) and a red solid diode laser (635 nm). For caspase-3 determination excitation wavelength was set at 488 nm and emission at 525 nm and for p53 analysis excitation at 635 nm and emission at 660 nm.

IV.3.2.13. Thioredoxin reductase 1 (TrxR1) activity assay

In vitro interaction of metal complexes with the enzyme thioredoxin reductase was analyzed with a thioredoxin reductase assay kit (Sigma, CS0170, St Louis, MO, USA). Procedure instructions in the kit were followed, replacing rat liver thioredoxin reductase by recombinant human enzyme TrxR1 (SRP 6081, Sigma, St Louis, MO, USA). Reaction was initiated by adding DTNB (100 mM) and conversion to TNB⁻ was monitored at 412 nm every 30 s for 22 min using a SPECTROstar Nano (BMG Labtech, Ortenberg, Germany) multiplate reader. Results were expressed as percentage of TrxR activity respect to control.

IV.3.2.14. Carbonic anhydrase (CA) activity assay

In vitro effect of metal complexes on the enzyme carbonic anhydrase IX was analyzed monitoring conversion of 4-nitrophenyl acetate (4-NPA) to 4-nitrophenol. The tests were carried out in 96-well plates. Gold complexes (4 μ L) were incubated with 4 μ L of recombinant human carbonic anhydrase IX (Sigma SRP6483, St Louis, MO, USA) (50 μ g/mL) at 25 °C for 5 min. PBS pH 7.35 (Sigma D1408, St Louis, MO, USA) was added to reach a final volume of 90 μ L. Reaction was started by adding 10 μ L of 4-NPA (0.5 mM in methanol) and absorbance at 405 nm was monitored every 30 s for 1 h with SPECTROstar Nano (BMG Labtech, Ortenberg, Germany) multiplate reader. Results were expressed as

percentage of CA-IX activity respect to control. Potency of the inhibition was referred to the incubation in presence of indisulam (E7070, *N*-(3-chloro-7-indolyl)-1,4-benzenedisulfonamide) (Sigma SML1225, St Louis, MO, USA), a specific inhibitor of carbonic anhydrase isoforms IX and XII.

IV.3.2.15. Intracellular levels of reactive oxygen species (ROS)

After Caco-2 cells were seeded in 96-wells plate at a density of 4×10^3 cells/well, intracellular ROS levels were determined with the dichlorofluorescein assay [62] and following the protocol used by Quero et al. [59]. Cells were exposed to drug panel for 1, 3 and 24 h and then incubated with 20 μ M 2'-7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) in DMEM. The generation of oxidized derivative DCF was monitored by measuring the increase of fluorescence for 1 h, at an emission wavelength of 520 nm and excitation of 485 nm, with a FLUOstar Omega (BMG Labtech, Ortenberg, Germany) multiplate reader. Results were expressed as percentage of fluorescence respect to control, considering fluorescence intensity as a reflection of intracellular ROS levels.

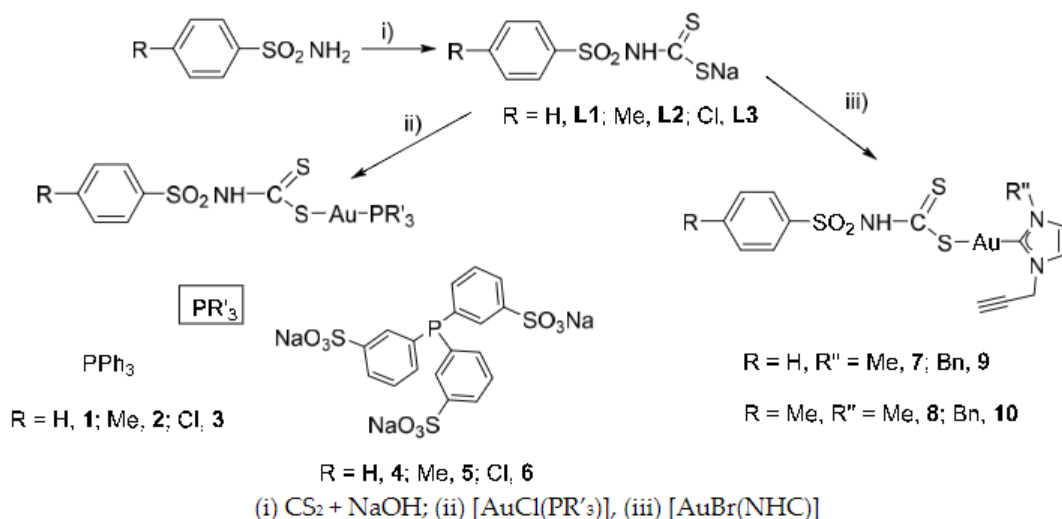
IV.3.2.16. Statistical analysis

Statistical analysis and graphics were performed with GraphPad Prism Version 5.02 program on a PC computer (La Jolla, CA, USA). All assays were performed at least three times. Data are presented as mean \pm SD using one-way analysis of variance (ANOVA). Significant differences at $p < 0.05$ were compared using a Bonferroni's Multiple Comparison Test.

IV.3.3. Results and discussion

IV.3.3.1. Chemical studies

The dithiocarbamate sodium salts **L1–3** (Scheme 1) bearing the sulphonamide moiety were readily obtained by the reaction of the primary amines: benzenesulfonamide, 4-methylbenzenesulfonamide and 4-chlorobenzenesulfonamide with CS₂ in the presence of sodium hydroxide as base. The salts were characterized by NMR and IR spectroscopy. Their ¹H NMR spectra display the corresponding multiplets due to the phenyl ring in the case of **L1** and the AA'XX' system in the cases of *para*-benzene substituted **L2** and **L3**. Their IR spectra show the most significant bands, such as the bands assigned to $\nu(\text{NH})$, $\nu_{\text{sym}}(\text{SO}_2)$, $\nu_{\text{as}}(\text{SO}_2)$, the later displaced to lower wavenumbers in comparison with the sulfonamide starting material, $\nu \text{N-CSS}$ and $\nu(\text{C-S})$ vibrations.



Scheme 1. Synthesis of dithiocarbamates and the corresponding gold derivatives.

The addition of [AuCl(PR₃)] (PR₃ = PPh₃ or TPPTS, trisulfonated triphenylphosphine sodium salt) or [AuBr(NHC)] (NHC = IRPropargyl; R = Me, Bn) to the dithiocarbamate-sulfonamide sodium salts **L1–3**, afforded the isolation of the corresponding phosphane dithiocarbamate gold(I) complexes **1–3** (with PPh₃) and **4–6** (with TPPTS) and the carbene dithiocarbamate homologues **7–10** as air- and moisture stable solids at room temperature.

Their ¹H NMR spectra display similar signals to those of the starting ligands shifted to low field due to the gold coordination. In the case of NHC derivatives (**7–10**), the formation of the dithiocarbamate carbene species was confirmed by the disappearance of the C2-H (NCHN) imidazoleium proton in the ¹H NMR spectra (at around 9.3 ppm), the downfield shift of the carbene carbon atom nuclei in their ¹³C{¹H} NMR spectra to around 170 ppm and a signal ca. 200 ppm assigned to the NCS₂ carbon atom.

The presence of dithiocarbamate ligands was also confirmed by the appearance of the typical bands in three regions of the IR [63]. Thus, there is a band in the 1450–1580 cm⁻¹ region, which is primarily associated with the thioureide band due to the ν(N-CSS) vibration, besides, a band in the 940–1060 cm⁻¹ region, associated with ν(C-S) vibrations and a band in the 250–420 cm⁻¹ region associated with ν(Au-S) vibrations. The presence of a unique band in the region 940–1060 cm⁻¹ due to the –CSS moiety is commonly assumed to a symmetrically bonding of the dithiocarbamate ligand, which acts as a chelate ligand. A split band is observed in the new derivatives, which indicates an asymmetrically bidentate ligand or a monodentate ligand [64,65]. Examples of dithiocarbamate gold(I) derivatives have been previously described in the literature in which an asymmetrically bidentate mode of coordination of the ligand, due to short Au...S interactions, is confirmed by X-ray structure [66].

The stability of the new complexes was studied over 24 h at 37 °C by UV-vis absorption spectroscopy in PBS solution (pH = 7.4). Solutions suitable for spectrophotometric analysis were prepared by dilution of dimethylsulfoxide (DMSO) stock solutions of the complexes in PBS buffer. The spectra of the corresponding complexes (Figure S27) show an intense absorption

band at ca. 210 nm and one lower energy absorption band with low intensity around 260 nm, which could be assigned as $\pi \rightarrow \pi^*$ intraligand transitions. These bands remain without any changes in shape or displacement in the absorbance maximum (nonapparent red- or blue shift) in all the new derivatives, in addition lacking of absorbance at around 500 nm, due to gold nanoparticles formation, over 24 h, implying a substantial stability of the chromophore under physiological conditions.

IV.3.3.2. Biological studies

IV.3.3.2.1. Antiproliferative activity of gold complexes

The antiproliferative properties of these dithiocarbamate gold(I) complexes derived from sulfonamides were analyzed using human carcinoma cell line Caco-2. The cytotoxic effect of the gold complexes on these cells was evaluated by determining IC_{50} values (necessary concentration to reduce two-fold cell viability) (Table 1).

Table 1. IC_{50} values obtained after treatment for 72 h with dithiocarbamate gold(I) complexes derived from sulfonamides on Caco-2 cells. Distribution coefficients ($\log P_{7.4}$).

Complex	IC_{50} (μM)	$\log P_{7.4}$
[Au(S ₂ CNHSO ₂ C ₆ H ₅)(PPh ₃)] (1)	1.14 ± 0.25	0.75
[Au(S ₂ CNHSO ₂ -p-Me-C ₆ H ₄)(PPh ₃)] (2)	1.25 ± 0.35	0.71
[Au(S ₂ CNHSO ₂ -p-Cl-C ₆ H ₄)(PPh ₃)] (3)	1.70 ± 0.15	0.91
[Au(S ₂ CNHSO ₂ C ₆ H ₅)(TPPTS)] (4)	46.71 ± 5.61	-0.40
[Au(S ₂ CNHSO ₂ -p-Me-C ₆ H ₄)(TPPTS)] (5)	31.81 ± 6.05	-0.78
[Au(S ₂ CNHSO ₂ -p-Cl-C ₆ H ₄)(TPPTS)] (6)	33.68 ± 2.74	-0.83
[Au(S ₂ CNHSO ₂ C ₆ H ₅)(IMePropargyl)] (7)	33.27 ± 5.01	0.35
[Au(S ₂ CNHSO ₂ -p-Me-C ₆ H ₄)(IMePropargyl)] (8)	7.22 ± 0.38	-0.13
[Au(S ₂ CNHSO ₂ C ₆ H ₅)(IBnPropargyl)] (9)	8.56 ± 1.68	0.42
[Au(S ₂ CNHSO ₂ -p-Me-C ₆ H ₄)(IBnPropargyl)] (10)	13.15 ± 3.34	0.36

Among all the tested complexes, the combination of benzenesulfonamide moiety with triphenylphosphine ligand (Table 2) seems to be the most cytotoxic since it displayed the lowest IC_{50} values, with [Au(S₂CNHSO₂C₆H₅)(PPh₃)] (1) being the most toxic. Besides, these complexes display the highest lipophilic character with $\log P_{7.4}$ values close to 1 (Table 1). No significant differences in the IC_{50} values are observed between these three complexes, suggesting that the substitution on the benzene ring in the dithiocarbamate unit seems to be irrelevant.

Table 2. IC₅₀ values and the corresponding selectivity index obtained after treatment for 72 h with dithiocarbamate gold(I) complexes derived from sulfonamides on differentiated Caco-2 cells.

Complex	IC ₅₀ (μM)	Selectivity Index
[Au(S ₂ CNHSO ₂ C ₆ H ₅)(PPh ₃)] (1)	12.72 ± 0.47	11.2
[Au(S ₂ CNHSO ₂ -p-Cl-C ₆ H ₄)(PPh ₃)] (3)	14.28 ± 0.19	8.05
[Au(S ₂ CNHSO ₂ -p-Me-C ₆ H ₄)(IMePropargyl)] (8)	46.62 ± 3.26	6.46
[Au(S ₂ CNHSO ₂ C ₆ H ₅)(IBnPropargyl)] (9)	19.54 ± 2.64	2.28

On the other hand, the complexes with the water-soluble triphenylphosphine-trisulfonated (TPPTS) ligand, which in fact are the most hydrophilic derivatives (with log *p* values < 0), display much higher IC₅₀ values, ranging from 30 to 50 μM. (Table 2), complex **4** being the significantly least cytotoxic, with a IC₅₀ next to 50 μM and no significant differences between complexes **5** and **6**.

In the case of carbene benzenesulfonamide complexes, the presence of the benzyl substituent in the NHC ring (complex **9**) instead of methyl (complex **7**) improves their cytotoxicity (Table 1). However, the presence of the methyl group in both ligands, benzenesulfonamide and carbene (complex **8**), results in a more effective combination than using methyl and benzyl respectively (complex **10**). Curiously, [Au(S₂CNHSO₂C₆H₅)(IMePropargyl)] (**7**) is the least active derivative in the carbene dithiocarbamate family, despite the similarity in its structure (Table 1). In general, there is no linear correlation between IC₅₀ values and log P_{7.5}, nevertheless the most hydrophilic complexes, those with TPPTS are the least cytotoxic.

One of the problems with chemotherapeutic agents is the lack of selectivity for cancer cells compared to healthy ones, which can lead to side effects. For this reason, we have evaluated their toxicity in two models of healthy cells at their IC₅₀ values: human epithelial fibroblasts and differentiated Caco-2 cells with complexes **1**, **3**, **8** and **9** (Figure 1).

The results showed that only complex **9** was able to significantly decrease cell viability (approximately 39%) both in fibroblasts and in differentiated Caco-2 cells, which involves a *per se* effect. On the other hand, complexes **1**, **3** and **8** did not compromise the viability of healthy cells at their IC₅₀ concentration. Besides, the IC₅₀ of these compounds calculated in the differentiated Caco-2 cells, were significantly higher compared to undifferentiated cells (cancerous ones) (Table 2), which points to a specificity towards cancer cells (Table 1).

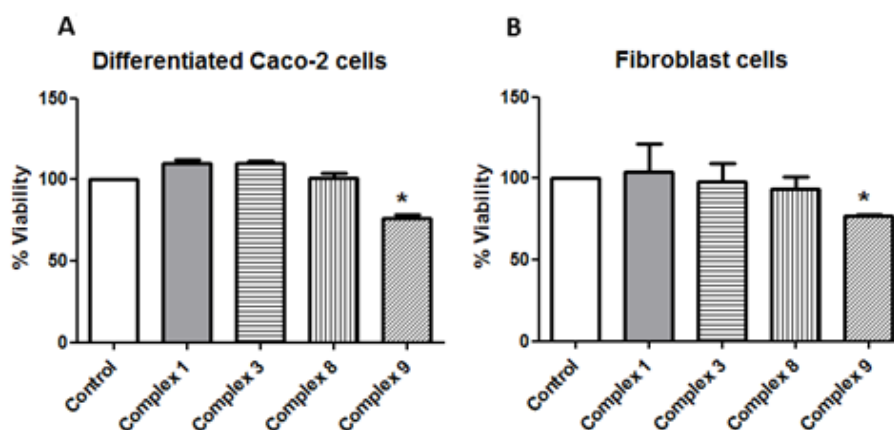


Figure 1. (A) Viability percentages obtained after treatment of differentiated Caco-2 cells with complexes **1** (1.14 μM), **3** (1.7 μM), **8** (7.22 μM) and **9** (8.56 μM) for 72 h. (B) Viability percentages obtained after treating epithelial fibroblasts with complexes **1** (1.14 μM), **3** (1.7 μM), **8** (7.22 μM) and **9** (8.56 μM). * $p < 0.05$ vs respective control.

We have also evaluated the toxicity of the compounds at shorter times (24 and 48 h). The results showed a time and concentration dependent curve (Figure 2). The corresponding IC_{50} values are depicted in Table 3. Thus, there were significant differences in the IC_{50} values obtained for complexes **1** and **3** after 24 h of incubation with respect to 48 and 72 h, which indicates that after 48 h of incubation the effect is time-independent. However, the cytotoxicity of complexes **8** and **9** increased dramatically after 72 h, involving a time-dependent effect. In fact, both complexes (**8** and **9**) displayed a band in the UV-vis spectra at ca. 250 nm (Figure S27) that disappeared over time, which could explain such increase in its cytotoxicity, due to a period of activation.

Table 3. IC_{50} values obtained after treating Caco-2 cells with complexes **1**, **3**, **8** and **9** at incubation times of 24, 48 and 72 h.

Complex	IC_{50} 24 h (μM)	IC_{50} 48 h (μM)	IC_{50} 72 h (μM)
[Au(S ₂ CNHSO ₂ C ₆ H ₅)(PPh ₃)] (1)	1.92 \pm 0.13	1.38 \pm 0.21	1.14 \pm 0.25
[Au(S ₂ CNHSO ₂ -p-Cl-C ₆ H ₄)(PPh ₃)] (3)	2.48 \pm 0.14	1.51 \pm 0.10	1.70 \pm 0.15
[Au(S ₂ CNHSO ₂ -p-Me-C ₆ H ₄)(IMePropargyl)] (8)	>50	37.41 \pm 7.48	7.22 \pm 0.38
[Au(S ₂ CNHSO ₂ C ₆ H ₅)(IBnPropargyl)] (9)	31.25 \pm 6.85	15.48 \pm 1.89	8.56 \pm 1.68

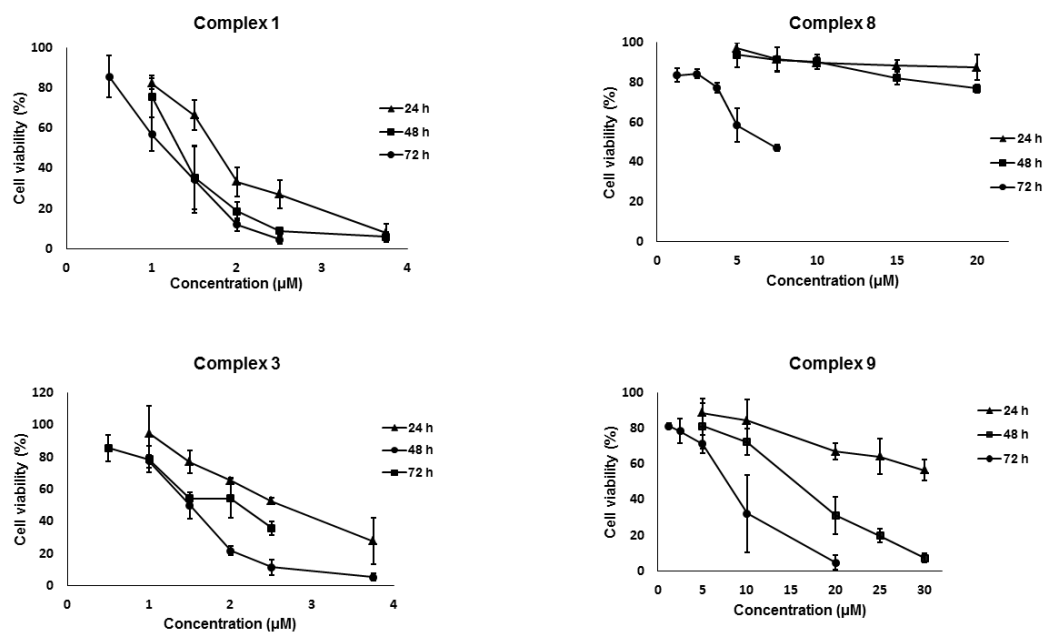


Figure 2. Dose-response curves of Caco-2 cell viability percentage of metal complexes at different concentrations and incubation times.

In order to get some insights about its mechanism of action in cancer cells, we have chosen the complexes $[\text{Au}(\text{S}_2\text{CNHSO}_2\text{C}_6\text{H}_5)(\text{PPh}_3)]$ (**1**) from PPh_3 family and $[\text{Au}(\text{S}_2\text{CNHSO}_2\text{-p-Me-C}_6\text{H}_4)(\text{IMePropargyl})]$ (**8**) from carbene family, which are the most active derivatives according to their selectivity indexes.

IV.3.3.2.2. Type of cell death produced by metal complexes

Since these new gold complexes produced a decrease in cell proliferation, we performed some assays to determine whether complexes **1** and **8** produced cell death by necrosis or apoptosis. Double staining with annexin V/PI showed that both gold complexes were able of inducing apoptosis in Caco-2 cells after 48 h (complex **1**) or 72 h (complex **8**) incubation, the former being more effective even at the shorter incubation time (Figure 3A).

Depolarization of the mitochondrial membrane (MMP) occurs in apoptosis, which induces a series of structural changes that ultimately lead to the release of cytochrome c. DilC1 [67] staining results showed that both complex **1** and **8** induced similar mitochondrial depolarization (Figure 3B). Mitochondrial depolarization and the release of cytochrome c finally leads to the activation of caspase-3, which is the executor of the apoptotic process. Flow cytometry determinations confirmed the previous results, since incubation with both derivatives increased the percentage of cells with active caspase-3 (Figure 3C). However, complex **1** proved to be more effective, suggesting that the presence of the triphenylphosphine could probably affect other apoptotic pathways besides the mitochondrial one. The presence of the AuPPh_3 moiety in **1**, probably favors its cellular uptake enhancing its effect, as has been previously observed in other complexes with the same unit [68,69].

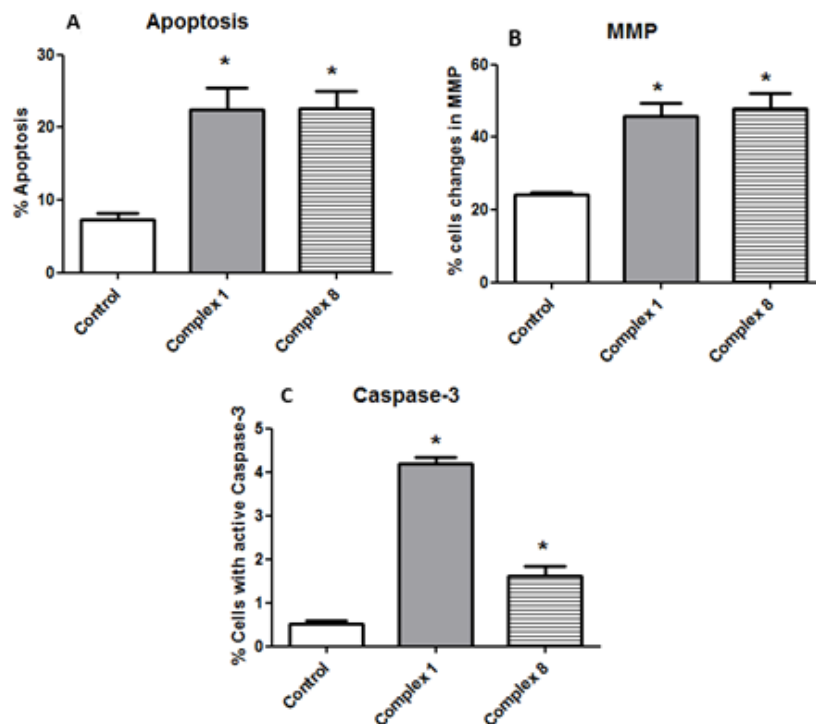


Figure 3. Caco-2 cell death studies by flow cytometry after incubation with complexes **1** (1.14 μM) and **8** (7.22 μM) for 48 and 72 h respectively. **(A)** Results of apoptotic state are expressed as percentage. **(B)** Percentage of Caco-2 cells with disturbed mitochondrial membrane potential (MMP). **(C)** Percentage of Caco-2 cells with presence of active caspase-3. * $p < 0.05$ compared to respective control.

IV.3.3.2.3. Effect of gold complex on cell cycle

Apoptosis processes are usually accompanied by alterations in the cell cycle and previous studies have suggested that gold complex treated cells may arrest the cell cycle in some of its phases [59,70-72]. Flow cytometry analysis showed that after 48h (complex **1**) or 72 h (complex **8**) incubation time, both derivatives significantly increased the number of cells arrested in G₁ phase with a slight decrease in S phase (Figure 4).

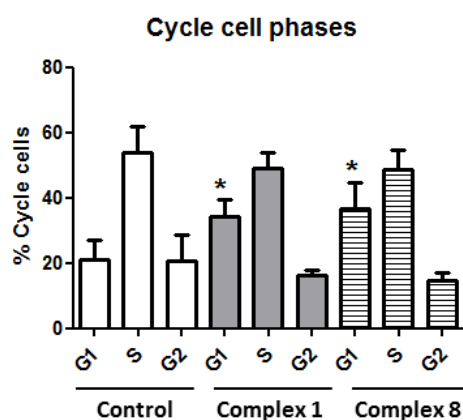


Figure 4. Percentage Caco-2 cycle cell phases studies by flow cytometry after incubation with complexes **1** (1.14 μM) and **8** (7.22 μM) for 48 and 72 h respectively. Distribution of cells along cell cycle phases. * $p < 0.05$ compared to control.

An important factor in cell cycle control is the p53 protein [73]. Thus, treatment of cancer cells with drugs can induce stress in them, which causes the activation of the p53 protein, which is one of the most important tumor suppressors [74,75]. Furthermore, p53 can induce apoptotic cell death in response to DNA damage [76]. Taking all this into consideration, the presence of p53 in the cells treated with complexes **1** and **8** was assayed and the results showed a significant increase in cells with active p53 compared to untreated cells. (Figure 5). Likewise, a greater effect of $[\text{Au}(\text{S}_2\text{CNHSO}_2\text{C}_6\text{H}_5)(\text{PPh}_3)]$ (**1**) was observed in accordance with the data obtained for caspase 3 (Figure 3C).

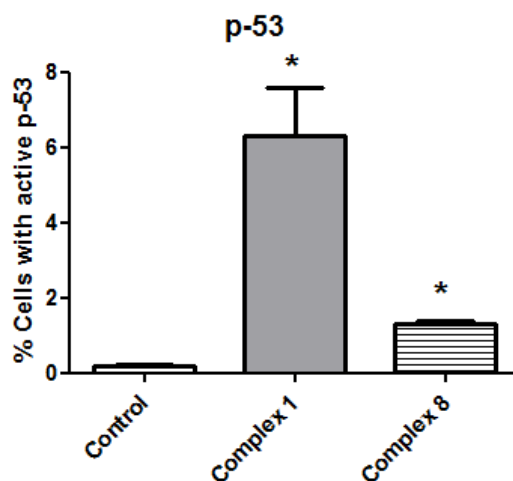


Figure 5. Percentage of Caco-2 cells with presence of active p53. Studies by flow cytometry after incubation with complexes **1** (1.14 μM) and **8** (7.22 μM) for 48 and 72 h respectively. * $p < 0.05$ compared to respective control.

IV.3.3.2.4. Thioredoxin reductase and carbonic anhydrase IX as potential targets

TrxR is an enzyme involved in redox balance. Therefore, its inhibition causes a pro-oxidant state that leads to cancer cells death. Gold complexes may inactivate this protein due to its intrinsic affinity towards the selenocysteine residues of the enzyme [77,78]. In order to determine whether our complexes have this protein as a putative target, in vitro studies were carried out by incubating the protein with complexes **1** and **8** at their IC_{50} values. The results indicate that both compounds were capable of interacting in vitro with this enzyme causing a significant decrease in its activity of around 80% (Figure 6A). The TrxR inhibitor, auranofin, was used as a reference.

Finally, the ability to inhibit CA IX activity was evaluated to confirm whether the new derivatives could behave as multi-target drugs. The fact that these dithiocarbamate gold(I) complexes are carrying benzenesulfonamide units suggests that the carbonic anhydrase enzyme could be an additional target, as has been previously observed in other compounds with benzenesulfonamide units [79,80]. We have chosen the CA IX isoform since it is more significantly expressed in tumor tissues. The results, shown in Figure 6B, indicate that complexes **1** and **8** produce a significant reduction in the esterase activity of CA at a concentration of 30

μM , the former being more effective than the latter (48 and 31% respectively). Furthermore, when indisulam, a specific inhibitor of this isoform, was used, its required concentration was twice ($60 \mu\text{M}$) than needed to achieve a similar effect corresponding to $[\text{Au}(\text{S}_2\text{CNHSO}_2\text{-p-Me-C}_6\text{H}_4)(\text{ImePropargyl})]$ (**8**). Thus, both compounds are capable of inhibiting the CA IX isoform at lower concentrations than the reference inhibitor, indisulam. The inhibition of this enzyme would impede the regulation of the Ph, causing the death of the cells due to the acidity of the medium and hypoxic conditions [81].

With these results we can conclude that both complexes could act as multi-target drugs by inhibiting the activity of both thioredoxine reductase and carbonic anhydrase IX enzymes.

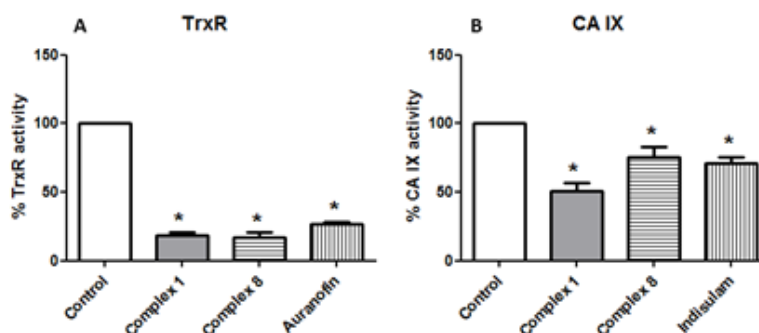


Figure 6. (A) Determination of the reductase activity of recombinant TrxR1 after in vitro incubation with complex **1** ($1.14 \mu\text{M}$) and complex **8** ($7.22 \mu\text{M}$) for 5 min. (B) Determination of the esterase activity of the enzyme carbonic anhydrase IX after 5 min of incubation with complex **1** and **8** ($30 \mu\text{M}$) and indisulam ($60 \mu\text{M}$). * $p < 0.05$ compared to respective control.

IV.3.3.2.5. Effect of gold(I) complexes on intracellular ROS

Another aspect to be considered in the search for new agents for cancer treatment is ROS levels alteration in tumor cells. Therefore, the use of drugs that induce the generation of these oxygen species is very useful, since cancer cells are much more susceptible to them [82,83]. As shown in Figures 7 and S28, these two metal complexes $[\text{Au}(\text{S}_2\text{CNHSO}_2\text{C}_6\text{H}_5)(\text{PPh}_3)]$ (**1**) and $[\text{Au}(\text{S}_2\text{CNHSO}_2\text{-p-Me-C}_6\text{H}_4)(\text{ImePropargyl})]$ (**8**) produced a time- and concentration-dependent pro-oxidant effect. This fact is in agreement with its inhibitory effect found on the TrxR1 protein (Figure 6A). In fact, many examples of gold complexes have previously shown their ability to increase ROS levels in cancerous cells besides inhibition of thioredoxine reductase activity [58,60,84-88].

However, we can not rule out the fact that these compounds activate p53 protein (Figure 5). The role of p53 as a central component of the stress response machinery is well established, and numerous forms of stress found during malignant transformation can lead to the activation of p53 [89]. This protein can influence the redox response, being antioxidant or prooxidant depending on the cell stress. At low levels of stress, p53 acts to promote an antioxidant response, while high levels lead to a prooxidant response [90].

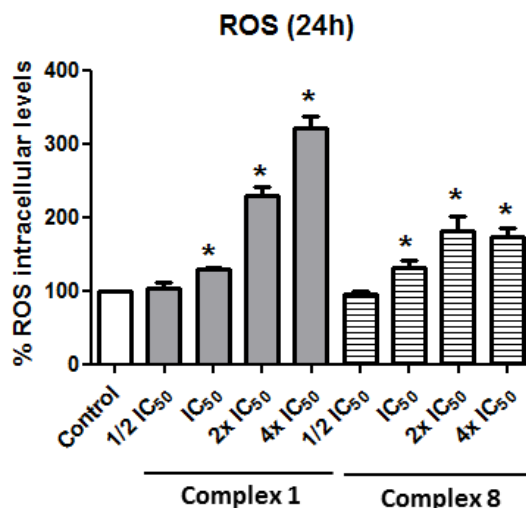
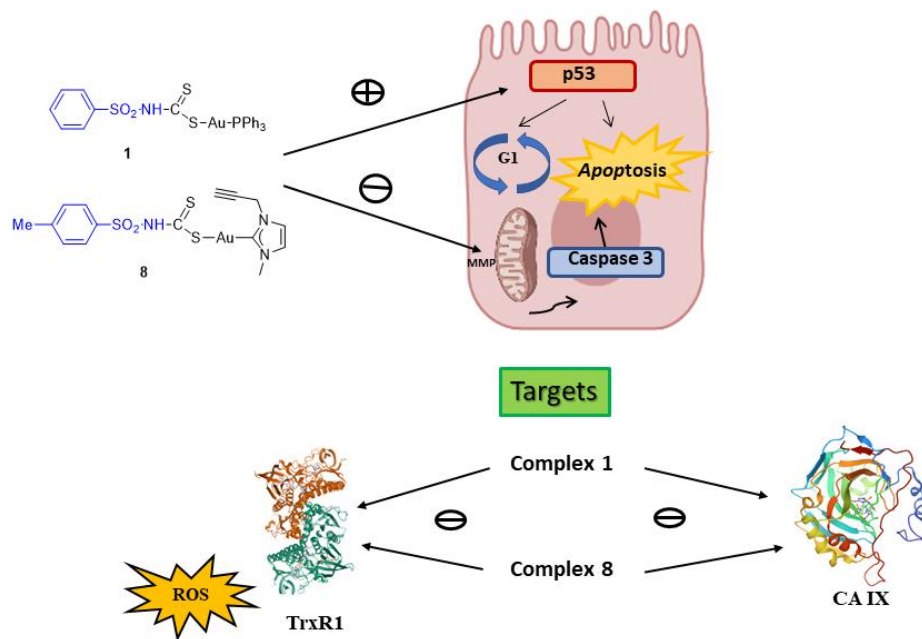


Figure 7. Measurement of intracellular levels of ROS after treatment of Caco-2 cells with complexes **1** and **8** at different concentrations for 24 h. * $p < 0.05$ compared to control.

IV.3.4. Conclusions

Ten new dithiocarbamate gold(I) complex derived from benzenesulfonamide with phosphines or carbenes as ancillary ligands have been isolated as stable products. They exert a cytotoxic effect on the Caco-2 line, which depends on the nature of the ligand, being the dithiocarbamate derivatives with PPh₃ the most effective. The low toxicity of the complexes with the water-soluble phosphine TPPTS stands out, probably due to their hydrophilic nature, which could hinder their uptake through the membrane. Complexes [Au(S₂CNHSO₂C₆H₅)(PPh₃)] (**1**) and [Au(S₂CNHSO₂-p-Me-C₆H₄)(IMePropargyl)] (**8**) trigger intrinsic apoptosis in Caco-2 cells by modifying the mitochondrial potential and activating caspase 3. Both complexes generate cellular stress that causes the activation of the p53 protein, prompting a cell cycle arrest in G1 phase. Inhibition of thioredoxin reductase causes a pro-oxidant effect without ruling out a possible pro-oxidant action of protein p53. Likewise, the activity of carbonic anhydrase (CA IX isoform) is compromised, which indicates that both complexes can be considered as multi-target drugs. Besides, [Au(S₂CNHSO₂C₆H₅)(PPh₃)] (**1**) display higher anticancer activity time-independent than the carbene counterpart ([Au(S₂CNHSO₂-p-Me-C₆H₄)(IMePropargyl)] (**8**)), which a period of activation.



Graphical Abstract

REFERENCES:

1. Kivelä, A.; Parkkila, S.; Saarnio, J.; Karttunen, T.J.; Kivelä, J.; Parkkila, A.K.; Waheed, A.; Sly, W.S.; Grubb, J.H.; Shah, G.; et al. Expression of a novel transmembrane carbonic anhydrase isozyme XII in normal human gut and colorectal tumors. *Am. J. Patol.* **2000**, *156*, 577-584, doi:10.1016/S0002-9440(10)64762-1.
2. McDonald, P.C.; Winum, J.-Y.; Supuran, C.T.; Dedhar, S. Recent Developments in Targeting Carbonic Anhydrase IX for Cancer Therapeutics. *Oncotarget* **2012**, *3*, 84-97.
3. Supuran, C.T.; Alterio, V.; Di Fiore, A.; D' Ambrosio, K.; Carta, F.; Monti, S.M.; De Simone, G. Inhibition of carbonic anhydrase IX targets primary tumors, metastases, and cancer stem cells: Three for the price of one. *Med. Res. Rev* **2018**, *38*, 1799-1836, doi:doi.org/10.1002/med.21497.
4. Mboge, M.Y.; Mahon, B.P.; McKenna, R.; Frost, S.C. Carbonic Anhydrases: Role in pH Control and Cancer. *Metabolites* **2018**, *8*, 19.
5. Gul, H.I.; Yamali, C.; Sakagami, H.; Angeli, A.; Leitans, J.; Kazaks, A.; Tars, K.; Ozgun, D.O.; Supuran, C.T. New anticancer drug candidates sulfonamides as selective hCA IX or hCA XII inhibitors. *Bioorg. Chem.* **2018**, *77*, 411-419, doi:10.1016/j.bioorg.2018.01.021.
6. Tülüce, Y.; Ahmed, B.A.; Koyuncu, İ.; Durgun, M. The cytotoxic, apoptotic and oxidative effects of carbonic anhydrase IX inhibitor on colorectal cancer cells. *Journal of bioenergetics and biomembranes* **2018**, *50*, 107-116, doi:10.1007/s10863-018-9749-9.
7. Aldera, A.P.; Govender, D. Carbonic anhydrase IX: a regulator of pH and participant in carcinogenesis. *J. Clin. Patol.* **2021**, *74*, 350-354, doi:10.1136/jclinpath-2020-207073.
8. Supuran, C.T. Carbonic anhydrase inhibition and the management of hypoxic tumors. *Metabolites* **2017**, *7*, doi:10.3390/metabo7030048.
9. Kumar, S.; Rulhania, S.; Jaswal, S.; Monga, V. Recent advances in the medicinal chemistry of carbonic anhydrase inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.* **2021**, *209*, 112923, doi:doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112923.
10. Kalinin, S.; Malkova, A.; Sharonova, T.; Sharoyko, V.; Bunev, A.; Supuran, C.T.; Krasavin, M. Carbonic Anhydrase IX Inhibitors as Candidates for Combination Therapy of Solid Tumors. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 13405.
11. Supuran, C.T. Multitargeting approaches involving carbonic anhydrase inhibitors: hybrid drugs against a variety of disorders. *J. Enzym. Inhib. Med. Chem.* **2021**, *36*, 1702-1714, doi:10.1080/14756366.2021.1945049.
12. Bibi, S.; Javed, T.; Alam, F.; Ali, A.; Ali, S.; Ullah, M.; Asad, H.B.; Hassham, M.; Hasan, F.; Muhammad, S. Therapeutic potential of carbonic anhydrase inhibitors. *Pak. J. Pharma. Sci.* **2019**, *32*.
13. Aspatwar, A.; Winum, J.-Y.; Carta, F.; Supuran, C.T.; Hammaren, M.; Parikka, M.; Parkkila, S. Carbonic Anhydrase Inhibitors as Novel Drugs against Mycobacterial β -Carbonic Anhydrases: An Update on In Vitro and In Vivo Studies. *Molecules* **2018**, *23*, 2911.
14. Bonardi, A.; Nocentini, A.; Bua, S.; Combs, J.; Lomelino, C.; Andring, J.; Lucarini, L.; Sgambellone, S.; Masini, E.; McKenna, R.; et al. Sulfonamide Inhibitors of Human Carbonic Anhydrases Designed through a Three-Tails Approach: Improving Ligand/Isoform Matching and Selectivity of Action. *J. Med. Chem.* **2020**, *63*, 7422-7444, doi:10.1021/acs.jmedchem.0c00733.
15. Meşeli, T.; Doğan, S.D.; Gündüz, M.G.; Kökbudak, Z.; Skaro Bogojevic, S.; Noonan, T.; Vojnovic, S.; Wolber, G.; Nikodinovic-Runic, J. Design, synthesis, antibacterial activity evaluation and molecular modeling studies of new sulfonamides containing a sulfathiazole moiety. *New J. Chem.* **2021**, *45*, 8166-8177, doi:10.1039/d1nj00150g.
16. Durgun, M.; Turkmen, H.; Zengin, G.; Zengin, H.; Koyunsever, M.; Koyuncu, I. Synthesis, characterization, in vitro cytotoxicity and antimicrobial investigation and evaluation of physicochemical properties of novel 4-(2-methylacetamide)benzenesulfonamide

- derivatives. *Bioorg. Chem.* **2017**, *70*, 163-172, doi:doi.org/10.1016/j.bioorg.2016.12.007.
17. Petkar, P.A.; Jagtap, J.R. A review on antimicrobial potential of sulfonamide scaffold. *Int. J. Pharma. Sci. Res.* **2021**, 2535-2547
 18. Lal, J.; Gupta, S.K.; Thavaselvam, D.; Agarwal, D.D. Biological activity, design, synthesis and structure activity relationship of some novel derivatives of curcumin containing sulfonamides. *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, *64*, 579-588, doi:doi.org/10.1016/j.ejmech.2013.03.012.
 19. Abbas, A.; Murtaza, S.; Tahir, M.N.; Shamim, S.; Sirajuddin, M.; Rana, U.A.; Naseem, K.; Rafique, H. Synthesis, antioxidant, enzyme inhibition and DNA binding studies of novel N-benzylated derivatives of sulfonamide. *J. Mol. Struct.* **2016**, *1117*, 269-275, doi:10.1016/j.molstruc.2016.03.066.
 20. Chandna, N.; Kumar, S.; Kaushik, P.; Kaushik, D.; Roy, S.K.; Gupta, G.K.; Jachak, S.M.; Kapoor, J.K.; Sharma, P.K. Synthesis of novel celecoxib analogues by bioisosteric replacement of sulfonamide as potent anti-inflammatory agents and cyclooxygenase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21*, 4581-4590, doi:doi.org/10.1016/j.bmc.2013.05.029.
 21. Wan, Y.; Fang, G.; Chen, H.; Deng, X.; Tang, Z. Sulfonamide derivatives as potential anti-cancer agents and their SARs elucidation. *Eur. J. Med. Chem.* **2021**, *226*, 113837, doi:doi.org/10.1016/j.ejmech.2021.113837.
 22. Wang, Y.; Pan, Z.; Cheng, X.-L.; Zhang, K.; Zhang, X.; Qin, Y.; Fan, J.; Yan, T.; Han, T.; Shiu, K.K.; et al. A red-light-activated sulfonamide porphycene for highly efficient photodynamic therapy against hypoxic tumor. *Eur. J. Med. Chem.* **2021**, *209*, 112867, doi:doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112867.
 23. Krymov, S.K.; Scherbakov, A.M.; Salnikova, D.I.; Sorokin, D.V.; Dezhenkova, L.G.; Ivanov, I.V.; Vullo, D.; De Luca, V.; Capasso, C.; Supuran, C.T.; et al. Synthesis, biological evaluation, and in silico studies of potential activators of apoptosis and carbonic anhydrase inhibitors on isatin-5-sulfonamide scaffold. *Eur. J. Med. Chem.* **2022**, *228*, 113997, doi:doi.org/10.1016/j.ejmech.2021.113997.
 24. Shinde, S.D.; Sakla, A.P.; Shankaraiah, N. An insight into medicinal attributes of dithiocarbamates: Bird's eye view. *Bioorg. Chem.* **2020**, *105*, 104346, doi:doi.org/10.1016/j.bioorg.2020.104346.
 25. Chaturvedi, D.; Zaidi, S. The role of Organic Dithiocarbamates in Drug Discovery Research. *Res. Rev. J. Chem.* **2016**, *5*, 10.
 26. Akinboye, E.S.; Bamji, Z.D.; Kwabi-Addo, B.; Ejeh, D.; Copeland, R.L.; Denmeade, S.R.; Bakare, O. Design, synthesis and cytotoxicity studies of dithiocarbamate ester derivatives of emetine in prostate cancer cell lines. *Bioorg. Med. Chem.* **2015**, *23*, 5839-5845, doi:doi.org/10.1016/j.bmc.2015.06.072.
 27. Fu, D.-J.; Zhang, S.-Y.; Liu, Y.-C.; Zhang, L.; Liu, J.-J.; Song, J.; Zhao, R.-H.; Li, F.; Sun, H.-H.; Liu, H.-M.; et al. Design, synthesis and antiproliferative activity studies of novel dithiocarbamate-chalcone derivatives. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2016**, *26*, 3918-3922, doi:doi.org/10.1016/j.bmcl.2016.07.012.
 28. Ding, P.-P.; Gao, M.; Mao, B.-B.; Cao, S.-L.; Liu, C.-H.; Yang, C.-R.; Li, Z.-F.; Liao, J.; Zhao, H.; Li, Z.; et al. Synthesis and biological evaluation of quinazolin-4(3H)-one derivatives bearing dithiocarbamate side chain at C2-position as potential antitumor agents. *Eur. J. Med. Chem.* **2016**, *108*, 364-373, doi:doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.11.044.
 29. Li, R.-D.; Wang, H.-L.; Li, Y.-B.; Wang, Z.-Q.; Wang, X.; Wang, Y.-T.; Ge, Z.-M.; Li, R.-T. Discovery and optimization of novel dual dithiocarbamates as potent anticancer agents. *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, *93*, 381-391, doi:doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.02.030.
 30. Xie, R.; Li, Y.; Tang, P.; Yuan, Q. Design, synthesis and biological evaluation of novel 2-aminobenzamides containing dithiocarbamate moiety as histone deacetylase inhibitors

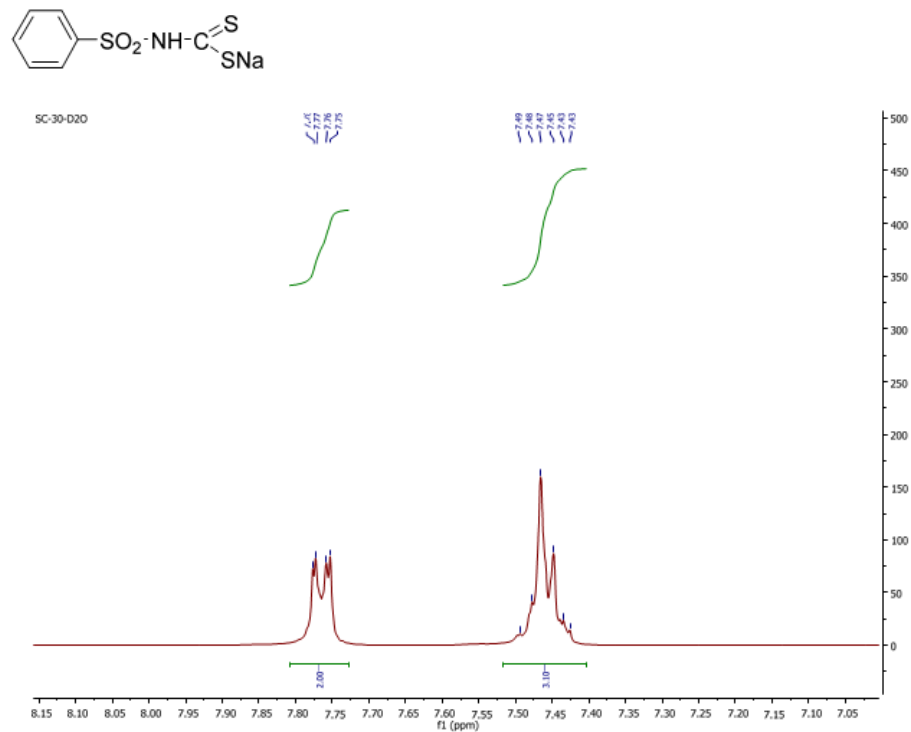
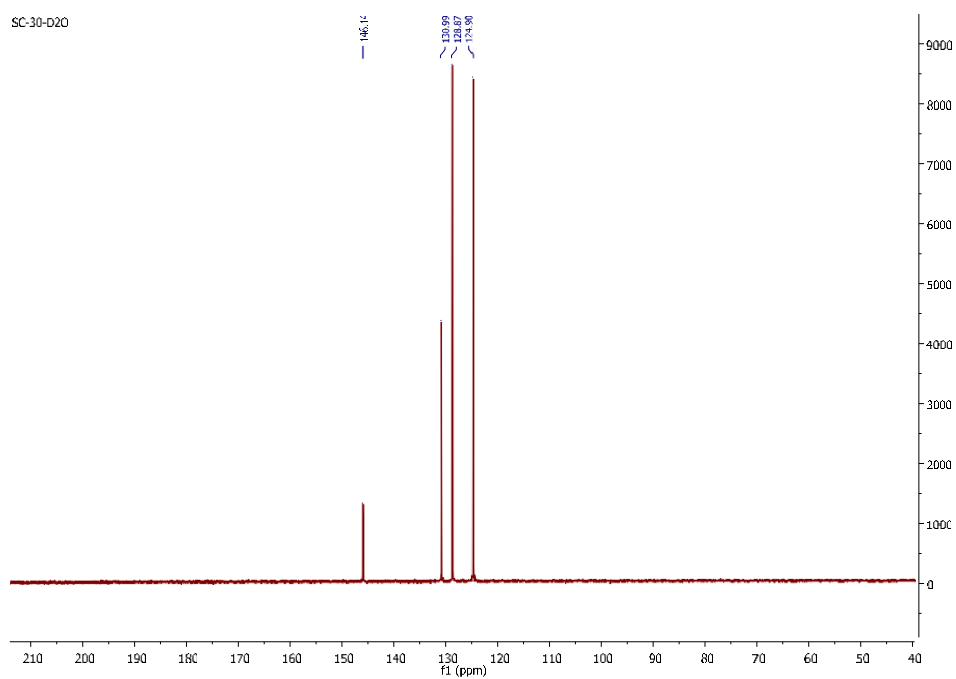
- and potent antitumor agents. *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, *143*, 320-333, doi:doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.08.041.
31. Wang, M.-M.; Chu, W.-C.; Yang, Y.; Yang, Q.-Q.; Qin, S.-S.; Zhang, E. Dithiocarbamates: Efficient metallo- β -lactamase inhibitors with good antibacterial activity when combined with meropenem. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2018**, *28*, 3436-3440, doi:doi.org/10.1016/j.bmcl.2018.09.028.
 32. Ge, Y.; Xu, L.-W.; Liu, Y.; Sun, L.-Y.; Gao, H.; Li, J.-Q.; Yang, K. Dithiocarbamate as a Valuable Scaffold for the Inhibition of Metallo- β -Lactamases. *Biomolecules* **2019**, *9*, 699.
 33. Aspatwar, A.; Hammarén, M.; Koskinen, S.; Luukinen, B.; Barker, H.; Carta, F.; Supuran, C.T.; Parikka, M.; Parkkila, S. β -CA-specific inhibitor dithiocarbamate Fc14-584B: a novel antimycobacterial agent with potential to treat drug-resistant tuberculosis. *J. Enzym. Inhib. Med. Chem.* **2017**, *32*, 832-840, doi:10.1080/14756366.2017.1332056.
 34. Chauhan, K.; Sharma, M.; Singh, P.; Kumar, V.; Shukla, P.K.; Siddiqi, M.I.; Chauhan, P.M.S. Discovery of a new class of dithiocarbamates and rhodanine scaffolds as potent antifungal agents: synthesis, biology and molecular docking. *Med. Chem. Commun.* **2012**, *3*, 1104-1110, doi:10.1039/C2MD20109G.
 35. Song, Z.; Zhou, Y.; Zhang, W.; Zhan, L.; Yu, Y.; Chen, Y.; Jia, W.; Liu, Z.; Qian, J.; Zhang, Y.; et al. Base promoted synthesis of novel indole-dithiocarbamate compounds as potential anti-inflammatory therapeutic agents for treatment of acute lung injury. *Eur. J. Med. Chem.* **2019**, *171*, 54-65, doi:doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.03.022.
 36. Jiang, N.; Huang, Q.; Liu, J.; Liang, N.; Li, Q.; Li, Q.; Xie, S.-S. Design, synthesis and biological evaluation of new coumarin-dithiocarbamate hybrids as multifunctional agents for the treatment of Alzheimer's disease. *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, *146*, 287-298, doi:doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.01.055.
 37. Fu, J.; Bao, F.; Gu, M.; Liu, J.; Zhang, Z.; Ding, J.; Xie, S.-S.; Ding, J. Design, synthesis and evaluation of quinolinone derivatives containing dithiocarbamate moiety as multifunctional AChE inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease. *J. Enzym. Inhib. Med. Chem.* **2020**, *35*, 118-128, doi:10.1080/14756366.2019.1687460.
 38. Adokoh, C.K. Therapeutic potential of dithiocarbamate supported gold compounds. *RSC Advances* **2020**, *10*, 2975-2988, doi:10.1039/c9ra09682e.
 39. Hogarth, G. Metal-dithiocarbamate complexes: chemistry and biological activity. *Mini-Rev. Med. Chem.* **2012**, *12*, 1202-1215, doi:10.2174/138955712802762095.
 40. Nardon, C.; Fregona, D. Gold(III) Complexes in the Oncological Preclinical Arena: From Aminoderivatives to Peptidomimetics. *Curr. Top. Med. Chem.* **2016**, *16*, 360-380, doi:10.2174/1568026615666150827094500.
 41. Saggiaro, D.; Rigobello, M.P.; Paloschi, L.; Folda, A.; Moggach, S.A.; Parsons, S.; Ronconi, L.; Fregona, D.; Bindoli, A. Gold(III)-dithiocarbamate complexes induce cancer cell death triggered by thioredoxin redox system inhibition and activation of ERK pathway. *Chemistry & biology* **2007**, *14*, 1128-1139, doi:10.1016/j.chembiol.2007.08.016.
 42. Ronconi, L.; Giovagnini, L.; Marzano, C.; Bettio, F.; Graziani, R.; Pilloni, G.; Fregona, D. Gold dithiocarbamate derivatives as potential antineoplastic agents: Design, spectroscopic properties, and in vitro antitumor activity. *Inorg Chem* **2005**, *44*, 1867-1881.
 43. Ronconi, L.; Aldinucci, D.; Dou, Q.P.; Fregona, D. Latest Insights into the Anticancer Activity of Gold(III)-Dithiocarbamate Complexes. *Anti-Cancer Agents Med. Chem.* **2010**, *10*, 283-292.
 44. Kouodom, M.N.; Ronconi, L.; Celegato, M.; Nardon, C.; Marchio, L.; Dou, Q.P.; Aldinucci, D.; Formaggio, F.; Fregona, D. Toward the Selective Delivery of Chemotherapeutics into Tumor Cells by Targeting Peptide Transporters: Tailored Gold-Based Anticancer Peptidomimetics. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 2212-2226.
 45. Milacic, V.; Chen, D.; Ronconi, L.; Landis-Piwowar, K.R.; Fregona, D.; Dou, Q.P. A novel anticancer gold(III) dithiocarbamate compound inhibits the activity of a purified 20S

- proteasome and 26S proteasome in human breast cancer cell cultures and xenografts. *Cancer Res.* **2006**, *66*, 10478-10486, doi:10.1158/0008-5472.can-06-3017.
46. Cattaruzza, L.; Fregona, D.; Mongiat, M.; Ronconi, L.; Fassina, A.; Colombatti, A.; Aldinucci, D. Antitumor activity of gold(III)-dithiocarbamate derivatives on prostate cancer cells and xenografts. *Int. J. Cancer* **2011**, *128*, 206-215.
 47. Celegato, M.; Fregona, D.; Mongiat, M.; Ronconi, L.; Borghese, C.; Canzonieri, V.; Casagrande, N.; Nardon, C.; Colombatti, A.; Aldinucci, D. Preclinical activity of multiple-target gold(III)-dithiocarbamate peptidomimetics in prostate cancer cells and xenografts. *Future Med. Chem.* **2014**, *6*, 1249-1263, doi:10.4155/fmc.14.81.
 48. Zhang, X.; Frezza, M.; Milacic, V.; Ronconi, L.; Fan, Y.H.; Bi, C.F.; 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*, 162.
 49. Bozdog, M.; Carta, F.; Vullo, D.; Isik, S.; AlOthman, Z.; Osman, S.M.; Scozzafava, A.; Supuran, C.T. Dithiocarbamates with potent inhibitory activity against the *Saccharomyces cerevisiae* β -carbonic anhydrase. *J. Enzym. Inhib. Med. Chem.* **2016**, *31*, 132-136, doi:10.3109/14756366.2015.1010529.
 50. Bozdog, M.; Carta, F.; Vullo, D.; Akdemir, A.; Isik, S.; Lanzi, C.; Scozzafava, A.; Masini, E.; Supuran, C.T. Synthesis of a new series of dithiocarbamates with effective human carbonic anhydrase inhibitory activity and antiglaucoma action. *Bioorg. Med. Chem.* **2015**, *23*, 2368-2376, doi:doi.org/10.1016/j.bmc.2015.03.068.
 51. Carta, F.; Aggarwal, M.; Maresca, A.; Scozzafava, A.; McKenna, R.; Supuran, C.T. Dithiocarbamates: a new class of carbonic anhydrase inhibitors. Crystallographic and kinetic investigations. *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 1868-1870, doi:10.1039/C2CC16395K.
 52. Altıntop, M.D.; Sever, B.; Akalın Çiftçi, G.; Kucukoglu, K.; Özdemir, A.; Soleimani, S.S.; Nadaroglu, H.; Kaplancıklı, Z.A. Synthesis and evaluation of new benzodioxole-based dithiocarbamate derivatives as potential anticancer agents and hCA-I and hCA-II inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.* **2017**, *125*, 190-196, doi:doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.09.035.
 53. Carta, F.; Aggarwal, M.; Maresca, A.; Scozzafava, A.; McKenna, R.; Masini, E.; Supuran, C.T. Dithiocarbamates Strongly Inhibit Carbonic Anhydrases and Show Antiglaucoma Action in Vivo. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 1721-1730, doi:10.1021/jm300031j.
 54. Sağlık, B.N.; Osmaniye, D.; Çevik, U.A.; Levent, S.; Çavuşoğlu, B.K.; Büyükemir, O.; Nezir, D.; Karaduman, A.B.; Özkay, Y.; Koparal, A.S.; et al. Synthesis, characterization and carbonic anhydrase I and II inhibitory evaluation of new sulfonamide derivatives bearing dithiocarbamate. *Eur. J. Med. Chem.* **2020**, *198*, 112392, doi:doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112392.
 55. Liu, J.; Liu, C.; Zhang, X.; Yu, L.; Gong, X.; Wang, P. Anticancer sulfonamide hybrids that inhibit bladder cancer cells growth and migration as tubulin polymerisation inhibitors. *J. Enzym. Inhib. Med. Chem.* **2019**, *34*, 1380-1387, doi:10.1080/14756366.2019.1639696.
 56. Sanz, S.; Jones, L.A.; Mohr, F.; Laguna, M. Homogenous Catalysis with Gold: Efficient Hydration of Phenylacetylene in Aqueous Media. *Organometallics* **2007**, *26*, 952-957, doi:10.1021/om060821y.
 57. Johnson, A.; Gimeno, M.C. Synthesis of Propargyl-Functionalized NHC Gold Complexes. *Organometallics* **2017**, *36*, 1278-1286, doi:10.1021/acs.organomet.7b00012.
 58. Atrian-Blasco, E.; Gascon, S.; Rodriguez-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*, 8562-8579, doi:10.1021/acs.inorgchem.7b01370.
 59. Quero, J.; Ruighi, F.; Osada, J.; Gimeno, M.C.; Cerrada, E.; Rodriguez-Yoldi, M.J. Gold(I) Complexes Bearing Alkylated 1,3,5-Triaza-7-phosphadamantane Ligands as Thermoresponsive Anticancer Agents in Human Colon Cells. *Biomedicines* **2021**, *9*, 1848-1866, doi:10.3390/biomedicines9121848.

60. Marmol, I.; Virumbrales-Munoz, M.; Quero, J.; Sanchez-De-Diego, C.; Fernandez, 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, doi:10.1016/j.jinorgbio.2017.08.020.
61. Sanchez-de-Diego, C.; Marmol, I.; Perez, R.; Gascon, S.; Rodriguez-Yoldi, M.J.; Cerrada, E. The anticancer effect related to disturbances in redox balance on Caco-2 cells caused by an alkynyl gold(I) complex. *J. Inorg. Biochem.* **2017**, *166*, 108-121, doi:10.1016/j.jinorgbio.2016.11.009.
62. Ruiz-Leal, M.; George, S. An in vitro procedure for evaluation of early stage oxidative stress in an established fish cell line applied to investigation of PHAH and pesticide toxicity. *Mar Environ Res* **2004**, *58*, 631-635, doi:10.1016/j.marenvres.2004.03.054.
63. Brown, D.A.; Glass, W.K.; Burke, M.A. General use of ir spectral criteria in discussions of bonding and structure of metal dithiocarbamates. *Spectrochim. Acta* **1976**, *32*, 137-143, doi:10.1016/0584-8539(76)80059-1.
64. Kellner, R.; Stnikolov, G.; Trendafilova, N. Detecting the bonding type of dithiocarbamate ligands in their complexes as inferred from the asymmetric cs mode. *Inorg. Chim. Acta* **1984**, *84*, 233-239, doi:10.1016/s0020-1693(00)82413-5.
65. Giovagnini, L.; Ronconi, L.; Aldinucci, D.; Lorenzon, D.; Sitran, S.; Fregona, D. Synthesis, characterization, and comparative in vitro cytotoxicity studies of platinum(II), palladium(II), and gold(III) methylsarcosinedithiocarbamate complexes. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 1588-1595.
66. Vergara, E.; Miranda, S.; Mohr, F.; Cerrada, E.; Tiekink, E.R.T.; Romero, P.; Mendia, A.; Laguna, M. Gold(I) and Palladium(II) thiolato complexes containing water-soluble phosphane ligands. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2007**, 2926-2933, doi:10.1002/ejic.200700112.
67. Erxleben, A. Mitochondria-Targeting Anticancer Metal Complexes. *Curr. Med. Chem.* **2019**, *26*, 694-728, doi:10.2174/0929867325666180307112029.
68. Stenger-Smith, J.R.; Mascharak, P.K. Gold Drugs with {Au(PPh₃)₃}⁺ Moiety: Advantages and Medicinal Applications. *ChemMedChem* **2020**, *15*, 2136-2145, doi:10.1002/cmdc.202000608.
69. Rubbiani, R.; Salassa, L.; de Almeida, A.; Casini, A.; Ott, I. Cytotoxic Gold(I) N-heterocyclic Carbene Complexes with Phosphane Ligands as Potent Enzyme Inhibitors. *ChemMedChem* **2014**, *9*, 1205-1210, doi:<https://doi.org/10.1002/cmdc.201400056>.
70. Abás, E.; Bellés, A.; Rodríguez-Diéguez, A.; Laguna, M.; Grasa, L. Selective cytotoxicity of cyclometalated gold(III) complexes on Caco-2 cells is mediated by G2/M cell cycle arrest. *Metallomics : integrated biometal science* **2021**, *13*.
71. Marmol, I.; Castellnou, P.; Alvarez, R.; Gimeno, M.C.; Rodriguez-Yoldi, M.J.; Cerrada, E. Alkynyl Gold(I) complexes derived from 3-hydroxyflavones as multi-targeted drugs against colon cancer. *Eur. J. Med. Chem.* **2019**, *183*, doi:10.1016/j.ejmech.2019.111661.
72. Tu, S.P.; Sun, R.W.Y.; Lin, M.C.M.; Cui, J.T.; Zou, B.; Gu, Q.; Kung, H.F.; Che, C.M.; Wong, B.C.Y. Gold (III) Porphyrin Complexes Induce Apoptosis and Cell Cycle Arrest and Inhibit Tumor Growth in Colon Cancer. *Cancer-Am Cancer Soc* **2009**, *115*, 4459-4469, doi:10.1002/cncr.24514.
73. Barnum, K.J.; O'Connell, M.J. Cell Cycle Regulation by Checkpoints. In *Cell Cycle Control: Mechanisms and Protocols, 2nd Edition*, Noguchi, E., Gadaleta, M.C., Eds.; Methods in Molecular Biology; 2014; Volume 1170, pp. 29-40.
74. Mirgayazova, R.; Khadiullina, R.; Mingaleeva, R.; Chasov, V.; Gomzikova, M.; Garanina, E.; Rizvanov, A.; Bulatov, E. Novel Isatin-based activator of p53 transcriptional functions in tumor cells. *Mol. Biol. Res. Commun.* **2019**, *8*, 119-128, doi:10.22099/mbr.2019.34179.1419.
75. Chen, J.D. The Cell-Cycle Arrest and Apoptotic Functions of p53 in Tumor Initiation and Progression. *CSH Perspect Med.* **2016**, *6*, doi:10.1101/cshperspect.a026104.

76. Carvajal, L.A.; Manfredi, J.J. Another fork in the road-life or death decisions by the tumour suppressor p53. *Embo Reports* **2013**, *14*, 414-421, doi:10.1038/embor.2013.25.
77. Zhang J; Zhang B; Li X; Han X; Liu R; J., F. Small molecule inhibitors of mammalian thioredoxin reductase as potential anticancer agents: An update. . *Med Res Rev.* **2019**, *39*, 5-39.
78. Bindoli, A.; Rigobello, M.P.; Scutari, G.; Gabbiani, C.; Casini, A.; Messori, L. Thioredoxin reductase: A target for gold compounds acting as potential anticancer drugs. *Coord. Chem. Rev.* **2009**, *253*, 1692-1707.
79. Liu, L.; Wang, W.Q.; Huang, J.; Zhao, Z.J.; Li, H.L.; Xu, Y.F. Novel benzoyl thioureido benzene sulfonamides as highly potent and selective inhibitors of carbonic anhydrase IX: optimization and bioactive studies. *MedChemComm* **2018**, *9*, 2100-2105, doi:10.1039/c8md00392k.
80. Vullo, D.; Franchi, M.; Gallori, E.; Pastorek, J.; Scozzafava, A.; Pastorekova, S.; Supuran, C.T. Carbonic anhydrase inhibitors: Inhibition of the tumor-associated isozyme IX with aromatic and heterocyclic sulfonamides. *Bioor. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 1005-1009, doi:10.1016/s0960-894x(03)00091-x.
81. Carta, F.; Supuran, C.T.; Scozzafava, A. Sulfonamides and their isosters as carbonic anhydrase inhibitors. *Future Med. Chem.* **2014**, *6*, 1149-1165, doi:10.4155/fmc.14.68.
82. Gorrini, C.; Harris, I.S.; Mak, T.W. Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy. *Nat. Rev. Drug. Discov.* **2013**, *12*, 931-947, doi:10.1038/nrd4002.
83. Yang, H.T.; Villani, R.M.; Wang, H.L.; Simpson, M.J.; Roberts, M.S.; Tang, M.; Liang, X.W. The role of cellular reactive oxygen species in cancer chemotherapy. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **2018**, *37*, doi:10.1186/s13046-018-0909-x.
84. Marmol, I.; Montanel-Perez, S.; Royo, J.C.; Gimeno, M.C.; Villacampa, M.D.; Rodriguez-Yoldi, M.J.; Cerrada, E. Gold(I) and Silver(I) Complexes with 2-Anilinopyridine-Based Heterocycles as Multitarget Drugs against Colon Cancer. *Inorg Chem* **2020**, *59*, 17732-17745, doi:10.1021/acs.inorgchem.0c02922.
85. 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*, 96-102.
86. Bian, M.L.; Sun, Y.; Liu, Y.H.; Xu, Z.R.; Fan, R.; Liu, Z.W.; Liu, W.K. A Gold(I) Complex Containing an Oleanolic Acid Derivative as a Potential Anti-Ovarian-Cancer Agent by Inhibiting TrxR and Activating ROS-Mediated ERS. *Chem. Eur. J.* **2020**, *26*, 7092-7108, doi:10.1002/chem.202000045.
87. McCall, R.; Miles, M.; Lascuna, P.; Burney, B.; Patel, Z.; Sidoran, K.J.; Sittaramane, V.; Kocerha, J.; Grossie, D.A.; Sessler, J.L.; et al. Dual targeting of the cancer antioxidant network with 1,4-naphthoquinone fused Gold(I) N-heterocyclic carbene complexes. *Chem. Sci.* **2017**, *8*, 5918-5929, doi:10.1039/c7sc02153d.
88. Reddy, T.S.; Priver, S.H.; Mirzadeh, N.; Bhargava, S.K. Synthesis of gold(I) phosphine complexes containing the 2-BrC6F4PPh2 ligand: Evaluation of anticancer activity in 2D and 3D spheroidal models of HeLa cancer cells. *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, *145*, 291-301, doi:10.1016/j.ejmech.2017.12.048.
89. Vousden, K.H.; Ryan, K.M. p53 and metabolism. *Nat. Rev. Cancer* **2009**, *9*, 691-700, doi:10.1038/nrc2715.
90. Gorrini, C.; Harris, I.S.; Mak, T.W. Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2013**, *12*, 931-947, doi:10.1038/nrd4002.

SUPPORTING INFORMATION:

Figure S1. ^1H NMR spectrum of compound **L1** in D_2O .Figure S2. $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR spectrum of compound **L1** in D_2O .

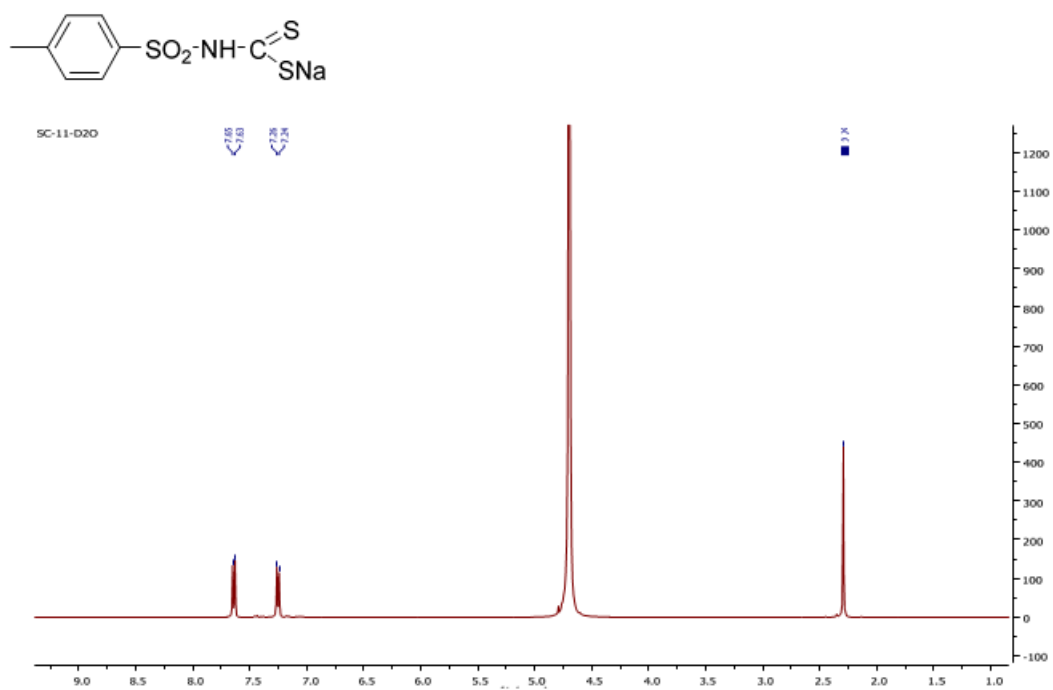


Figure S3. ^1H NMR spectrum of compound L2 in D_2O .

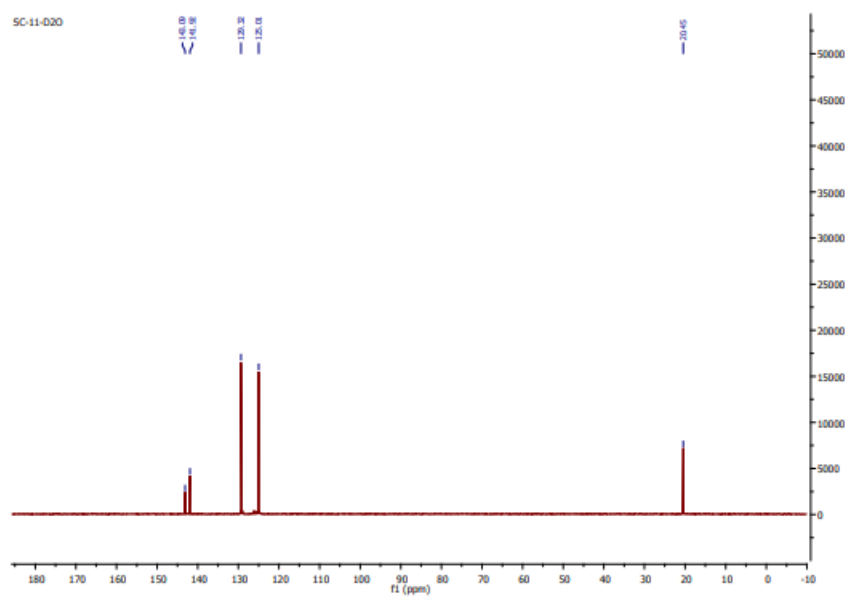


Figure S4. $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR spectrum of compound L2 in D_2O .

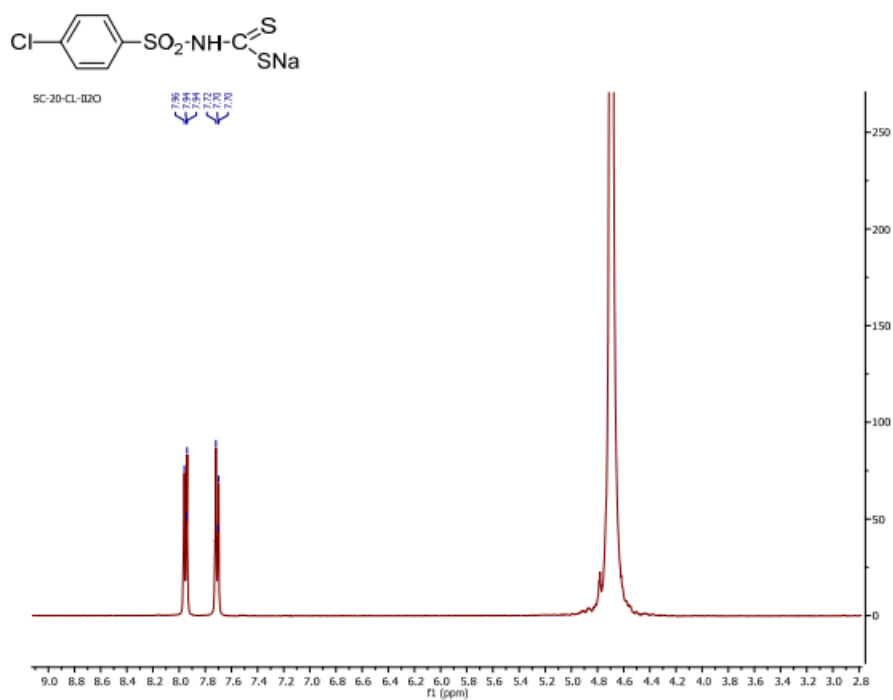


Figure S5. ¹H NMR spectrum of compound **L3** in dms0-d6.

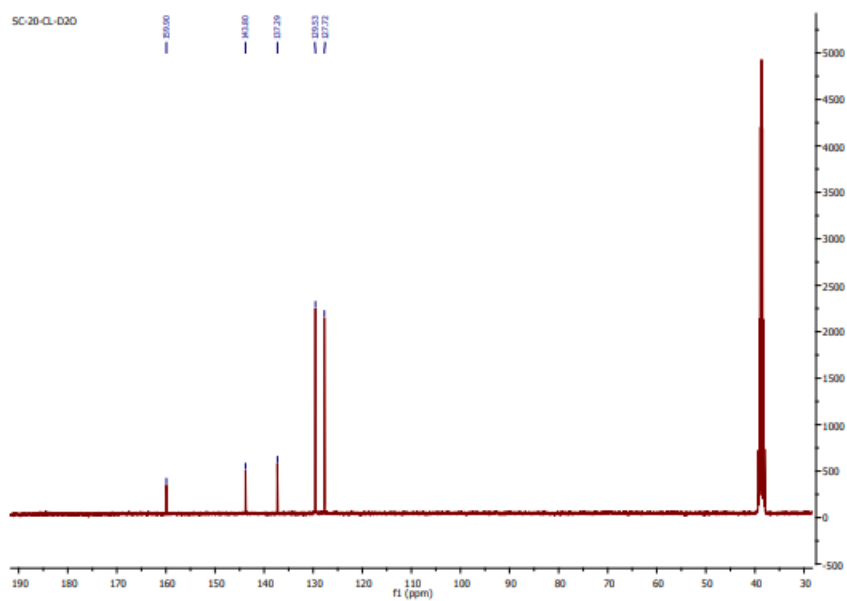


Figure S6. ¹³C{¹H} NMR spectrum of compound **L3** in dms0-d6.

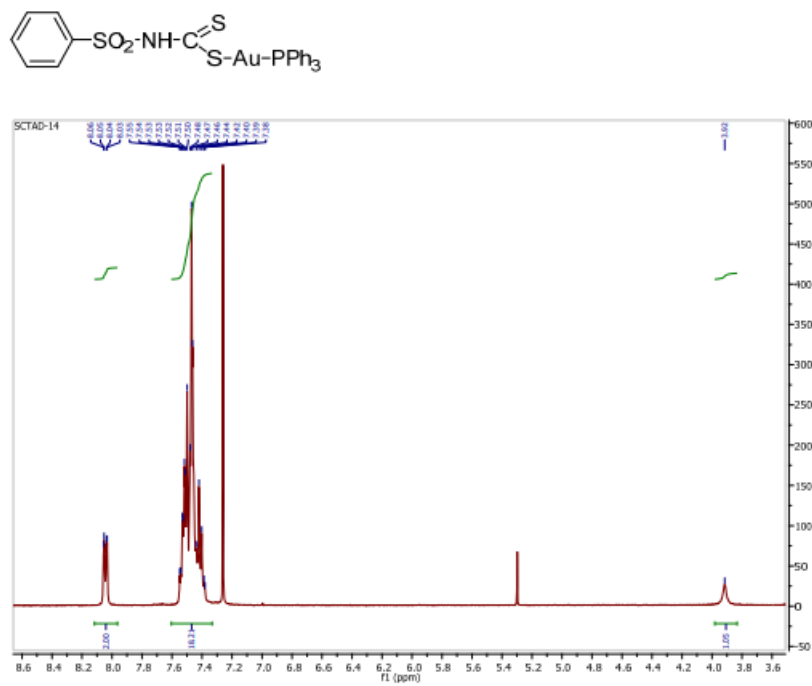


Figure S7. ¹H NMR spectrum of compound 1 in CDCl₃.

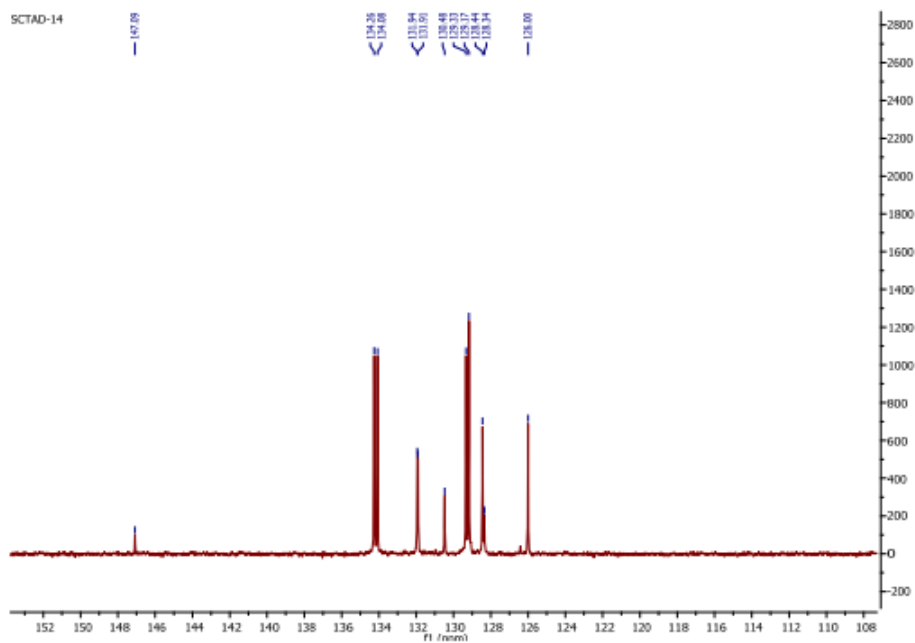


Figure S8. ¹³C{¹H} NMR spectrum of compound 1 in CDCl₃.

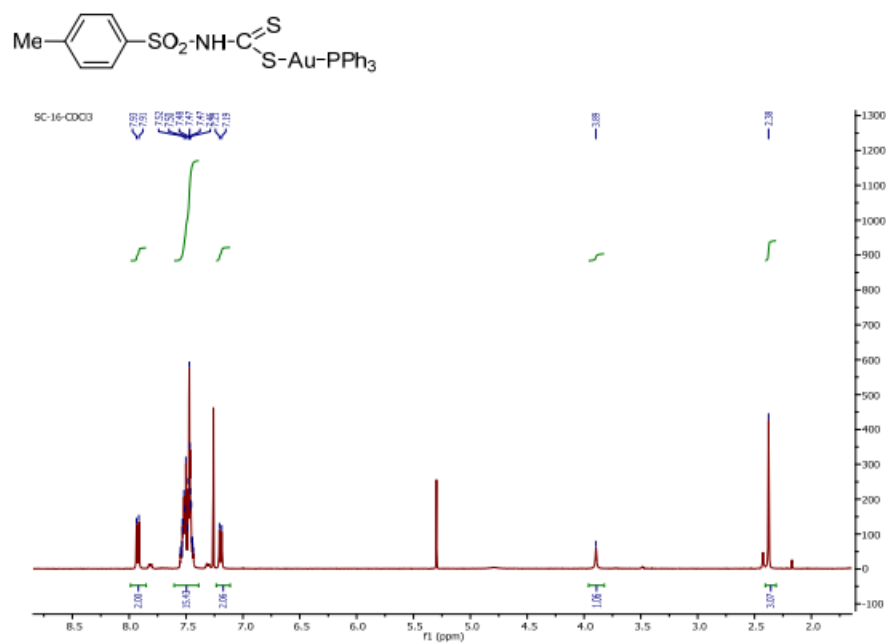


Figure S9. ¹H NMR spectrum of compound 2 in CDCl₃.

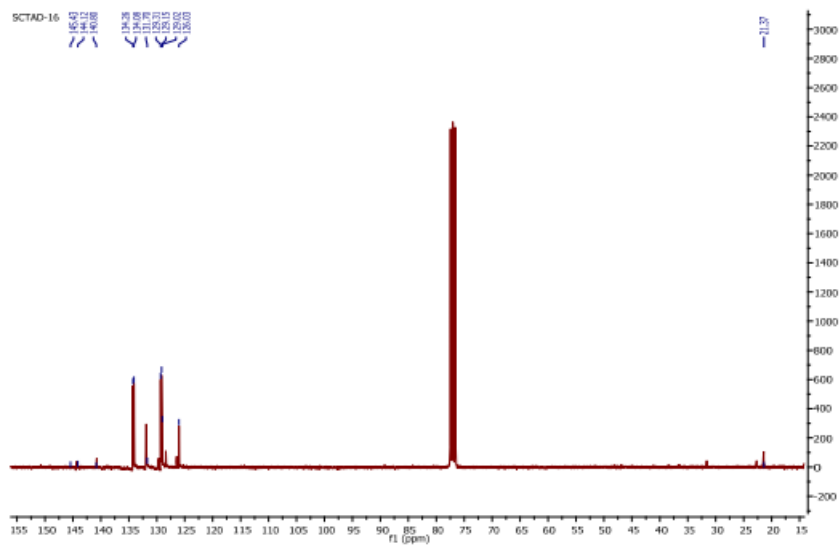


Figure S10. ¹³C{¹H} NMR spectrum of compound 2 in CDCl₃.

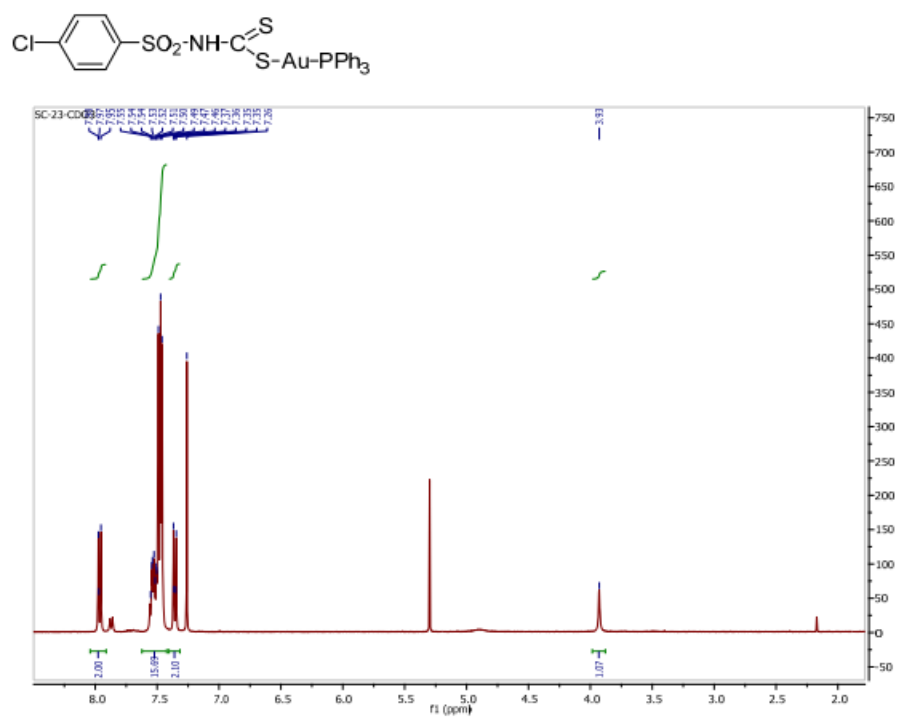


Figure S11. ¹H NMR spectrum of compound **3** in CDCl₃.

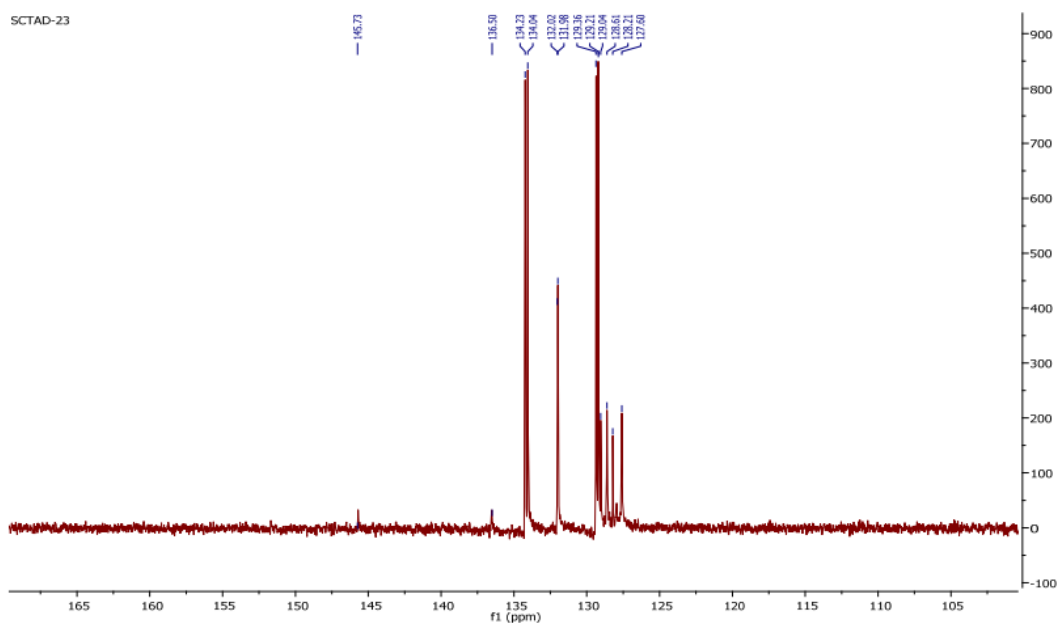


Figure S12. ¹³C{¹H} NMR spectrum of compound **3** in CDCl₃.

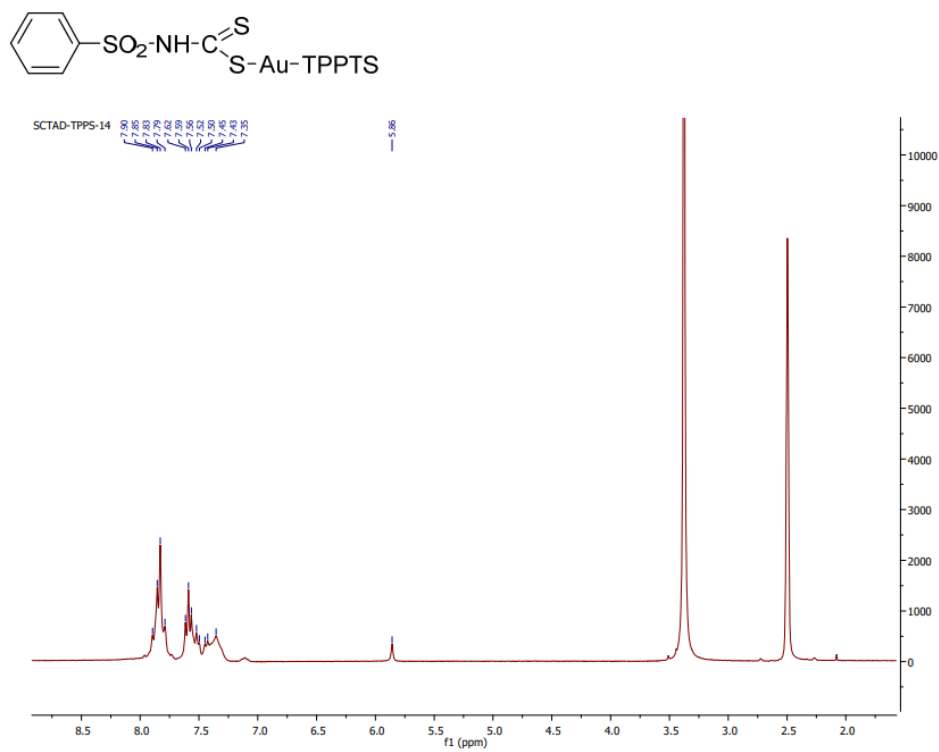


Figure S13. ^1H NMR spectrum of compound **4** in dms0-d_6 .

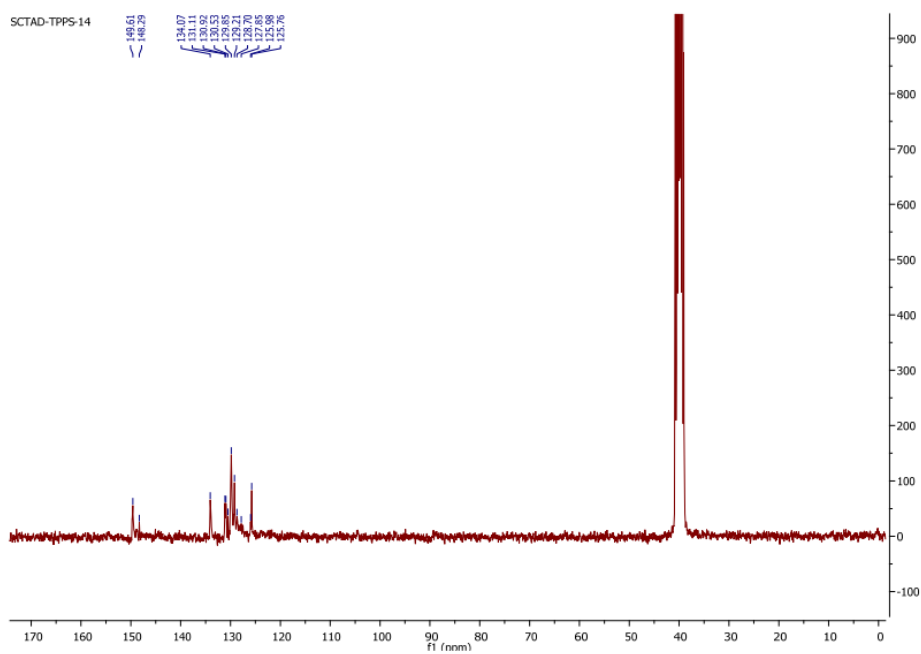
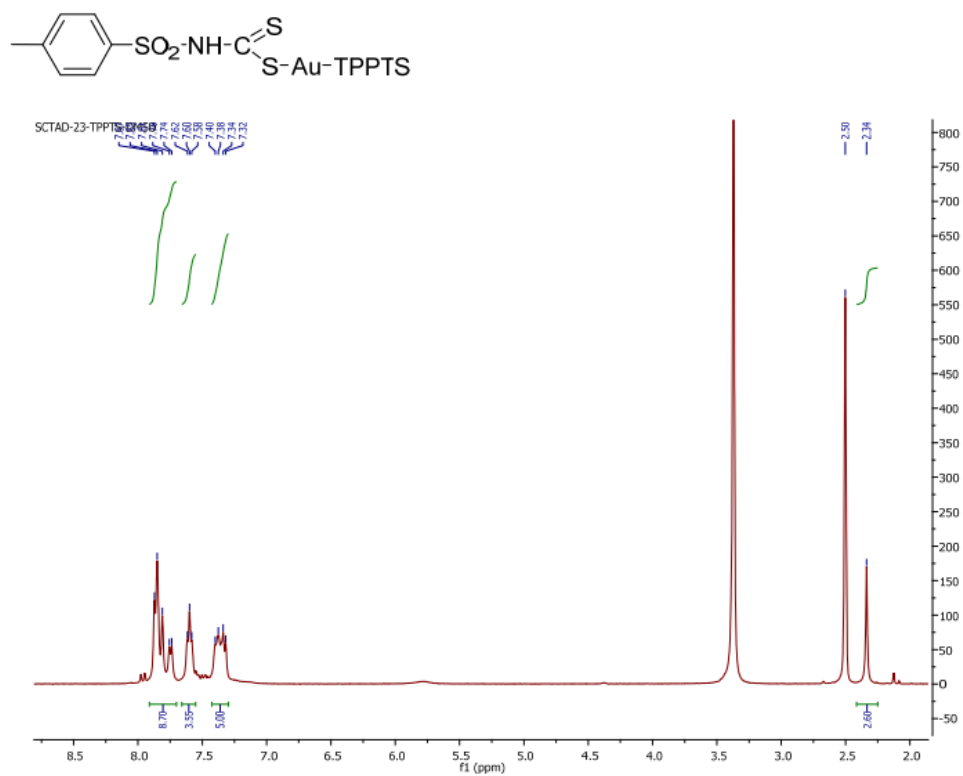
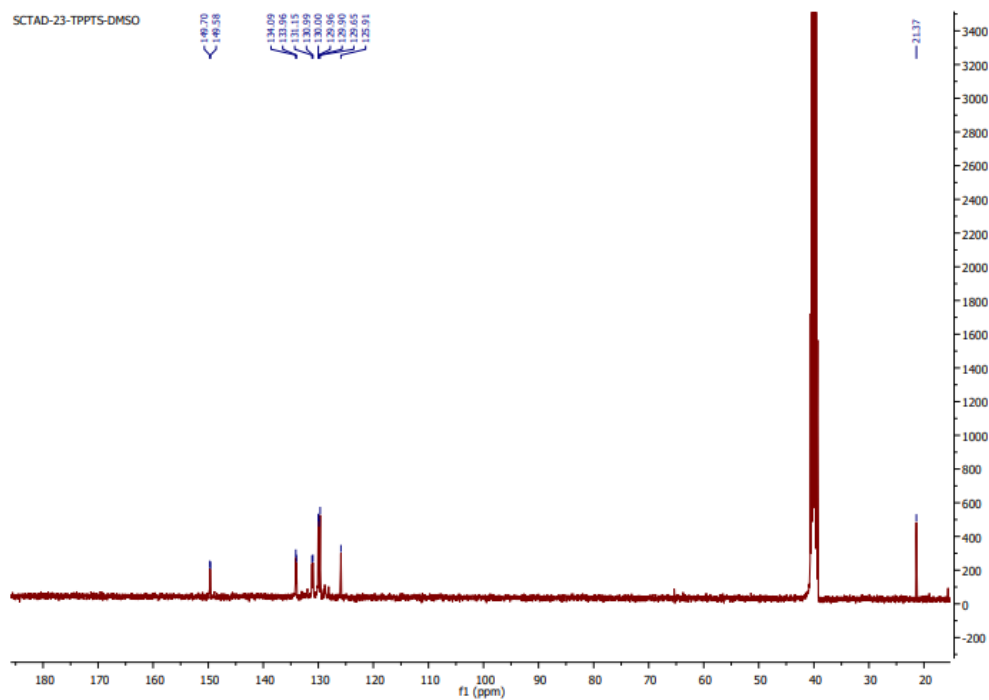


Figure S14. $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR spectrum of compound **4** in dms0-d_6 .

Figure S15. ^1H NMR spectrum of compound **5** in dmsd_6 .Figure S16. $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR spectrum of compound **5** in dmsd_6 .

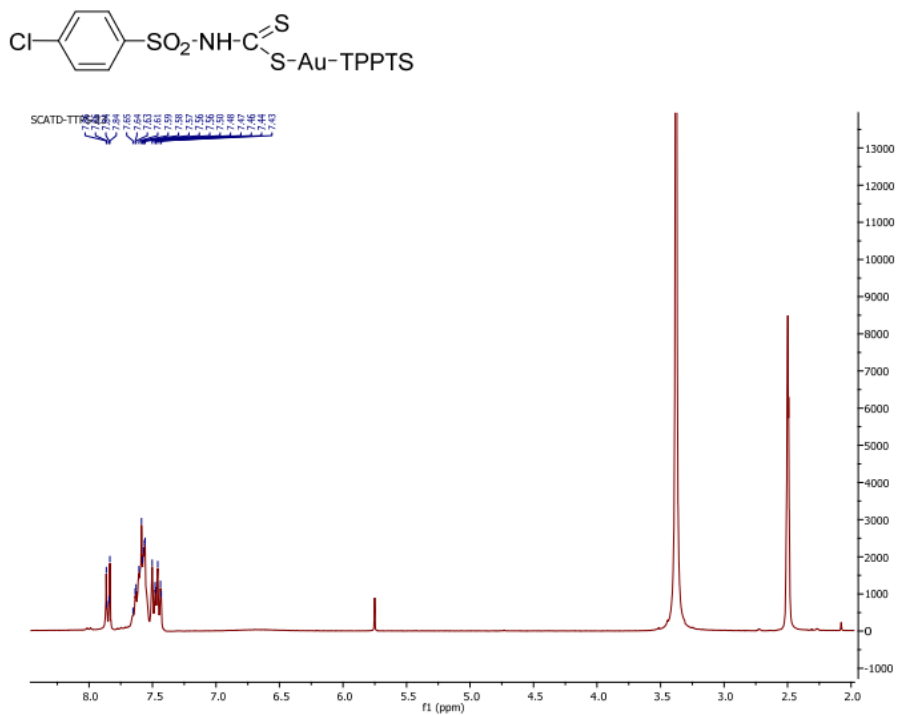


Figure S17. ^1H NMR spectrum of compound **6** in dmsd-d_6 .

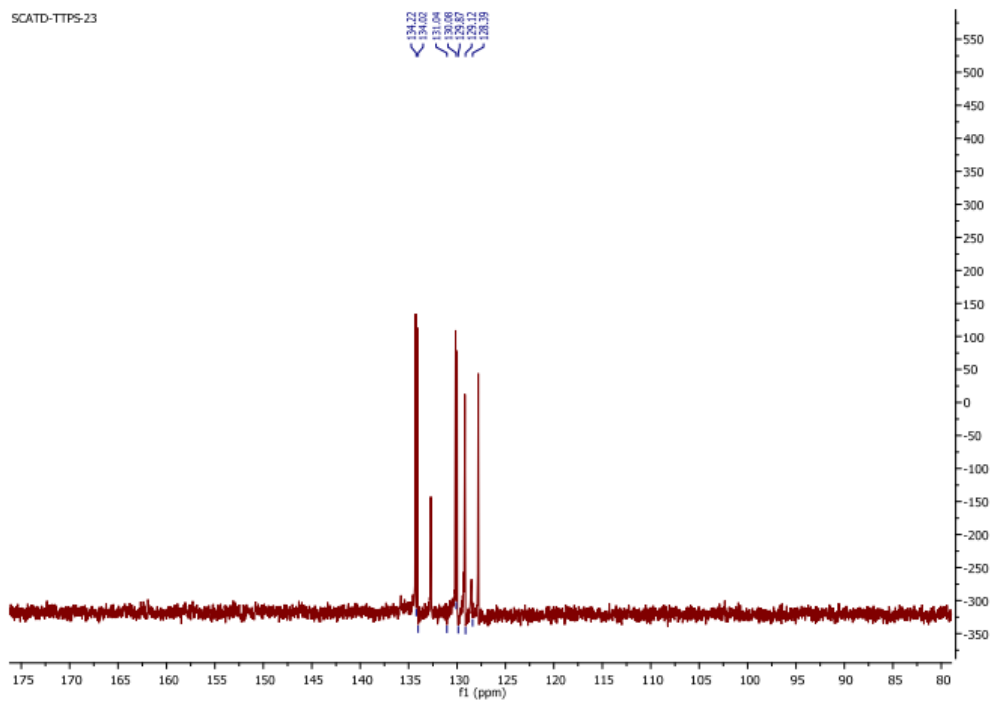


Figure S18. $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR spectrum of compound **6** in dmsd-d_6 .

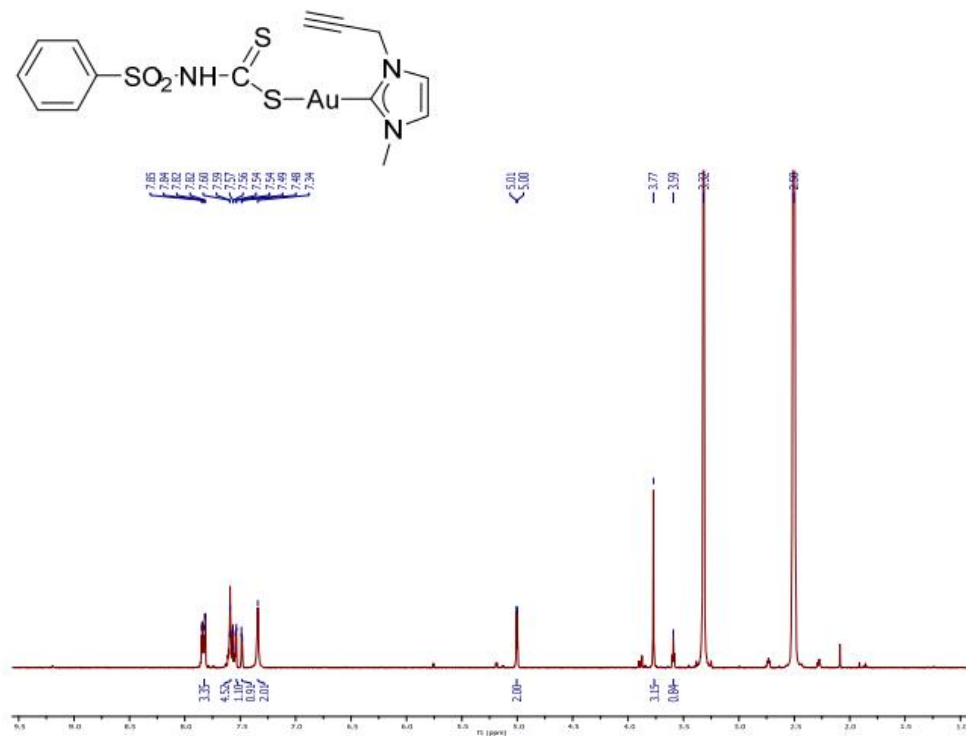


Figure S19. ^1H NMR spectrum of compound **7** in dms0-d_6 .

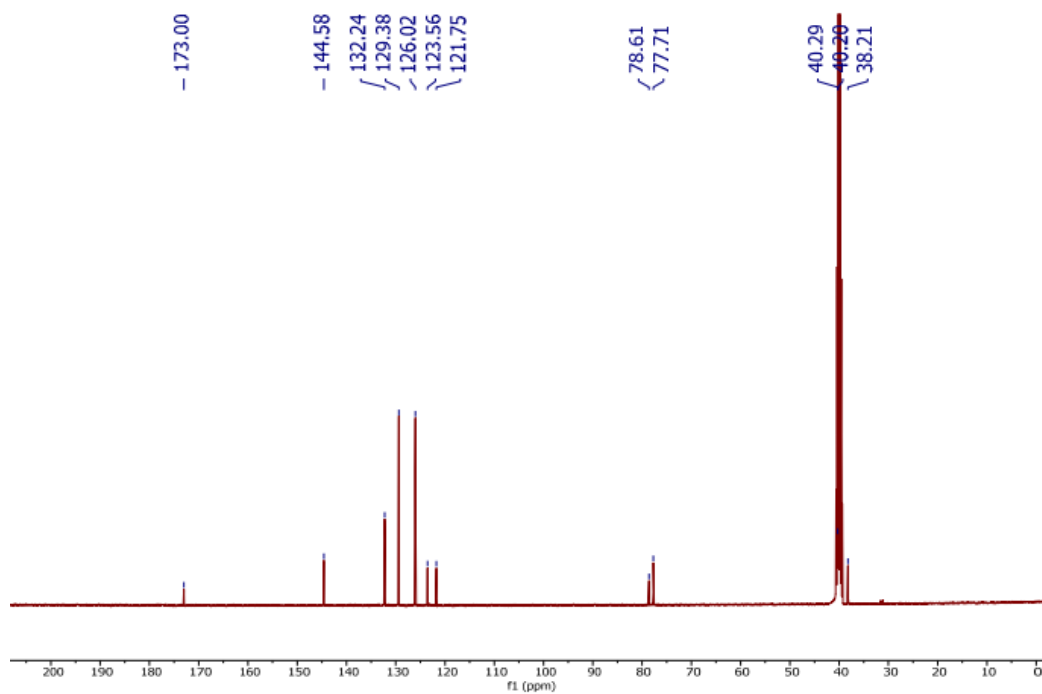


Figure S20. $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR spectrum of compound **7** in dms0-d_6 .

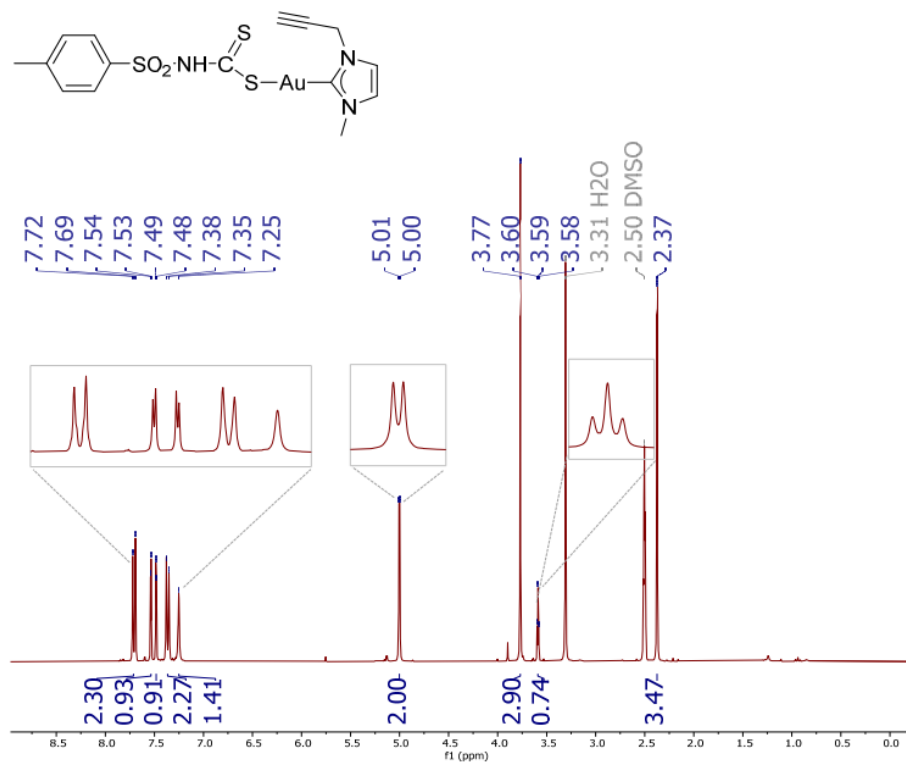


Figure S21. ^1H NMR spectrum of compound **8** in $\text{dmsd-}6$.

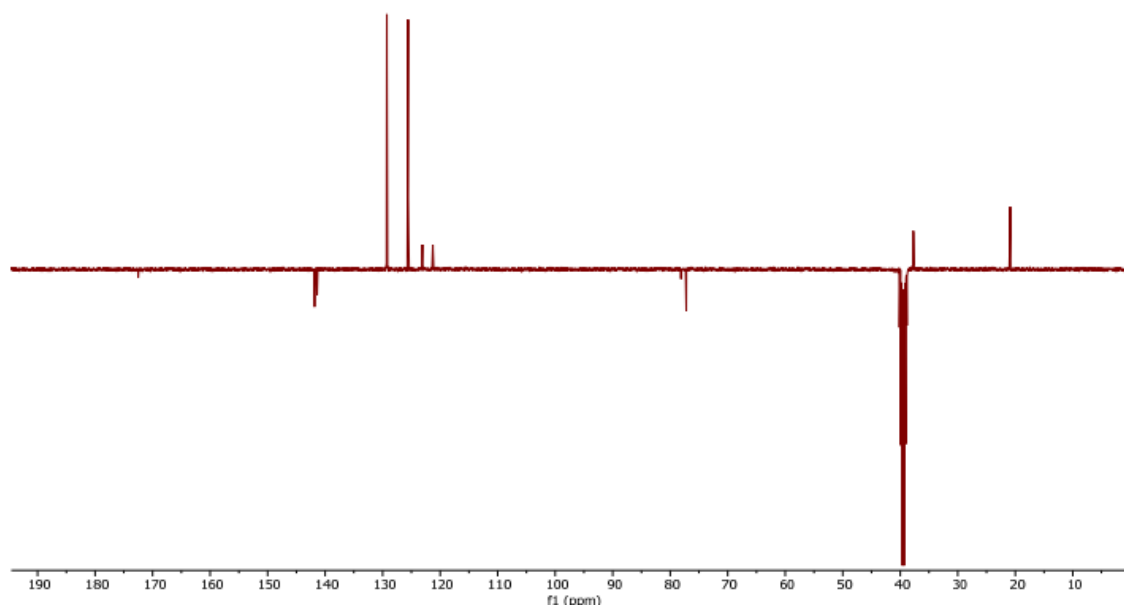


Figure S22. $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -APT NMR spectrum of compound **8** in $\text{dmsd-}6$.

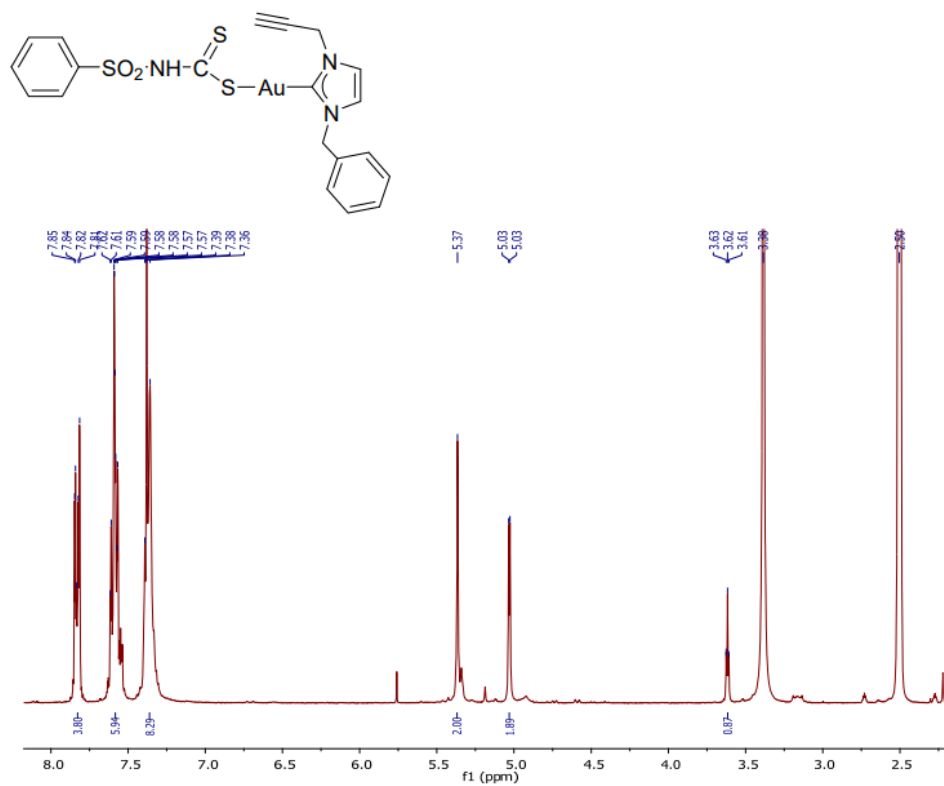


Figure S23. ^1H NMR spectrum of compound 9 in dms0-d_6 .

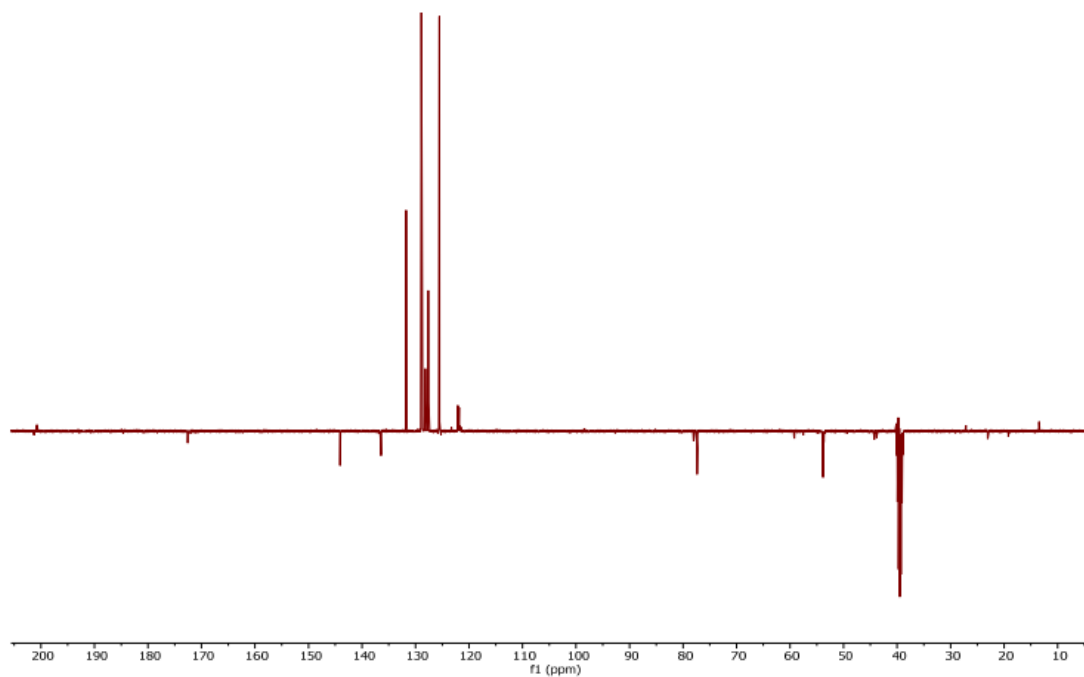


Figure S24. $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR spectrum of compound 9 in dms0-d_6 .

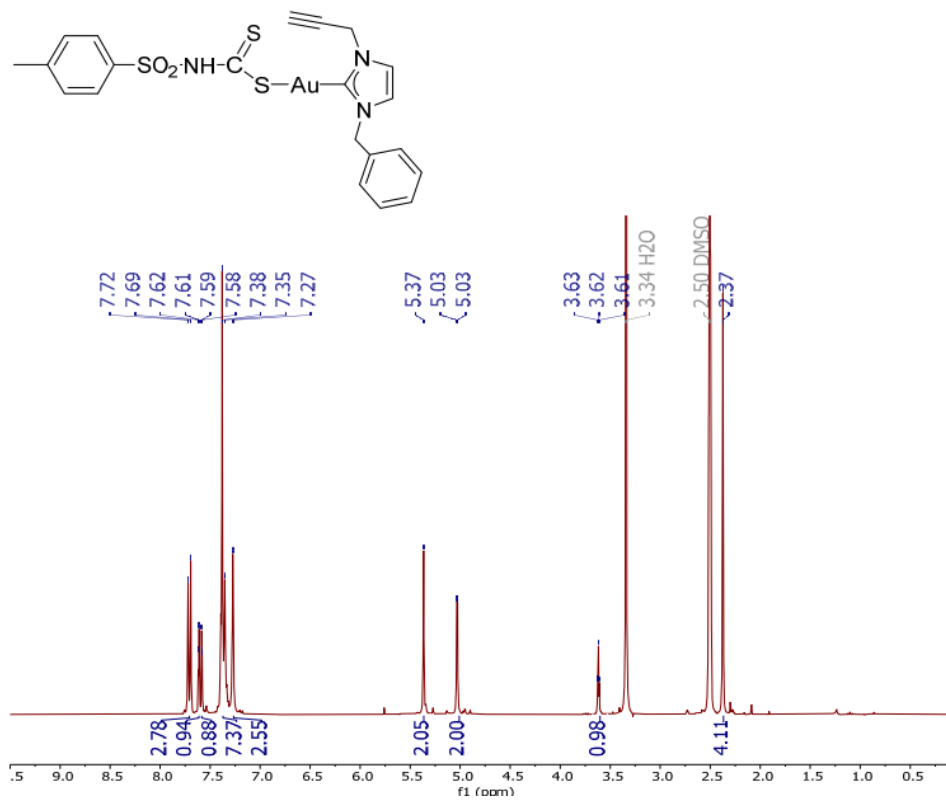


Figure S25. ^1H NMR spectrum of compound **10** in dms0-d_6 .

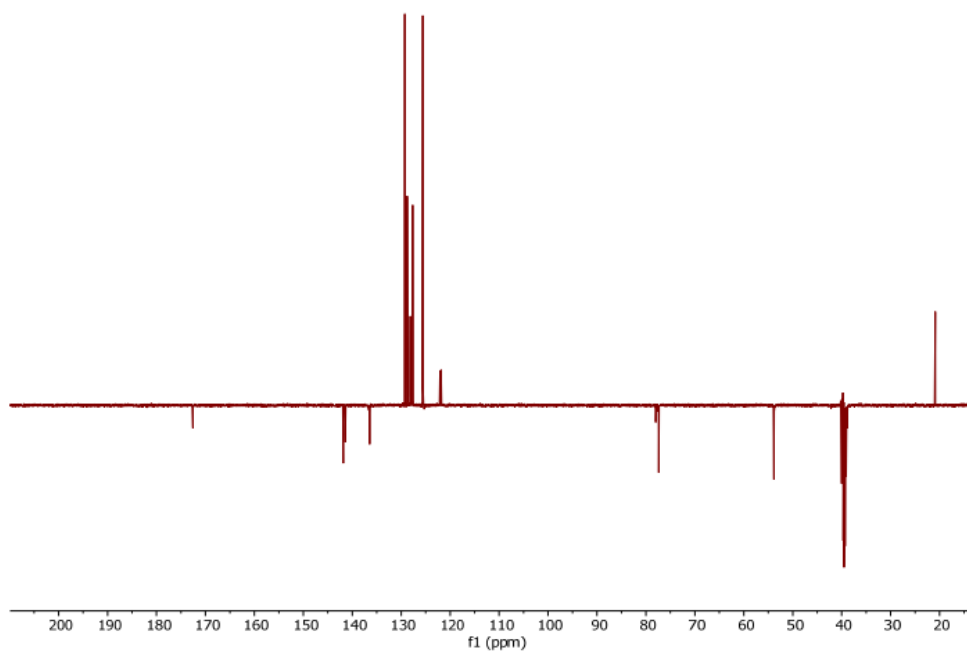
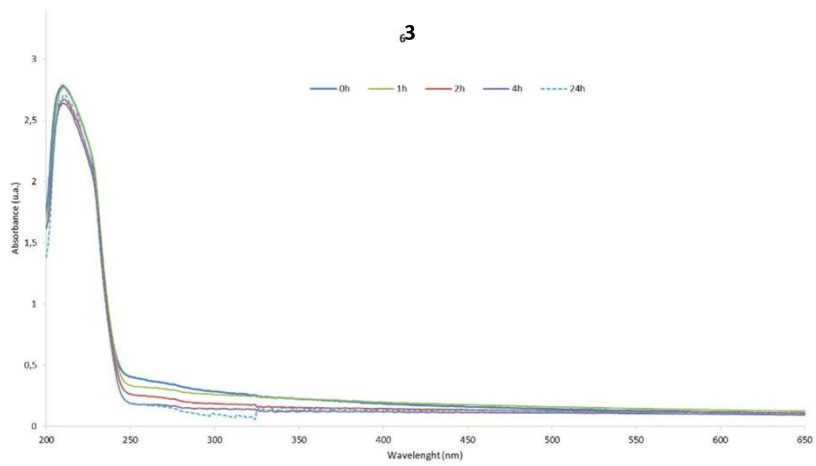
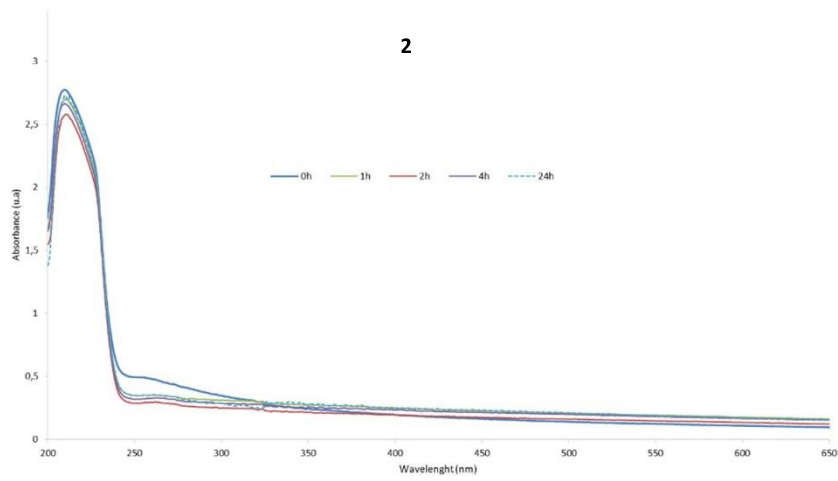
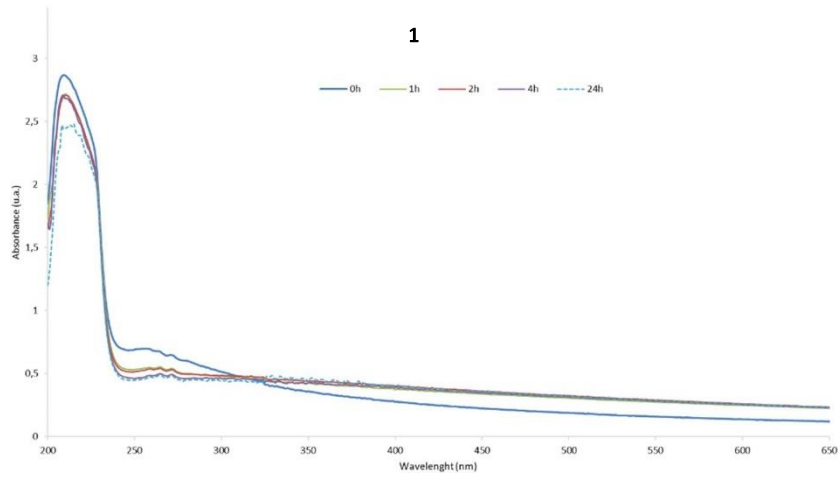
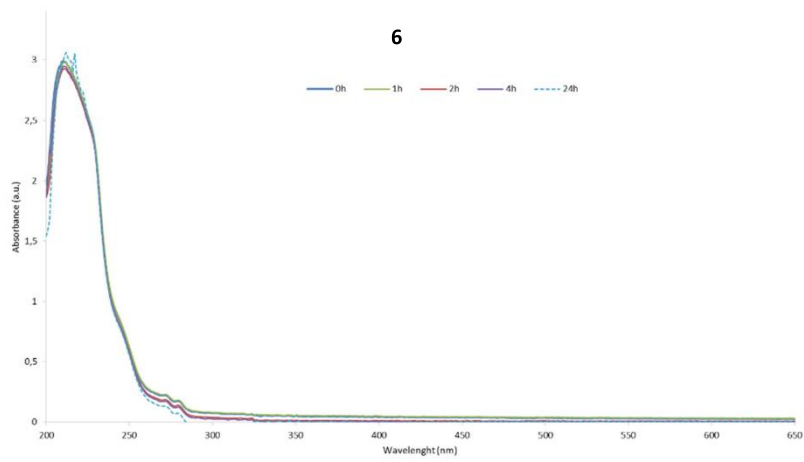
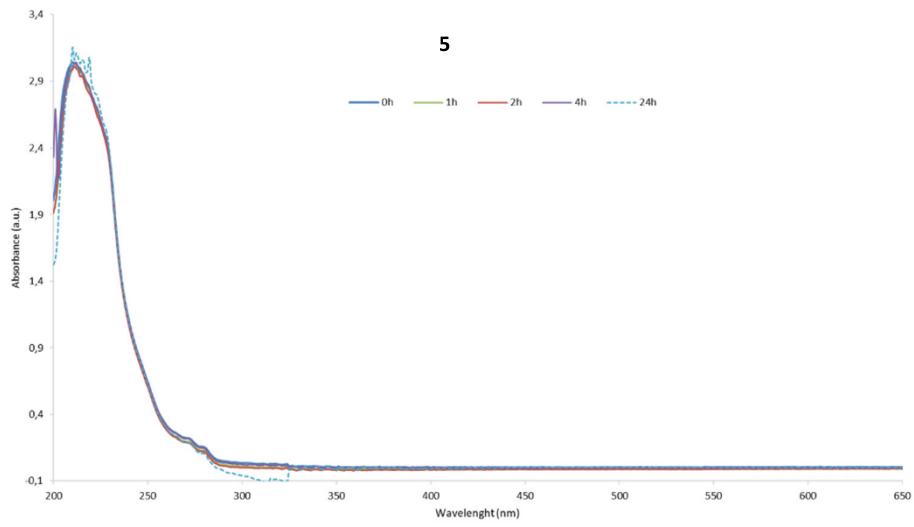
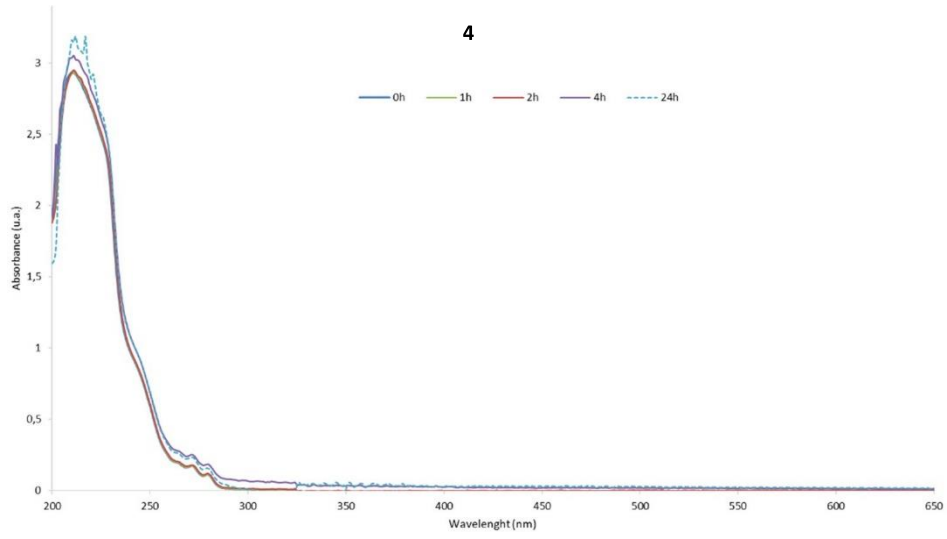
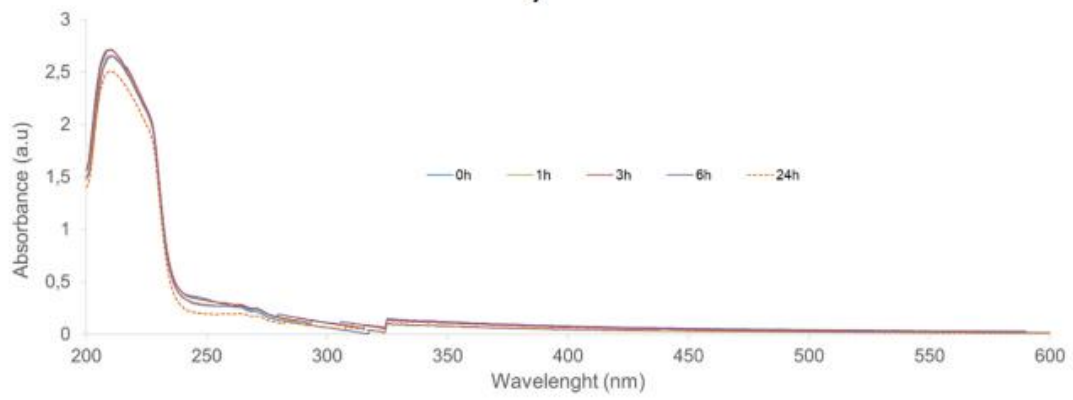


Figure S26. $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -apt NMR spectrum of compound **10** in dms0-d_6 .

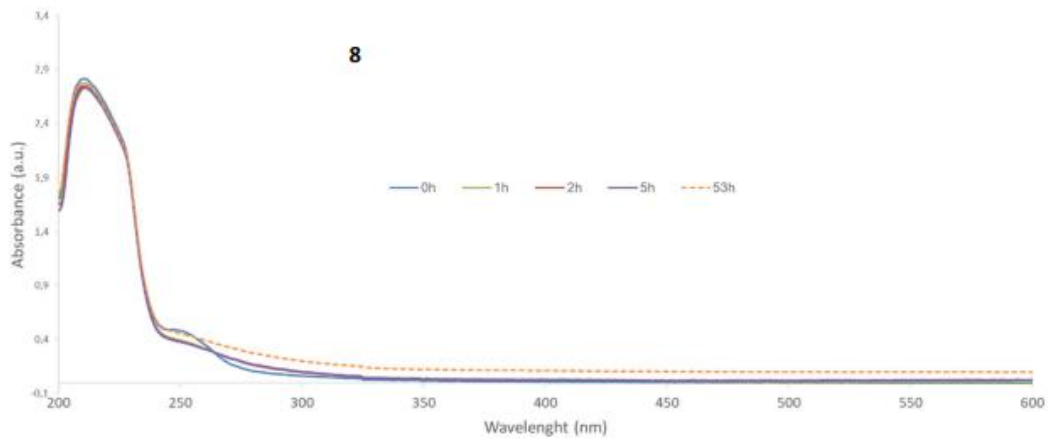




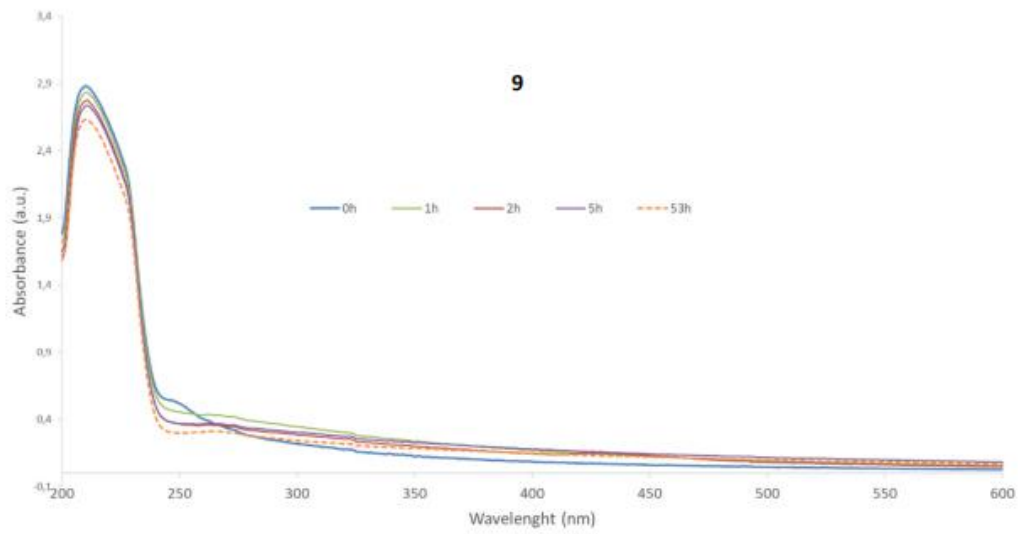
7



8



9



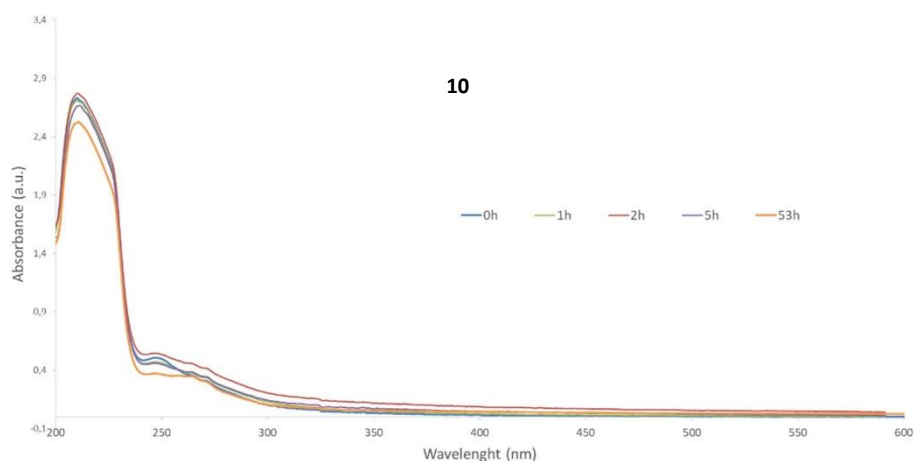


Figure S27. UV-Vis spectra of **1-10** complexes recorded at different times for 24 h to test their stability under physiological conditions. [complex] = 50 μ M diluted in PBS at 37 $^{\circ}$ C.

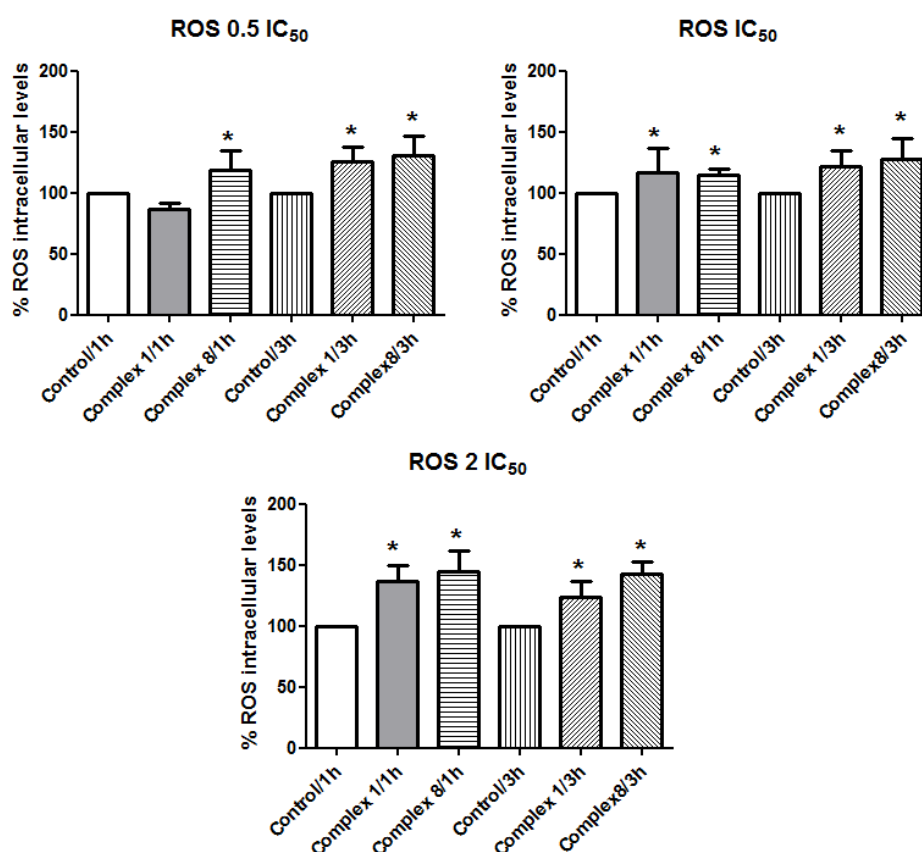


Figure S28. Measurement of intracellular levels of ROS after treatment of Caco-2 cells with complexes **1** and **8** at different concentrations and times. * $p < 0.05$ compared to respective control.

IV.4. Grape stem extracts with potential anticancer and antioxidant properties

Abstract: The applications of plant extracts for therapeutic purposes have been used in traditional medicine since plants contain bioactive compounds with beneficial properties for health. Currently, the use of these compounds, rich in polyphenols, for the treatment and prevention of diseases such as cancer, diabetes or cardiovascular diseases, many of them related to oxidative stress, is gaining certain relevance. Polyphenols have been shown to have antimutagenic, antioxidant, and anti-inflammatory properties. Therefore, the objective of the present work was to study the potential effect of grape stem extracts (GES), rich in phenolic compounds, in the treatment of cancer as well as its role in the prevention of this disease associated with its antioxidant power. For that purpose, three cancer lines were used (Caco-2, MCF-7 and MDA-MB-231) and the results showed that grape stem extracts were capable of showing an antiproliferative effect in these cells through apoptosis cell death associated with a modification of the mitochondrial potential and ROS levels. Also, grape stem extracts showed an antioxidant effect on differentiated intestinal cells, which could protect the intestine of diseases related to oxidative stress. Therefore, grape extracts contain bioactive principles with important biological properties and could be used as bio-functional food ingredients to prevent diseases or even to improve certain aspects of human health.

Keywords: Cancer cells, Polyphenols, Grape stem, Proteasome, ROS, TrxR1

IV.4.1. Introduction

Grape stems are by-products generated in great quantity in the winemaking process and their elimination causes environmental problems. Therefore, it is important to find strategies that allow the reuse of these products. This residue is a rich source of phenolic compounds, celluloses, hemicelluloses and lignins [1-6]. Among them, phenolic compounds confer antioxidant properties to the extracts obtained from grape stem. For this reason, different researches have been conducted in order to determine the polyphenolic composition of grape stems, and several proanthocyanidins, anthocyanidins, flavonols, hydroxycinnamic acids and stilbenes have been found. Among them, the most characteristic polyphenolic substances referred for most of the studies are *trans*-resveratrol, ϵ -viniferin, caftaric acid, gallic acid, catechin (one of the most abundant polyphenols), epicatechin, malvidin derivatives, quercetin and glycosylated derivatives of quercetin in position 3 [2,3, 5, 7].

According to current research results, grape stem extracts possess important biological activities with multiple benefits for human health due to antioxidants and anti-inflammatory properties [5,7-11]. Veskoukis et al.[10] found that this by-product is particularly rich in flavonoids and stilbenes, such as *trans*-resveratrol and viniferin, which are found in considerably high concentrations. These authors also found that such extracts exhibited significant antioxidant

properties and even at low concentrations, they showed a strong ability to prevent oxidation of low-density lipoprotein (LDL) and to reduce intracellular levels of reactive oxygen species (ROS). In this way, Gonzalez-Centeno et al. [12] and Veskoukis et al. [10] evaluated the total phenolic and total proanthocyanidin composition of different grape stem varieties as well as their antioxidant potential. Grape stem extracts also prevent ROS-induced DNA damage and have inhibitory activity against liver and cervical cancer cell growth, suggesting their potential as chemopreventive agents [13]. Using human epidermal keratinocytes, Domínguez-Perles et al. [14] observed a protective effect of grape stem extracts against the oxidative stress. These researchers found a close correlation between the concentration of phenolic compounds in the extracts and the potential to regulate the redox balance *in vitro*, as well as the capacity of these extracts to efficiently modulate apoptosis in HaCaT keratinocytes. Cho et al. [15] studied the effect of topical administration of grape stem extract to mice skin before subjecting them to UVB radiation for 3 min, thrice a week for one month. These authors demonstrated that these extracts significantly inhibited oxidative damage induced by UVB radiation and observed a decreased epidermal hyperplasia, melanin pigmentation, and collagen degradation in the skin of mice. In addition, grape pomace, consisting of peel, seed, stem, and pulps, is discarded during grape processing, including juice extraction and winemaking, despite its substantial content [8]. In this way, Del Pino-García et al. [16] studied the chemopreventive potential of powdered red wine seasonings against colorectal cancer in HT-29 cells. Grape seed extracts have also been applied as photochemopreventive agent against UVB-induced skin cancer [17]. Likewise, *Vitis vinifera* extracts have been shown an antidiabetic effect by inhibiting the enzyme glycogen phosphorylase [18].

On the other hand, grape stem extracts have significant antimicrobial activity, which seems to be influenced by the structure-function of phenolic compounds and by their interspecific relation with different bacterial strains [19,20]. As example, these type of extracts inhibited growth of both Gram positive (*Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecalis*) and Gram negative (*Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*) digestive pathogens under *in vitro* conditions [21] and their bioactive compounds are used in oral care [22].

In addition, the extracts could be used to control the presence of human pathogenic bacteria in fresh leafy vegetables [6]. Leal et al. [23] studied the potential of grape stems extracts from different white grape varieties as antimicrobial agents to reduce the use of antibiotics. These authors found that the bactericidal activity of the extracts was higher, in general, against Gram positive than Gram negative bacteria, although they used a different methodology from that of Dias et al. [21] to evaluate the antimicrobial activity (minimum inhibitory concentration vs. disc diffusion). Other different studies showed that grape stem extracts were highly effective against foot wound ulcers produced by Gram-positive bacteria and also had anti-inflammatory action, inhibiting the production of nitric oxide lipopolysaccharide-stimulated macrophages, up to 35.25% [24].

During the last years, our research group has investigated the chemopreventive properties of extracts obtained from different plant matrices such as rosehips, fenugreek, pine bark and artichoke waste on human cancer colon [3,25-27]. Although there are only few publications in this regard, the anticarcinogenic potential of grape stem extracts has also been studied in different cell lines [13,28,29]. Besides, grape stem extracts possess important bioactivities such as antiangiogenic properties [30].

However, the phenolic composition, and therefore the biological activity and efficacy of a specific grape stem extract, depends on the procedure used for the obtaining of the extract. In a previous study we selected an optimized extraction method for grape stem [3], and the extracts obtained by this method presented high antioxidant potential and demonstrated to be good candidates for SO₂ substitution in wines [4]. With this background, the aim of the present research was to complete the characterization of those grape stem extracts by studying their potential for the treatment of human colorectal adenocarcinoma (Caco-2) and human breast adenocarcinoma (MCF-7 and MDA-MB-231) cell lines. Thus, we have measured the possible antiproliferative effect of these extracts on cancer cells and their mechanism of action. Furthermore, the protective effect of these extracts, in a model of intestinal barrier (differentiated Caco-2 cells), was also tested through the measurement of intracellular levels of reactive oxygen species (ROS).

IV.4.2. Materials and Methods

IV.4.2.1. Extracts

The grape stem extract was obtained through an extraction method using GRAS solvents from Mazuelo variety stems harvested in the 2016 vintage [3]. Briefly, grape stems were oven dried at 25 °C, ground and sieved ($\phi < 0.3$ mm). The extract was obtained after macerating the ground and sieved stem in 50% ethanol/water, with a 1:100 (w/v) ratio and at 40 °C for 24 h. Then the extract was centrifuged (8000 rpm for 15 min), filtered through filter paper and lyophilized (Telstar Cryodos freeze drier, Madrid, Spain).

IV.4.2.2. Chemicals

All the HPLC solvents used were from Scharlab (Barcelona, Spain). All the phenolic standards used were from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain), with the exception of malvidin-3-glucoside (enyn chloride, Extrasynthese, Genay, France). Among the chemicals for spectrophotometric analysis, Folin-Ciocalteu reagent, Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid), gallic acid and quercetin were supplied by Sigma-Aldrich (Madrid, Spain); glacial acetic acid, sodium carbonate anhydrous and aluminum chloride 6-hydrate were supplied by PanReac AppliChem (Barcelona, Spain)

IV.4.2.3. Identification and quantification of phenolic composition of grape stem extracts by HPLC-DAD

Identification and quantification of the phenolic compounds present in the grape stem extracts were performed using high-performance liquid chromatography. The chromatograph was equipped with two 510 pumps, a 717 Plus autosampler, and a 996 photodiode array detector (Waters Div., Milford, MA, USA). A Zorbax Eclipse Plus C18 reversed phase column (250 × 4.6 mm, particle size 5 µm) (Agilent, Santa Clara, CA, USA) was used. For the analyses of the extract, between 45.0 ± 0.1 and 70.0 ± 0.1 mg of sample were weighted and dissolved in 10 mL of methanol with the aid of an ultrasonic bath (JP Selecta, Barcelona, Spain). Samples were prepared in triplicate and analyzed once. The chromatographic analyses were carried out according to a modified method of Barros et al. [31]. Two mobile phases, A (water: 85% formic acid, 99:1 v/v) and B (acetonitrile: 85% formic acid, 99:1 v/v) were used. The flow rate was 1 mL/min using the following linear gradient scheme (t in min; % A): (0; 95%), (15; 85%), (22; 80%), (25, 80%), (35, 70%), (45; 50%), (50, 5%), (55, 95%), (60, 95%). The column temperature was 30 °C and the injection volume was 40 µL. Identification of the different compounds was performed by the double coincidence of the retention time of its corresponding standard and the UV-Vis spectrum of each compound. Quantification was carried out using calibration curves for each compound analyzed. The calibration curves used for resveratrol, gallic acid, quercetin, malvidin-3-glucoside and caftaric acid presented linear correlation coefficients higher than 0.999. The calibration curves obtained for the rest of compounds (viniferin, catechin and the derivative of quercetin) showed linear correlation coefficients higher than 0.998. In the case of the unidentified anthocyanin, it was not possible to identify its structure with the method used in the laboratory. However, most of the anthocyanins described in the literature that are present in grape stem correspond to derivatives of malvidin. For this reason and given the fact that all anthocyanins have similar general structure, we used the calibration curve of malvidin-3-glucoside to estimate the concentration of the unknown anthocyanin.

IV.4.2.4. Determination of antioxidant capacity of the grape stem extracts by DPPH

The DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) assay was based on the method proposed by Brand-Williams et al. [32]. A standard solution of 24 mg of DPPH in 100 mL methanol was prepared and then, it was diluted in methanol until obtaining an absorbance of 0.9±0.1 at 517 nm in a UV-Vis spectrophotometer (Jenway, Staffordshire, UK). For the calibration curve, seven different Trolox standards were prepared in methanol in concentrations from 0.05 to 0.73 mM. For sample preparation, between 50.0 ± 0.1 and 72.0 ± 0.1 mg of extract were dissolved in 10 mL of methanol, and the resulting mixture was diluted 10 times with methanol. For analysis, 150 µL of Trolox standard solution or processed sample were mixed with 2.85 mL of the DPPH solution. After 30 min in darkness, the antioxidant capacity of all the standards and samples was determined by measuring the absorbance at 517 nm. For each batch of extract, three different processed samples were prepared, and each of them was analyzed once. The linear correlation

coefficient obtained for the calibration curve was $R^2 > 0.998$. The results of antioxidant capacity were expressed as mmol Trolox/g of extract.

IV.4.2.5. Spectrophotometric determination of total phenolic and flavonoid content of the grape stem extracts

Total phenolic content was analyzed using the Folin-Ciocalteu method as described by Singleton et al. [33]. For the calibration curve, different gallic acid standards were prepared in methanol in concentrations from 0.2 to 4.6 mM. For sample preparation, between 50.0 ± 0.1 and 72.0 ± 0.1 mg of extract were dissolved in 10 mL of methanol. For analysis, 100 μ L of gallic acid standard solution or processed sample were mixed with 0.5 mL of Folin-Ciocalteu reagent, 7.9 mL of deionized water and 1.5 mL of Na_2CO_3 (20 % w/w), and the resulting solutions were left for 2 h in darkness. The absorbance was measured at 765 nm in a UV-Vis spectrophotometer (Jenway, Staffordshire, UK). The standard used for the calibration curve was gallic acid, ranging between 0.2 and 5.08 mM. The linear correlation coefficient obtained for the calibration curve was $R^2 > 0.999$. For each batch of extract, three different processed samples were prepared, and each of them was analyzed once. The results of total phenolic content were expressed as mg gallic acid/g extracts.

The total flavonoid content was determined by the colorimetric method of aluminum chloride using a solution of 2% AlCl_3 in 5% acetic acid [34]. For the calibration curve, different quercetin standard solutions were prepared in methanol in concentrations from 3 to 30 μ g/mL. For sample preparation, between 50.0 ± 0.1 and 72.0 ± 0.1 mg of extract were dissolved in 10 mL of methanol. For analysis, 1.5 mL of quercetin standard solution or sample were mixed with 1.5 mL of the AlCl_3 solution, and the resulting solutions were left for 30 min in darkness. Then, absorbance was measured on a Jenway UV-Vis spectrophotometer at 420 nm. The linear correlation coefficient obtained for the calibration curve was $R^2 > 0.999$. For each batch of extract, three different processed samples were prepared, and each of them was analyzed once. The results were expressed as mg of quercetin/g extracts. In all cases, the samples were analyzed in triplicate.

IV.4.2.6. Cell culture

Human Caco-2 cell line (TC7 clone) was kindly provided by Dr. Edith Brot-Laroche (Université Pierre et Marie Curie-Paris 6, UMR S 872, Les Cordeliers, France). Human breast adenocarcinoma MDA-MB-231 cells were kindly provided by Dr. Carlos J. Ciudad and Dr. Verónica Noé (Departamento de Bioquímica y Fisiología, Facultad de Farmacia, Universidad de Barcelona, Spain). Human breast adenocarcinoma MCF-7 cells were kindly provided by Cristina Sanchez-de-Diego (Departamento de Fisiología II, Universidad de Barcelona, Spain). Human fibroblast cells were kindly provided by Dr. Julio Montoya (Departamento de Bioquímica, Universidad de Zaragoza, Spain). All cell lines were maintained in a humidified atmosphere of 5% CO_2 at 37 °C. Cells were grown in Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM) supplemented with 20% fetal bovine serum (FBS), 1% non-essential amino acids, 1% penicillin (1000 U/mL), 1% streptomycin

(1000 µg/mL) and 1% amphotericin (250 U/mL). The cells were passaged enzymatically with 0.25% trypsin-1 mM EDTA and sub-cultured on 25 cm² plastic flasks at a density of 5 x 10⁵ cells/cm². Culture medium was replaced every 2 days. Extract treatments were added 24 h post-seeding for assays on Caco-2 undifferentiated cells [35]; and 10-15-days post-seeding on differentiated Caco-2 and MCF-7 and MDA cells. Cell confluence (80%) was confirmed by optical microscopy observance.

IV.4.2.7. Cell treatment and antiproliferative property analysis

Extracts from grape stem were diluted in cell culture medium to the final concentration 1.5 mg/mL. For cytotoxicity screening assays, the cells were seeded in 96-well plates at a density of 4 x 10³ cells/well. Culture medium was replaced with medium containing plant extracts and cells were incubated for 48 or 72 h. Antiproliferative effect was measured with the fluorometric cell viability resazurin assay. Resazurin stock solution at a concentration of 10 mg/mL was prepared dissolving resazurin powder in PBS and this stock solution was rediluted 1:10 in DMEM to obtain the working solution. After removing culture medium from plates, 100 µL of working solution were added to every well and cells were incubated at 37 °C for 2 h. Finally, fluorescence was measured with excitation/emission at 544/590 nm using a FLUOstar Omega (BMG Labtech) microplate reader.

IV.4.2.8. Measurements of apoptosis

The cells were seeded in 25 cm² flasks (5 x 10⁵ cells/cm²) and then exposed to plant extracts for 48 h at IC₅₀ concentration, then collected and stained with annexin V-FITC and propidium iodide as previously described [36]. A negative control was prepared by untreated cells, that was used to define the basal level of apoptotic and necrotic or dead cells. After incubation, cells were transferred to flow cytometry tubes and washed twice with phosphate saline buffer (PBS), followed by a resuspension in 100 µL of annexing V binding buffer (100 mM Hepes/NaOH pH 7.4, 140 mM NaCl, 2.5 mM CaCl₂). 5 µL annexin V-FITC and 5 µL propidium iodide were added to each tube. After 15 min of incubation at room temperature in the dark, 400 µL of annexin binding buffer were added and analyzed by flow cytometry within 1 h. The signal intensity was measured using a BD FACSAria™ cell sorter (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) and analyzed using BD FASCDiva™ software (BD Biosciences).

IV.4.2.9. Flow cytometry mitochondrial membrane potential assay

Cells were seeded in 25 cm² flasks and then exposed to plant extracts for 48 h. The control cells were incubated with a new medium without treatment. Then, cells were washed twice with PBS. The pellet was resuspended in PBS at concentration of 10⁶ cell/mL and 5 µL of 10 µM 1,1',3,3,3'-hexamethylindodicarbo-cyanine iodide (DiIC1) were added to each sample. Tubes were incubated at 37 °C for 15 min and 400 µL PBS were added prior to analyze fluorescence with BD FACSarray™ (BD Biosciences) equipped with an argon ion laser. Excitation and emission setting were 633 and 658 nm, respectively [36].

IV.4.2.10. Determination of intracellular levels of reactive oxygen species (ROS)

The cells were seeded in 96-wells plate at a density of 4×10^3 cells/well. The intracellular level of ROS was assessed using the dichlorofluorescein assay as previously described [36]. Cells were cultured 24 h before being incubated with stem extracts for 24 h and then underwent oxidative stress induction by adding H_2O_2 (80 mM) for 20 min. After that, the medium was removed, cells were washed twice with phosphate buffered saline, and incubated for 1 h with $20 \mu\text{M}$ 2',7' – dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) in PBS at 37°C . The formation of the fluorescence oxidized derivative of DCF was monitored at an emission wavelength of 535 nm and an excitation of 485 nm in a FLUOstar Omega (BMG Labtech) multiplate reader. A measure at time “zero” was performed, cells were then incubated at 37°C in the multiplate reader, and generation of fluorescence was measured after 20 min. ROS levels were expressed as a percentage of fluorescence compared to the control. The obtained values of fluorescence intensity are considered as a reflection of total intracellular reactive oxygen species (ROS) content.

IV.4.2.11. Determination of proteasome activity

The cells (5×10^5 cells/cm²) were seeded in cell culture flask (25 cm²). The determination of the proteasome activity was carried out by fluorometric assay using a proteasome 20S activity assay kit (MAK172, Sigma-Aldrich) based on Suc-LLVy-AMC, a fluorogenic substrate of the proteasome μ5 submit. Caco-2 cells were treated with grape stem extracts, for the desire time, 24 h post-seeding and then were processed following instructions in kit protocol. The fluorescence levels correspond to the proteasomal chymotrypsin-like activity (CT-L activity). The activity was measured in lysed cells with FLUOstar Omega (BMG Labtech) and the value was obtained per mg of protein. The data are expressed in % CT-L activity.

IV.4.2.12. Thioredoxin reductase 1 (TrxR1) activity

The cells were seeded in a 96-well plate with grape stem extracts for 24 h. The cells were then lysed and incubated in a shaking motion for 20 minutes before adding $25\mu\text{L}$ /well reaction buffer (500 μL PBS pH 7.4, 80 μL 100 mM EDTA pH 7.5, 20 μL 0,05% BSA, 20 mM 100 μL NADPH, 300 μL distilled H_2O) and reaction was started with DTNB (20mM in pure ethanol) as previously described by Allaoui et al. [26]. The absorbance increase was followed at 405 nm with SPECTROstar Nano (BMG Labtech) every minute for 6 min. The value was obtained per mg of protein and expressed in % TrxR activity.

IV.4.2.13. Statistical analysis

All assays were performed at least three times. Data are presented as mean \pm SD. Means were compared using one-way analysis of variance (ANOVA). Significant differences at $p < 0.05$ were compared using a Bonferroni's Multiple Comparison Test. The statistical analyses and the graphics were performed using the GraphPad Prism Version 5.02 software for Windows (GraphPad Software San Diego, CA, USA).

IV.4.3. Results and discussion

Plant polyphenols represent a variety of bioactive compounds that are capable of preventing and controlling diseases such as cancer, diabetes, neurodegenerative, autoimmune, cardiovascular and ophthalmic diseases [37]. The presence of polyphenols compounds in grape stem gives them exceptional biological value [38]. It has been shown that extracts derived from grape stems possess potent antioxidant activity *in vitro* [39] and in cell lines [7], whereas their anticarcinogenic role has not been widely reported.

The present study investigates the biological properties of grape stem extracts on different cancer cells as well as their mechanisms of action. Furthermore, the extracts effect on the prevention of oxidative stress in a model of differentiated intestinal cells has also been studied.

IV.4.3.1. Phenolic composition and antioxidant activity in Mazuelo stem extracts

The phenolic composition as well as the total polyphenols and flavonoids content of Mazuelo stem extracts are presented in Table 1. In this extract, nine phenolic compounds have been found, of which the most abundant were (+)-catechin and the quercetin-3-derivative. Likewise, Leal et al. [24] found that (+)-catechin was the most abundant phenolic compound in Portuguese grape stem extracts from different varieties (Tinta Roriz, Touriga Nacional, Castelão, Syrah, Arinto and Fernão Pires). Anastasiadi et al. [11] also reported the presence of several phenolic compounds in grape stem extracts from six red and white varieties from Greece. Comparing their results with our Mazuelo stem extract, *trans*-resveratrol, ϵ -viniferin, (+)-catechin, and caftaric acid coincide, being (+)-catechin the most abundant in both studies. Regarding the concentrations of resveratrol and viniferin, these authors observed differences among varieties and vintages. Lambert et al. [40] analyzed the stilbene content of pruning canes of Carignan variety, which is the name given in France to the Mazuelo variety. These authors found a higher amount of resveratrol and viniferin in their extracts (0.88 mg resveratrol/g extract and 0.97 mg viniferin/g extract), although it must be considered that grapevine canes are probably richer in stilbenes than grape stems [41,42]. In addition to the phenolic compounds found in the Mazuelo stems analyzed in this work, other compounds have been identified in grape stem extracts of different varieties. Thus, in stem extracts from Portuguese grapes, kaempferol and isorhamnetin were identified [2] and in grape stems from Greek varieties, ferulic, coumaric, caffeic and syringic acids were identified [28].

Regarding the antioxidant capacity measured by DPPH assay (Table 1), the result of Mazuelo stem extract was similar to that of the Syrah (0.44 ± 0.04 mmol Trolox/g) and Fernão Pires (0.55 ± 0.01 mmol Trolox/g) and higher than that of the varieties Castelão (0.31 ± 0.01 mmol Trolox/g) and Arinto (0.15 ± 0.01 mmol Trolox/g) found by Leal et al. (2020).

Table 1. Phenolic composition (mg/g extract) and antioxidant capacity of the Mazuelo stem extract.

Grape stem extract	
Gallic acid	0.21 ± 0.03
Caftaric acid	0.14 ± 0.03
(+)-Catechin	0.98 ± 0.20
Quercetin	0.05 ± 0.01
Quercetin-derivative ¹	0.91 ± 0.08
Malvidin-3-glucoside	0.10 ± 0.02
Unknown anthocyanin ²	0.15 ± 0.02
<i>trans</i> -resveratrol	0.26 ± 0.04
<i>trans-ε</i> -viniferin	0.59 ± 0.09
Total phenolic content ³	83 ± 2
Total flavonoid content ⁴	2.6 ± 0.1
Antioxidant capacity by DPPH ⁵	0.47 ± 0.04

¹expressed as quercetin-3-glucoside; ²expressed as malvidin-3-glucoside; ³expressed as mg gallic acid/g extract; ⁴expressed as mg quercetin/g extract; ⁵expressed as mmol Trolox/g extract.

IV.4.3.2. Effect of extracts from grape stem on cancer cells

IV.3.3.2.1. Antiproliferative activity

The toxicity of extracts from grape stem was evaluated on undifferentiated Caco-2, MCF-7 and MDA-MB-231 cells by resazurin assay. Initially, a range of concentrations of grape extracts (62.5, 125, 250, 500, 1000 µg/mL) was tested. The concentrations chosen are in relation to previous work carried out by our research group with other plant extracts [25,43]. The IC₅₀ was calculated in the different cell lines at two time-points 48 and 72 h. However, in MDA-MB-231 and MCF-7 cells, when treated for 72 h, this range was lethal in most concentrations and IC₅₀ could not be calculated, so the range was modified to decreased concentrations (range: 9, 18, 37.5, 75, 200 µg/mL). These results suggest that cytotoxic effect of GSE is concentration and time-dependent and that Caco-2 cells are less sensitive to GSE at the highest incubation time. At 48 h similar viability curves were obtained in the three different cell lines (Figure 1, Table 2).

Table 2. IC₅₀ values of grape stem extracts on Caco-2, MCF-7, MDA-MB-231 and Fibroblasts cells upon 72 and 48 h incubation.

	IC ₅₀ (µg/mL) 72 h	IC ₅₀ (µg/mL) 48 h	Selectivity index
Caco-2	759 ± 51	661 ± 48	2.9
MCF-7	203 ± 53	817 ± 52*	7.2
MDA-MB-231	85 ± 9	911 ± 10*	17.0
Fibroblast	1454 ± 6	-	-

*p<0.05, Incubation time 48 vs 72 h

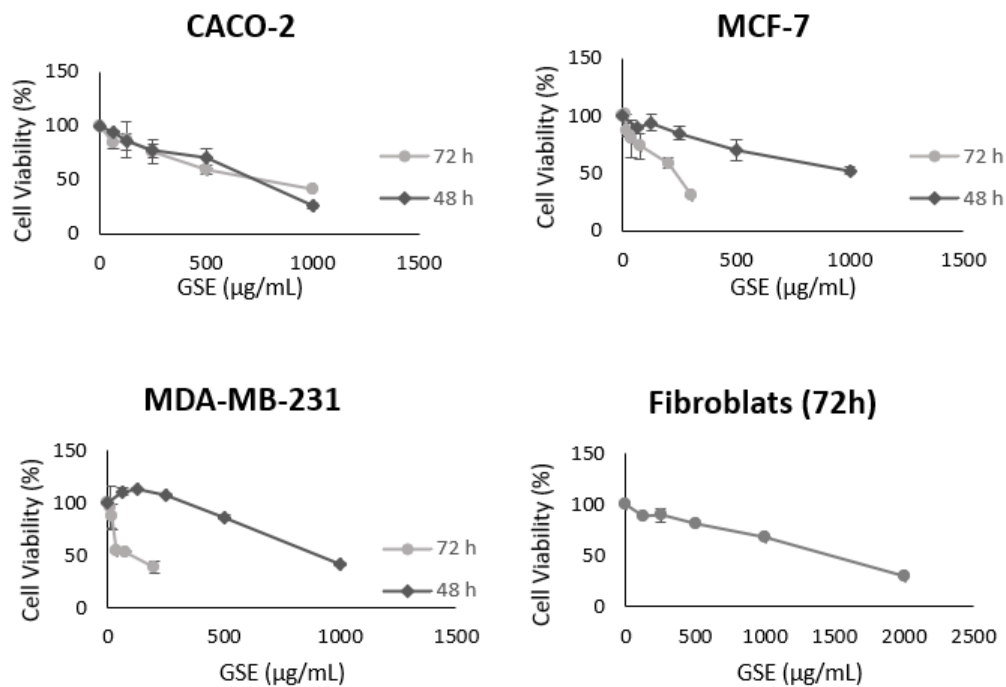


Figure 1. Measurement of Caco-2, MCF-7, MDA-MB-231 and Fibroblasts cells viability at 48 and 72h after incubation with grape stem extracts (GSE). The GSE concentrations tested in the four types of cells were 62.5-125-250-500-1000 µg/mL, but at 72 h in the MCF-7 and MDA-MB-232 cells, the chosen concentrations were, 9-18-37.5-75-200 µg/mL.

The results showed that the grape stem extracts are not selective for a single cancer line but that they produce a decrease in viability in the three cell lines tested (Figure 1). The effect was faster in Caco-2 cells although at longer times (72 h) its effectiveness was greater in breast cells (MCF-7 and MDA-MB-231). In order to determine the action of these extracts on a noncancerous model, the IC_{50} was calculated on Human Fibroblast cells, after 72 h incubation, observing a significant lower effect. This data can be used to obtain selectivity index (SI) as previously was described by Badisa et al. [44]. The SI results are shown in Table 2, being the highest value for the MDA-MB-231 cell line, according with the highest effective response of the extracts towards these cells after 72 h incubation. The difference observed in the two breast cancer lines could be due to the fact that the action of these extracts could be related to the receptors expression for estrogens, which are only present in MCF-7 cells [45].

IV.4.3.2.2. Cell death studies

Since grape stem extracts produce a reduction in cell viability, it was decided to determine what type of cell death occurred. Thus, flow cytometry analyses over 48 h were performed using biomarkers of cell death. Results showed that treatment with the IC_{50} concentration corresponding to each cell line, produce after 48 h, mainly early apoptosis in Caco-2 cells while late apoptosis was mainly detected in MDA cells. However, no significant apoptosis was found in MCF-7 cells. Treatment with longer time (72 h) induced a significant death of these cells by late apoptosis (Figure 2). Therefore, the results obtained show that grape stem extracts at their IC_{50} , produce apoptosis in all cancerous cells tested by activating apoptotic pathways, thereby

reducing their ability to non-selectively react with biological targets to cause necrosis and its related side effects.

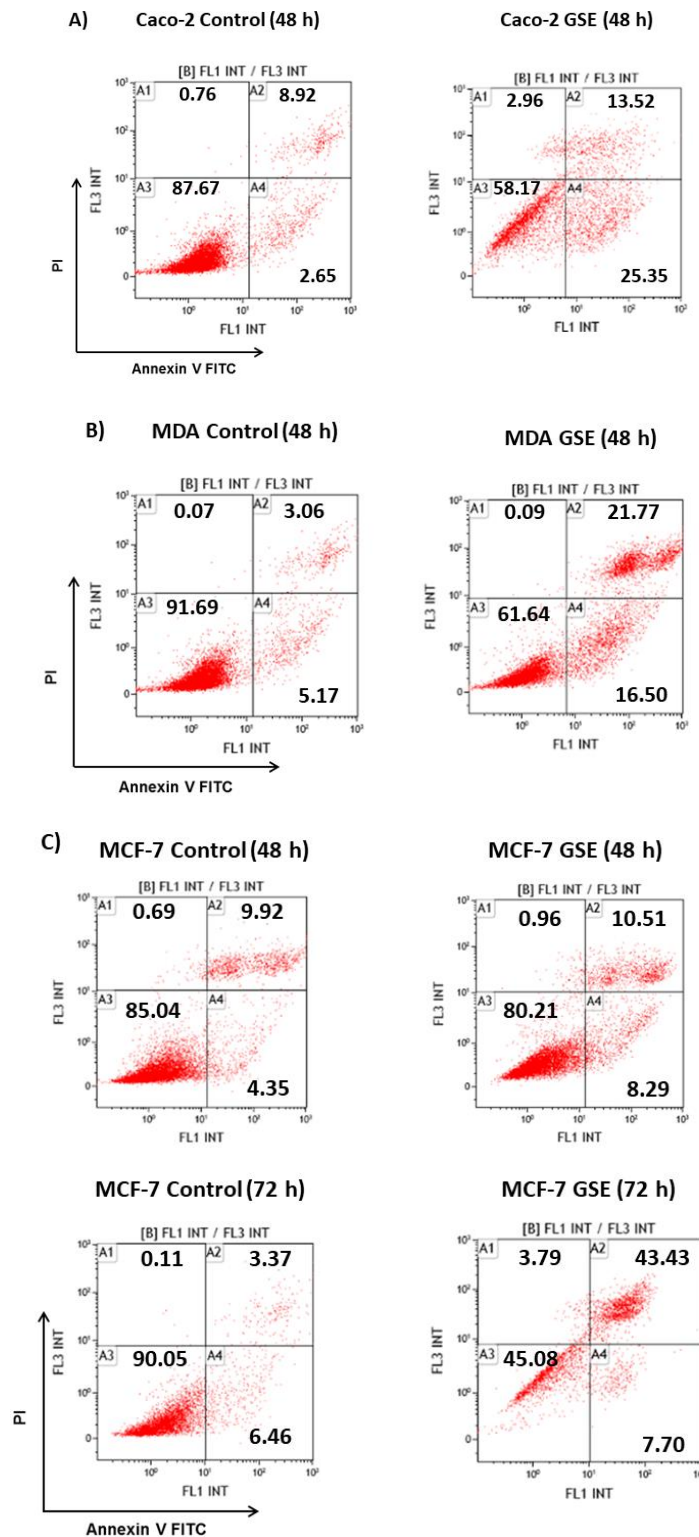


Figure 2. Analysis of the type of cell death induced on Caco-2 (A) MCF-7 (B) and MDA-MB-231 (C) after 48 or 72 h incubation in Control (untreated cells) and grape stem extracts (GSE) at IC₅₀ (µg/mL) on Caco-2 (759), MCF-7 (203) and MDA-MB-231 (85). Percentages of live (A3), necrotic (A1), early apoptotic (A4) and late apoptotic ((A2) cells are indicated.

Since previous studies on plant extracts suggested mitochondrial dysfunction and intrinsic apoptosis induction [25,26], the mitochondrial membrane potential change was analyzed. Mitochondrion play a pivotal role in life and cell death in as much as it produces the majority of energy required for survival and regulates the intrinsic apoptosis pathway. The involvement of mitochondria in cell death is generally measured by following mitochondrial membrane depolarization [46]. The results showed that grape stem extracts significantly altered the mitochondrial potential of the cancer cells tested compared to the untreated ones (Figure 3), and therefore the changes in mitochondrial potential could be related to the apoptosis observed (Figure 2).

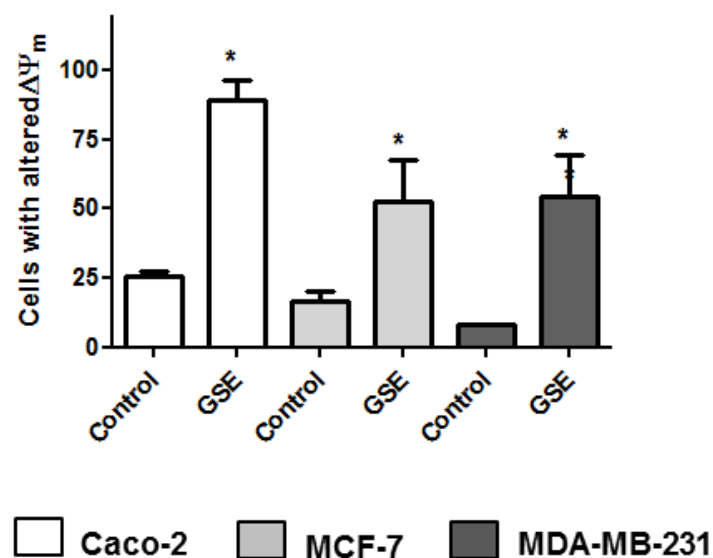


Figure 3. Analyses of mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) after 48 h incubation with grape stem extracts (GSE) at their IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$) in Caco-2 (759), MCF-7 (203) and MDA-MB-231 (85). * $p < 0.05$ vs respective control (untreated cells).

IV.4.3.2.3. ROS intracellular levels

The oxidative stress imposed by ROS plays an important role in many chronic, degenerative diseases and cancer. Higher levels of ROS are generated through the increase in metabolic activity of cancer cells including enhance signaling pathways or mitochondrial dysfunction [47]. ROS levels in the cells were determined based on the reaction between ROS and DCFH-DA. The assays were carried out by treating the cells with the grape stem extracts in presence or absence of H_2O_2 . Hydrogen peroxide is a widespread method used to mimic the pro-oxidative environment that characterizes degenerative diseases such as cancer or neurodegenerative disorders on 2D cell cultures. The results showed that in Caco-2 cells, the extracts at a concentration of 750 $\mu\text{g/mL}$ (IC_{50}) and after 24 h, were able to show a pro-oxidant effect both absence or in presence of hydrogen peroxide (Figures 4A and B). Therefore, this increase in oxidative stress caused by grape stem together with the significant change in the potential of the mitochondrial membrane seems to be the cause of Caco-2 cell death by apoptosis. However, it must be considered that at low extract concentrations, a slight tendency to produce an

antioxidant effect was observed, but without observing a significant antiproliferative effect (data not shown). No modification in ROS levels was found in breast cells when they were treated with extracts at their respective IC₅₀ and lower concentrations, after 24 h (Figures 4A and B). Since breast cells seem to show a slower response to treatment with extracts at 24 h, (Table 2, Fig 2) and as previous results have shown a change in mitochondrial potential at 48 h (Figure 3), the ROS levels were measured at this time. The results showed a significant increase in ROS levels in both conditions (with/without H₂O₂) (Figures 4C and D).

The antioxidant effect of polyphenols has been extensively studied [37] although they may also have a pro-oxidant effect. These results have been mainly observed in tumor cells and have been related to the pro-apoptotic action. The dual pro-oxidant and antioxidant behavior of phenolic plant compounds not only depends on the cell type but also on their concentration, chemical structure and pH status [48,49].

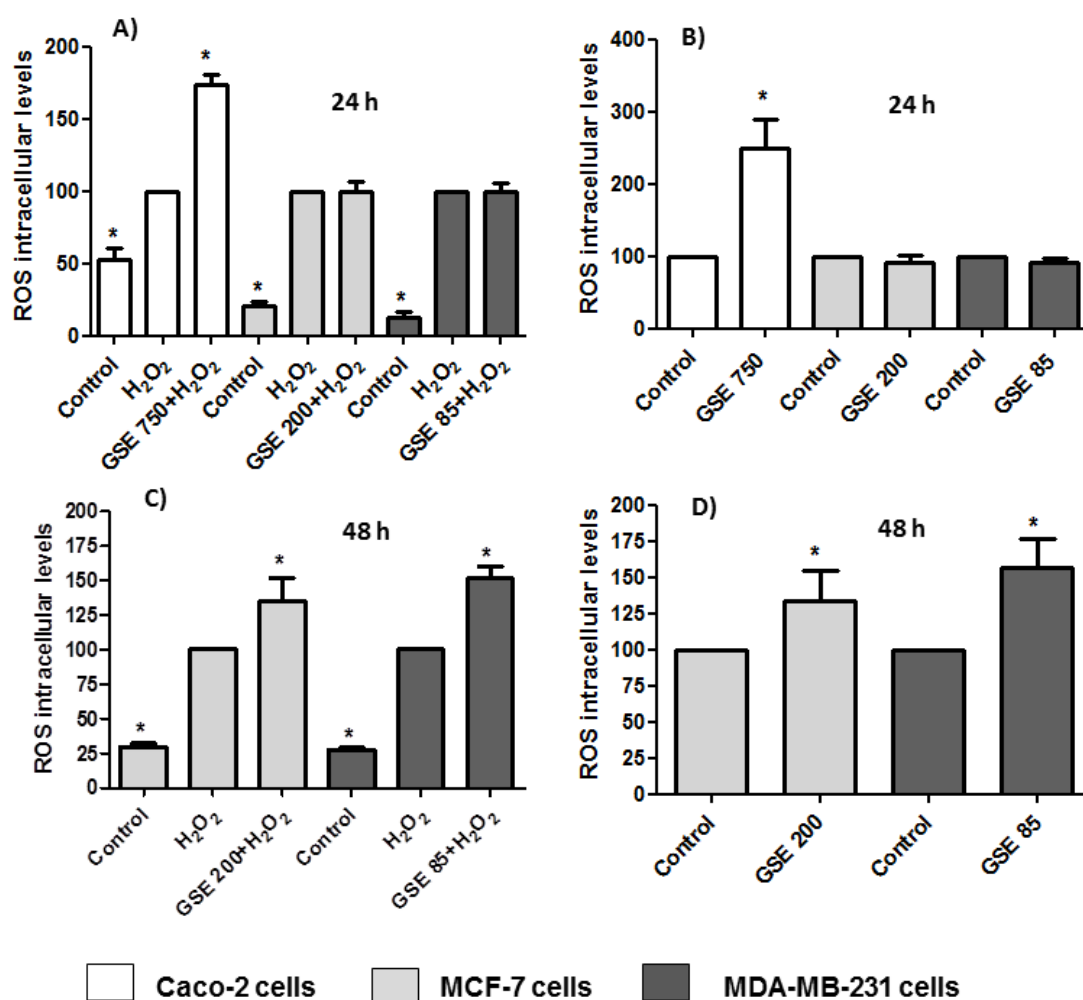


Figure 4. Measurements of ROS levels in presence (A and C) or absence of H₂O₂ (80 mM, 20 min) (B and D) after 24 or 48h incubation with grape stem extracts (GSE) at IC₅₀ (μg/mL) in Caco-2 (759), MCF-7 (203) and MDA-MB-231 (85). *p<0.05 vs respective Control (untreated cells) (B and D) or vs H₂O₂ (A and C).

IV.4.3.2.4. Proteasome activity

The ubiquitin/proteasome system (UPS) is a complex molecular machinery which constitute the main proteolytic pathway in eukaryotic cells. The UPS is involved in regulation of basic biological process such as cell growth, proliferation, cell cycle and apoptosis [50] and dysregulation of these processes causes malignant transformation. Therefore, several cancer cells have dysfunction UPS with increased activity of the proteasome [51], and various studies have shown that the inhibition of the proteasome in cancer cells may lead to accumulation of inhibitors of cyclin-dependent kinases, pro-apoptotic and tumor suppressor proteins, leading to programmed cell death or apoptosis [52,53].

NF- κ B proteins in cytoplasm are associated with inhibitory proteins known as I κ Bs. The main activate form of NK- κ B is a heterodimer composed of p65 and p50 subunits. NF- κ B activation involves the phosphorylation of I κ Bs and after is ubiquitinated and degraded by proteasome. Then the resulting free NF- κ B is translocated to the nucleus, where it binds to κ B binding sites in the DNA and induce the transcriptions of several mediators.

To analyze whether the great stem extracts were able to interact with the proteasome, its activity was performed by fluorometric assay. The proteasome is involved in the activation of the NF- κ B factor and its translocation to the nucleus. The result showed an increase in cells proteasomal CT-L activity after 24 h treatment with grape stem extracts (Figure 5A). ROS often stimulates the NF- κ B pathway in the cytoplasm, but inhibits NF- κ B in the nucleus [54]. In cytoplasm, ROS has been shown to activate NF- κ B through alternative phosphorylation of I κ B α , which may or may not result in degradation of I κ B α . Furthermore, ROS can influence the DNA binding properties of the NF- κ B proteins themselves. Oxidation of p50 in its DNA-binding domain has been shown to prevent its binding to DNA, and therefore the activation of the NF- κ B factor [55]. Therefore, the increase in ROS levels produced by grape stem extracts could oxidize the subunit p50 of the NF- κ B factor, inhibiting its binding to nuclear DNA, causing an up-regulation of the proteasome (Figure 5A).

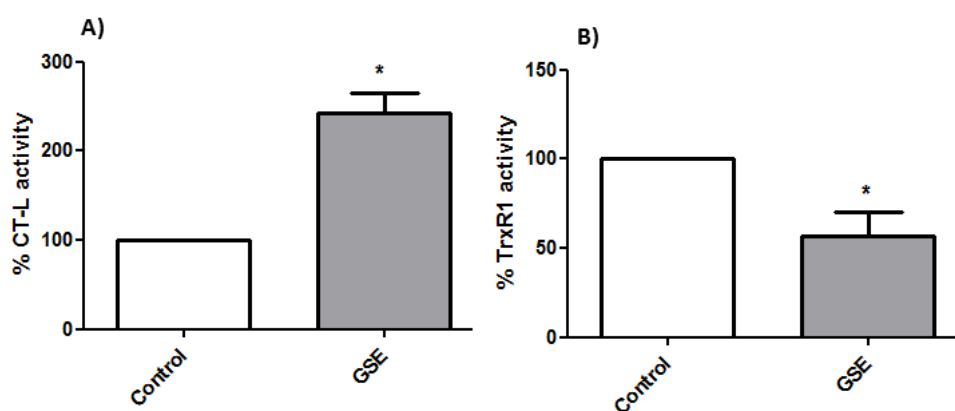


Figure 5. A) Determinations of proteasomal chymotrypsin-like (CT-L) activity and B) TrxR1 activity from Caco-2 cells after incubation 24 h with GSE at IC₅₀ concentration (759 μ g/mL) *p< vs negative control (without treatment).

IV.4.3.2.5. TrxR1 activity

The thioredoxin system is one of the most important antioxidant systems in mammalian cells, and it is constituted by thioredoxin (Trx), the enzyme thioredoxin reductase (TrxR) and NADPH. Although the principal function of thioredoxin system is controlling the intracellular redox homeostasis and repairing oxidative damage, it is also implicated in cell growth and apoptosis control [56]. The overexpression of the Trx has been shown to diminish NF- κ B activation by inhibiting I κ B degradation and can reverse the inhibition of p53 DNA binding caused by increased ROS [57]. However, in the present study, TrxR1 activity was found to be lower in treated cells and this fact could explain the high levels of ROS found after treating the cells with the extracts (Figure 5B).

Therefore, the effect of the extracts on the viability of Caco-2 cells seems to be related to an increase in ROS levels by an inhibition of TrxR1 that indirectly causes an up-regulation in the proteasome due to the inhibition of NF- κ B activity.

IV.4.3.3. Antioxidant capacity of grape stem extracts on a model intestinal barrier

Taking into account the high antioxidant capacity and the content of polyphenols found in the grape stem extracts measured by DPPH assay (Table 1), and given that in cancer cells this effect, at the IC₅₀ concentration was not found, it seemed interesting to evaluate if these extracts showed antioxidant capacity on a model of the intestinal barrier (differentiated Caco-2 cells) upon exogenous oxidative stress by hydrogen peroxide insult or in absence of H₂O₂. High intracellular ROS levels are related with initiation, development and progression of cancer, since free radicals damage lipids, proteins and nucleic acids and lead to malignant transformation [58]. Therefore, testing the capacity of grape stem extracts to protect normal cells from oxidative stress, reducing ROS levels, is interesting to elucidate whether GSE would be useful not only in cancer treatment, but also in prevention of cancer onset. Caco-2 cells spontaneously acquire the phenotypic features of non-cancerous enterocytes after reaching confluence (differentiated cells). Monolayer Caco-2 cells form tight junctions and present the cylindrical polarized morphology of enterocytes, expressing functional microvilli on the apical membrane [59-61]. Therefore, differentiated Caco-2 cells have been established as an acceptable *in vitro* intestinal barrier model.

In these differentiated cells, the antioxidant capacity of the extracts was managed at concentrations of IC₅₀ (1500 μ g/mL), previously obtained in fibroblasts (non-cancerous cells) and 750 and 187 μ g/mL (1/2 IC₅₀ and 1/8 IC₅₀, respectively) in cancer cells and they were tested at a 24 h incubation time. The results showed a clear antioxidant effect by decreasing in ROS level with/without H₂O₂-induced ROS production (Figure 6). In this way, plant extracts have been investigated for their capacity to correct the aberrant increase in ROS levels derived from H₂O₂ exogenous addition [62,63].

The antioxidant capacity of plant extracts is strongly correlated with its clinical application in gastrointestinal diseases related to oxidative stress [64,65]. These results obtained with grape extracts suggest that they could have a potential application in the management of gastrointestinal diseases related to oxidative stress.

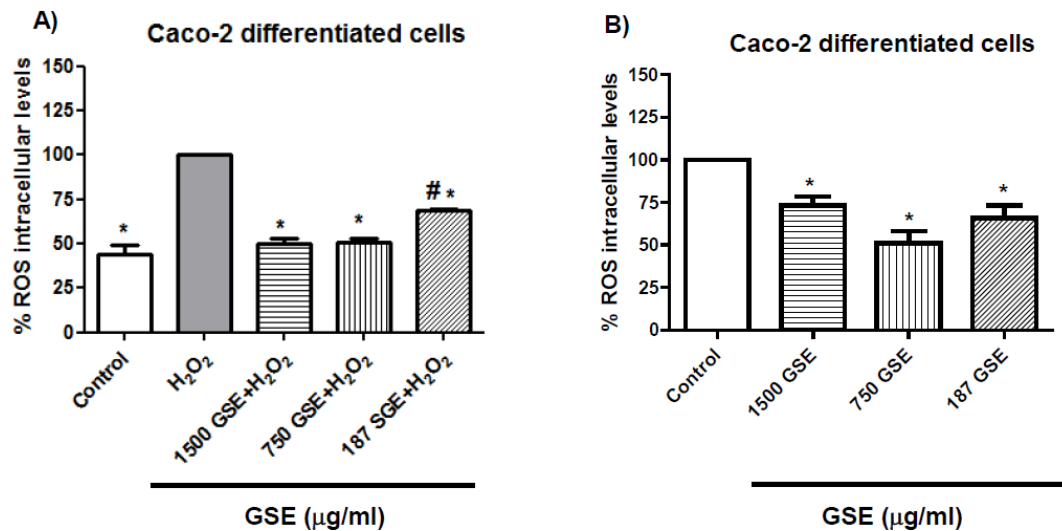
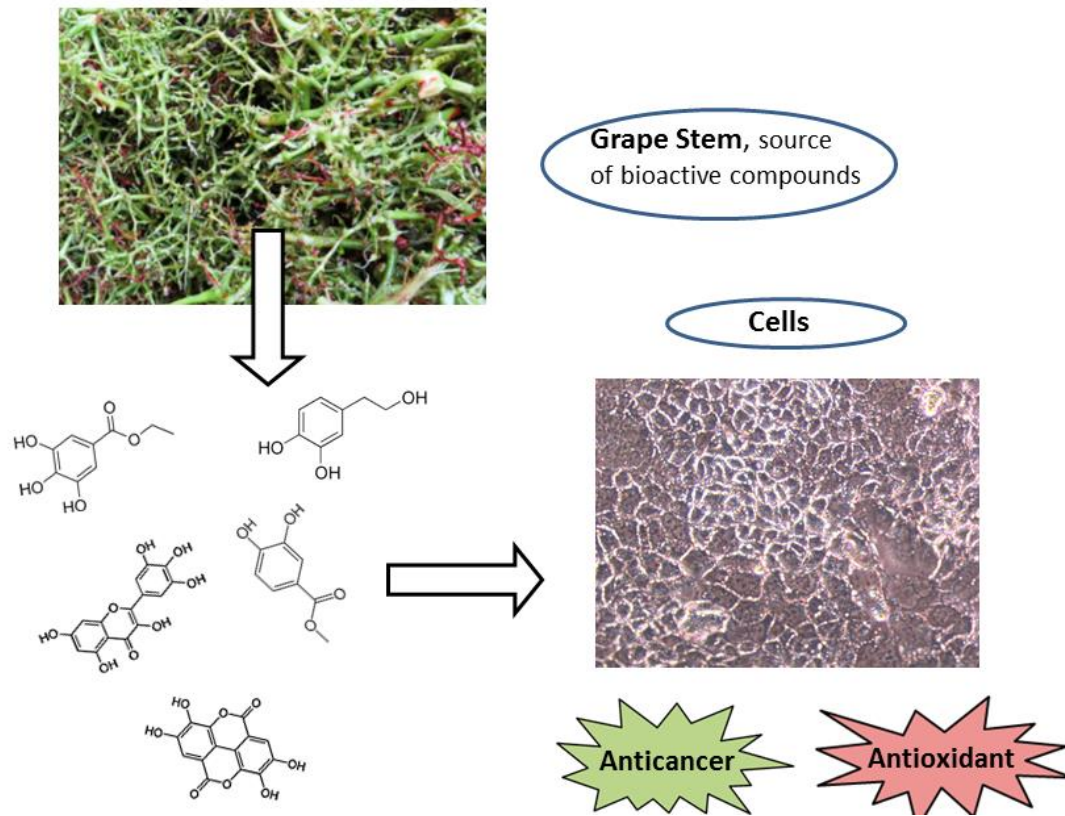


Figure 6. Measurements of ROS levels in presence (A) or absence of H₂O₂ (80 mM, 1h) (B) after 24 h incubation with grape stem extracts (GSE) at 1500, 750 and 187 µg/mL. *p<0.05 vs respective H₂O₂ (A) or vs Control (untreated cells) (B).

IV.4.4. Conclusions

In this work, the effect of grape stem extracts has been studied on cancer cells (Caco-2, MCF-7 and MDA-MB-231) and on the intestinal barrier (Caco-2 differentiated cells). The extracts caused a decrease in the growth of cancer cells, causing death by apoptosis through the modification of mitochondrial potential and a decrease in the antioxidant enzyme TrxR1 that produces an increase in cellular levels of ROS capable of inhibiting the binding of factor NF-κB to the nucleus and causing an up-regulation of the proteasome. In the intestinal barrier, these extracts would produce an antioxidant effect, consistent with the antioxidant capacity found in the analysis of the extracts by DPPH, that would protect the intestine from disorders related to oxidative stress. For all these reasons, grape stem extracts might have a promising future in cancer treatment and the management of oxidative stress on the gastrointestinal tract. In addition, further research should be performed to analyze grape stem extracts potential as antioxidant and preservatives in food and for their beneficial role for health. This would help solve a waste accumulation problem, since the by-products of the agro-food industry could return to the circular economy, being used in food and pharmaceutical industries.



Graphical Abstract

REFERENCES:

1. Karvela, E.; Makris, D.P.; Kalogeropoulos, N.; Karathanos, V.T.; Kefalas, P. Factorial design optimisation of grape (*Vitis vinifera*) seed polyphenol extraction. *Eur. Food Res. Technol.* **2009**, *229*, 731-742, doi:10.1007/s00217-009-1105-1.
2. Gouvinhas, I., Queiroz, M., Rodrigues, M., Barros, A.I.R.N.A., . Evaluation of the Phytochemistry and Biological Activity of Grape (*Vitis Vinifera* L.) Stems: Toward a Sustainable Winery Industry. In *Polyphenols in Plants*; Elsevier Inc: 2019.
3. Jimenez-Moreno, N.; Volpe, F.; Moler, J.A.; Esparza, I.; Ancin-Azpilicueta, C. Impact of Extraction Conditions on the Phenolic Composition and Antioxidant Capacity of Grape Stem Extracts. *Antioxidants* **2019**, *8*, doi:10.3390/antiox8120597.
4. Esparza, I.; Martinez-Inda, B.; Cimminelli, M.J.; Jimeno-Mendoza, M.C.; Moler, J.A.; Jimenez-Moreno, N.; Ancin-Azpilicueta, C. Reducing SO₂ Doses in Red Wines by Using Grape Stem Extracts as Antioxidants. *Biomolecules* **2020**, *10*, doi:10.3390/biom10101369.
5. Spatafora, C.; Barbagallo, E.; Amico, V.; Tringali, C. Grape stems from Sicilian *Vitis vinifera* cultivars as a source of polyphenol-enriched fractions with enhanced antioxidant activity. *LWT--Food Sci. Technol.* **2013**, *54*, 542-548, doi:10.1016/j.lwt.2013.06.007.
6. Vazquez-Armenta, F.J.; Silva-Espinoza, B.A.; Cruz-Valenzuela, M.R.; Gonzalez-Aguilar, G.A.; Nazzaro, F.; Fratianni, F.; Ayala-Zavala, J.F. Antibacterial and antioxidant properties of grape stem extract applied as disinfectant in fresh leafy vegetables. *J. Food Sci. Technol. (New Delhi, India)* **2017**, *54*, 3192-3200, doi:10.1007/s13197-017-2759-5.
7. Goutzourelas, N.; Stagos, D.; Spanidis, Y.; Liosi, M.; Apostolou, A.; Priftis, A.; Haroutounian, S.; Spandidos, D.A.; Tsatsakis, A.M.; Kouretas, D. Polyphenolic composition of grape stem extracts affects antioxidant activity in endothelial and muscle cells. *Mol. Med. Rep.* **2015**, *12*, 5846-5856, doi:10.3892/mmr.2015.4216.
8. Averilla, J.N.; Oh, J.; Kim, H.J.; Kim, J.S.; Kim, J.S. Potential health benefits of phenolic compounds in grape processing by-products. *Food Science and Biotechnology* **2019**, *28*, 1607-1615, doi:10.1007/s10068-019-00628-2.
9. Nieto, J.A.; Jaime, L.; Arranz, E.; Reglero, G.; Santoyo, S. Winemaking by-products as anti-inflammatory food ingredients. *Food Agric. Immunol.* **2017**, *28*, 1507-1518, doi:10.1080/09540105.2017.1350832.
10. Veskokoukis, A.S.; Vassi, E.; Poulas, K.; Kokkinakis, M.; Asproдини, E.; Haroutounian, S.; Kouretas, D. Grape Stem Extracts From Three Native Greek Vine Varieties Exhibit Strong Antioxidant and Antimutagenic Properties. *Anticancer Res.* **2020**, *40*, 2025-2032, doi:10.21873/anticancer.14159.
11. Anastasiadi, M.; Pratsinis, H.; Kletsas, D.; Skaltsounis, A.L.; Haroutounian, S.A. Grape stem extracts: Polyphenolic content and assessment of their in vitro antioxidant properties. *Lwt-Food Sci. Technol.* **2012**, *48*, 316-322, doi:10.1016/j.lwt.2012.04.006.
12. Gonzalez-Centeno, M.R.; Jourdes, M.; Femenia, A.; Simal, S.; Rossello, C.; Teissedre, P.L. Proanthocyanidin Composition and Antioxidant Potential of the Stem Winemaking Byproducts from 10 Different Grape Varieties (*Vitis vinifera* L.). *J. Agric. Food Chem.* **2012**, *60*, 11850-11858, doi:10.1021/jf303047k.
13. Apostolou, A.; Stagos, D.; Galitsiou, E.; Spyrou, A.; Haroutounian, S.; Portesis, N.; Trizoglou, I.; Hayes, A.W.; Tsatsakis, A.M.; Kouretas, D. Assessment of polyphenolic content, antioxidant activity, protection against ROS-induced DNA damage and anticancer activity of *Vitis vinifera* stem extracts. *Food Chem. Toxicol.* **2013**, *61*, 60-68, doi:10.1016/j.fct.2013.01.029.

14. Dominguez-Perles, R.; Guedes, A.; Queiroz, M.; Silva, A.M.; Barros, A. Oxidative stress prevention and anti-apoptosis activity of grape (*Vitis vinifera* L.) stems in human keratinocytes. *Food Res. Int.* **2016**, *87*, 92-102, doi:10.1016/j.foodres.2016.06.030.
15. Cho, B.O.; Che, D.N.; Shin, J.Y.; Kang, H.J.; Il Jang, S. Ameliorative effects of fruit stem extract from Muscat Bailey A against chronic UV-induced skin damage in BALB/c mice. *Biomed. Pharmacother.* **2018**, *97*, 1680-1688, doi:10.1016/j.biopha.2017.12.003.
16. Del Pino-Garcia, R.; Rivero-Perez, M.D.; Gonzalez-SanJose, M.L.; Ortega-Heras, M.; Lomillo, J.G.; Muniz, P. Chemopreventive Potential of Powdered Red Wine Pomace Seasonings against Colorectal Cancer in HT-29 Cells. *J. Agric. Food Chem.* **2017**, *65*, 66-73, doi:10.1021/acs.jafc.6b04561.
17. Perde-Schrepler, M.; Chereches, G.; Brie, I.; Tatornir, C.; Postescu, I.D.; Soran, L.; Filip, A. Grape seed extract as photochemopreventive agent against UVB-induced skin cancer. *J. Photochem. Photobiol. B-Biol.* **2013**, *118*, 16-21, doi:10.1016/j.jphotobiol.2012.10.008.
18. Kantsadi, A.L.; Apostolou, A.; Theofanous, S.; Stravodimos, G.A.; Kyriakis, E.; Gorgogietas, V.A.; Chatzileontiadou, D.S.M.; Pegiou, K.; Skamnaki, V.T.; Stagos, D.; et al. Biochemical and biological assessment of the inhibitory potency of extracts from vinification byproducts of *Vitis vinifera* extracts against glycogen phosphorylase. *Food and Chemical Toxicology* **2014**, *67*, 35-43, doi:10.1016/j.fct.2014.01.055.
19. Poveda, J.M.; Loarce, L.; Alarcon, M.; Diaz-Maroto, M.C.; Alanon, M.E. Revalorization of winery by-products as source of natural preservatives obtained by means of green extraction techniques. *Ind. Crop. Prod.* **2018**, *112*, 617-625, doi:10.1016/j.indcrop.2017.12.063.
20. Ruiz-Moreno, M.J.; Raposo, R.; Cayuela, J.M.; Zafrilla, P.; Pineiro, Z.; Moreno-Rojas, J.M.; Mulero, J.; Puertas, B.; Giron, F.; Guerrero, R.F.; et al. Valorization of grape stems. *Ind. Crops Prod.* **2015**, *63*, 152-157, doi:10.1016/j.indcrop.2014.10.016.
21. Dias, C.; Dominguez-Perles, R.; Aires, A.; Teixeira, A.; Rosa, E.; Barros, A.; Saavedra, M.J. Phytochemistry and activity against digestive pathogens of grape (*Vitis vinifera* L.) stem's (poly)phenolic extracts. *Lwt-Food Sci. Technol.* **2015**, *61*, 25-32, doi:10.1016/j.lwt.2014.11.033.
22. Bogdan, C.; Pop, A.; Iurian, S.M.; Benedec, D.; Moldovan, M.L. Research Advances in the Use of Bioactive Compounds from *Vitis vinifera* By-Products in Oral Care. *Antioxidants* **2020**, *9*, doi:10.3390/antiox9060502.
23. Leal, C.; Santos, R.A.; Pinto, R.; Queiroz, M.; Rodrigues, M.; Saavedra, M.J.; Barros, A.; Gouvinhas, I. Recovery of bioactive compounds from white grape (*Vitis vinifera* L.) stems as potential antimicrobial agents for human health. *Saudi J. Biol. Sci.* **2020**, *27*, 1009-1015, doi:10.1016/j.sjbs.2020.02.013.
24. Leal, C.; Gouvinhas, I.; Santos, R.A.; Rosa, E.; Silva, A.M.; Saavedra, M.J.; Barros, A. Potential application of grape (*Vitis vinifera* L.) stem extracts in the cosmetic and pharmaceutical industries: Valorization of a by-product. *Ind. Crop. Prod.* **2020**, *154*, doi:10.1016/j.indcrop.2020.112675.
25. Gascon, S.; Jimenez-Moreno, N.; Jimenez, S.; Quero, J.; Rodriguez-Yoldi, M.J.; Ancin-Azpilicueta, C. Nutraceutical composition of three pine bark extracts and their antiproliferative effect on Caco-2 cells. *J. Funct. Foods* **2018**, *48*, 420-429, doi:10.1016/j.jff.2018.07.040.
26. Allaoui, A.; Gascon, S.; Benomar, S.; Quero, J.; Osada, J.; Nasri, M.; Rodriguez-Yoldi, M.J.; Boualga, A. Protein Hydrolysates from Fenugreek (*Trigonella foenum graecum*) as Nutraceutical Molecules in Colon Cancer Treatment. *Nutrients* **2019**, *11*, doi:ARTN 724 10.3390/nu11040724.
27. Marmol, I.; Jimenez-Moreno, N.; Ancin-Azpilicueta, C.; Osada, J.; Cerrada, E.; Rodriguez-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* **2020**, *9*, doi:10.3390/antiox9010017.
28. Sahpazidou, D.; Geromichalos, G.D.; Stagos, D.; Apostolou, A.; Haroutounian, S.A.; Tsatsakis, A.M.; Tzanakakis, G.N.; Hayes, W.; Kouretas, D. Anticarcinogenic activity of polyphenolic extracts from grape stems against breast, colon, renal and thyroid cancer cells. *Toxicol. Lett.* **2014**, *230*, 218-224, doi:10.1016/j.toxlet.2014.01.042.
 29. Sei-ichi, K.; Toda, K.; Matsumoto, K.; Ishihara, C.; Nonobe, S.; Matsunaga, C.; Gomi, Y.K.; Senga, S.; Kawaguchi, K.; Yamamoto, A.; et al. Isolation and characterization of a novel oligomeric proanthocyanidin with significant anti-cancer activities from grape stems (*Vitis vinifera*). *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 1-7, doi:10.1038/s41598-019-48603-5.
 30. Stagos, D.; Apostolou, A.; Poullos, E.; Kermeliotou, E.; Mpatzilioti, A.; Kreatsouli, K.; Koulocheri, S.D.; Haroutounian, S.A.; Kouretas, D. Antiangiogenic potential of grape stem extract through inhibition of vascular endothelial growth factor expression. *J. Physiol. Pharmacol.* **2014**, *65*, 843-852.
 31. Barros, A.; Girones-Vilaplana, A.; Teixeira, A.; Collado-Gonzalez, J.; Moreno, D.A.; Gil-Izquierdo, A.; Rosa, E.; Dominguez-Perles, R. Evaluation of grape (*Vitis vinifera* L.) stems from Portuguese varieties as a resource of (poly)phenolic compounds: A comparative study. *Food Res. Int.* **2014**, *65*, 375-384, doi:10.1016/j.foodres.2014.07.021.
 32. Brand-Williams, W.; Cuvelier, M.E.; Berset, C. Use of a free-radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Sci. Technol-Leb* **1995**, *28*, 25-30.
 33. Singleton, V.L.; Orthofer, R.; Lamuela-Raventos, R.M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. In *Oxidants and Antioxidants, Pt A*, Packer, L., Ed.; Methods in Enzymology; 1999; Volume 299, pp. 152-178.
 34. Chandra, S.; Khan, S.; Avula, B.; Lata, H.; Yang, M.H.; ElSohly, M.A.; Khan, I.A. Assessment of Total Phenolic and Flavonoid Content, Antioxidant Properties, and Yield of Aeroponically and Conventionally Grown Leafy Vegetables and Fruit Crops: A Comparative Study. *Evid-Based Compl. Alter. Medicine* **2014**, *2014*, doi:10.1155/2014/253875.
 35. García-Moreno, E.; Cerrada, E.; Bolsa, M.J.; A. Luquin; Laguna, M. Water-Soluble Phosphanes Derived from 1,3,5-Triaza-7-phosphaadamantane and Their Reactivity towards Gold(I) Complexes. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2013**, 2020-2030.
 36. Sanchez-de-Diego, C.; Marmol, I.; Perez, R.; Gascon, S.; Rodriguez-Yoldi, M.J.; Cerrada, E. The anticancer effect related to disturbances in redox balance on Caco-2 cells caused by an alkynyl gold(I) complex. *J. Inorg. Biochem.* **2017**, *166*, 108-121, doi:10.1016/j.jinorgbio.2016.11.009.
 37. Quero, J.; Marmol, I.; Cerrada, E.; Rodriguez-Yoldi, M.J. Insight into the potential application of polyphenol-rich dietary intervention in degenerative disease management. *Food Funct* **2020**, *11*, 2805-2825, doi:10.1039/d0fo00216j.
 38. Shrikhande, A.J. Wine by-products with health benefits. *Food Res. Int.* **2000**, *33*, 469-474, doi:10.1016/s0963-9969(00)00071-5.
 39. Spanou C., V.A.S., Stagos D., Liadaki K., Anastasiadi M., Harooutounian SA, Tsouka M., Tzanakouli E., and Kouretas. Effect of grape extracts on the in vitro activity of enzymes involved in oxidative stress regulation. *In Vivo* **2011**, *25*, 657-662.
 40. Lambert, C.; Richard, T.; Renouf, E.; Bisson, J.; Waffo-Teguo, P.; Bordenave, L.; Ollat, N.; Merillon, J.M.; Cluzet, S. Comparative Analyses of Stilbenoids in Canes of Major *Vitis vinifera* L. Cultivars. *J. Agric. Food Chem.* **2013**, *61*, 11392-11399, doi:10.1021/jf403716y.
 41. Rodriguez-Cabo, T.; Rodriguez, I.; Ramil, M.; Cela, R. Assessment of alcoholic distillates for the extraction of bioactive polyphenols from grapevine canes. *Ind. Crop. Prod.* **2018**, *111*, 99-106, doi:10.1016/j.indcrop.2017.10.011.
 42. Vergara, C.; von Baer, D.; Mardones, C.; Wilkens, A.; Wernekinck, K.; Damm, A.; Macke, S.; Gorena, T.; Winterhalter, P. Stilbene Levels in Grape Cane of Different Cultivars in

- Southern Chile: Determination by HPLC-DAD-MS/MS Method. *J. Agric. Food Chem.* **2012**, *60*, 929-933, doi:10.1021/jf204482c.
43. Jimenez S, G.S., Luquin A, Laguna M, Ancin-Azpilicueta C, Rodriguez Yoldi MJ Rosa canina extracts have antiproliferative and antioxidants effects on Caco-2 human colon cancer. *Plos One* **2016**, *11*, e0159136.
 44. Badisa, R.B.; Darling-Reed, S.F.; Joseph, P.; Cooperwood, J.S.; Latinwo, L.M.; Goodman, C.B. Selective Cytotoxic Activities of Two Novel Synthetic Drugs on Human Breast Carcinoma MCF-7 Cells. *Anticancer Res.* **2009**, *29*, 2993-2996.
 45. Oxenhandler, R.W.; McCune, R.; Subtelney, A.; Truelove, C.; Tyrer, H.W. Flow cytometric determination of estrogen-receptors in intact-cells. *Cancer Res.* **1984**, *44*, 2516-2523.
 46. 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* **2013**, *61*, 138-145, doi:10.1016/j.ymeth.2013.03.020.
 47. Bhatia M, M.K., Di Trapani G, Charoentong P, Shah F, King MM, Clarke FM, Tonissen KF. The thioredoxin system in breast cancer cell invasion and migration. *Redox Biol.* **2016**, *8*, 68-78.
 48. Roleira FMF, T.-d.-S.E., Varela SC, Costa T, Silva J, Garrido J, Borges F. Plant derives and dietary phenolic antioxidants. Anticancer properties. *Food Chem.* **2015**, *183*, 235-258.
 49. Leon-Gonzalez AJ, A.C., Schini-Kerth VB. . Pro-oxidant activity of polyphenols and its implication on cancer chemoprevention and chemotherapy. *Biochem. Pharmacol.* **2015**, *98*, 371-380.
 50. Hershko, A.; Ciechanover, A. The ubiquitin system. *Annu. Rev. Biochem.* **1998**, *67*, 425-479, doi:10.1146/annurev.biochem.67.1.425.
 51. Arlt A, B.I., , Schafmayer C, Tepel J, Mürköster SS, Brsch M, Roder C, Kalthoff H, Hampe J, Moyer MP, Folsch UR., Schafer H. . Increased proteasome subunit protein expression and proteasome activity in colon cancer relate to an enhanced activation of nuclear factor E2-related factor 2 (Nrf2). *Oncogene* **2009**, *28*, 3983-3996.
 52. Milacic, V.; Banerjee, S.; Landis-Piowar, K.R.; Sarkar, F.H.; Majumdar, A.P.; Dou, Q.P. Curcumin inhibits the proteasome activity in human colon cancer cells in vitro and in vivo. *Cancer Res* **2008**, *68*, 7283-7292, doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-6246.
 53. Orłowski, R.Z.; Kuhn, D.J. Proteasome inhibitors in cancer therapy: Lessons from the first decade. *Clin. Cancer Res.* **2008**, *14*, 1649-1657, doi:10.1158/1078-0432.ccr-07-2218.
 54. Kabe, Y.; Ando, K.; Hirao, S.; Yoshida, M.; Handa, H. Redox regulation of NF-kappa B activation: Distinct redox regulation between the cytoplasm and the nucleus. *Antiox. Redox Signal.* **2005**, *7*, 395-403, doi:10.1089/ars.2005.7.395.
 55. Michael J Morgan, Z.-G.L. Crosstalk of reactive oxygen species and NF-kB signaling. *Cell Res.* **2011**, *21*, 103-115.
 56. Rigobello, M.P.; Scutari, G.; Folda, A.; Bindoli, A. A. Gold complexes inhibit mitochondrial thioredoxin reductase: consequences on mitochondrial functions. *Biochem. Pharmacol.* **2004**, *67*, 689-696.
 57. Morgan, M.J.; Liu, Z.G. Crosstalk of reactive oxygen species and NF-kappa B signaling. *Cell Research* **2011**, *21*, 103-115, doi:10.1038/cr.2010.178.
 58. Aggarwal, V.; Tuli, H.S.; Varol, A.; Thakral, F.; Yerer, M.B.; Sak, K.; Varol, M.; Jain, A.; Khan, A.; Sethi, G. Role of Reactive Oxygen Species in Cancer Progression: Molecular Mechanisms and Recent Advancements. *Biomolecules* **2019**, *9*, doi:10.3390/biom9110735.
 59. Sambuy, Y.; Angelis, I.; Ranaldi, G.; Scarino, M.L.; Stamatii, A.; Zucco, F. The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics. *Cell Biol. Technol.* **2005**, *21*, 1-26, doi:10.1007/s10565-005-0085-6.

60. Van Breemen RB, L.Y. Caco-2 cell permeability assays to measure drug absorption. *Expert. Opin. Drug Matab. Toxicol* **2005**, *1*, 175-185.
61. Zeller, P.; Bricks, T.; Vidal, G.; Jacques, S.; Anton, P.M.; Leclerc, E. Multiparametric temporal analysis of the Caco-2/TC7 demonstrated functional and differentiated monolayers as early as 14 days of culture. *Eur. J. Pharma. Sci.* **2015**, *72*, 1-11, doi:10.1016/j.ejps.2015.02.013.
62. Shah, N.; Singh, R.; Sarangi, U.; Saxena, N.; Chaudhary, A.; Kaur, G.; Kaul, S.C.; Wadhwa, R. Combinations of Ashwagandha Leaf Extracts Protect Brain-Derived Cells against Oxidative Stress and Induce Differentiation. *Plos One* **2015**, *10*, doi:10.1371/journal.pone.0120554.
63. Alnuqaydan, A.M.; Lenehan, C.E.; Hughes, R.R.; Sanderson, B.J. Extracts from *Calendula officinalis* Offer in Vitro Protection Against H₂O₂ Induced Oxidative Stress Cell Killing of Human Skin Cells. *Phytother. Res.* **2015**, *29*, 120-124, doi:10.1002/ptr.5236.
64. Almer RS, M.S., Amin HK, Abdel Moneium AE. *Ziziphus spina-christi* fruit extracts suppresses oxidative stress and p38 MAPK expression in ulcerative colitis in rats via induction of Nrf2 and HO-1 expression. *Food Chem. Toxicol* **2018**, *115*, 49-62.
65. Kumar, V.L.; Pandey, A.; Verma, S.; Das, P. Protection afforded by methanol extract of *Calotropis procera* latex in experimental model of colitis is mediated through inhibition of oxidative stress and pro-inflammatory signaling. *Biomed. Pharmacother.* **2019**, *109*, 1602-1609, doi:10.1016/j.biopha.2018.10.187.

V. DISCUSIÓN

El cáncer es una de las principales causas de muerte a nivel mundial y, en concreto, el cáncer de colon se sitúa como el segundo que más fallecimientos acarrea. Estos datos se explican tanto por su elevada incidencia como por su baja supervivencia a 5 años [1]. Por tanto, es de extrema necesidad encontrar terapias más eficientes, que mejoren la eliminación de las células cancerosas a la vez que disminuyan los efectos secundarios.

El *oxaliplatino* es uno de los quimioterápicos de referencia frente al cáncer de colon. Por tanto, una de las estrategias para buscar nuevos fármacos es la síntesis de complejos metálicos que mantengan la efectividad de los complejos de platino a la hora de disminuir la masa tumoral, pero aumenten la selectividad frente a las células cancerosas para disminuir el daño sobre el tejido sano.

En este contexto surge la posibilidad de desarrollar complejos de oro, ya que estudios con el auranofin revelaron que es capaz de inhibir el crecimiento de células cancerosas [2,3]. La vía principal que se le otorga al auranofin como medio para ejercer su actividad citotóxica es la inhibición de la TrxR [4,5]. Esto se debe a que el oro es capaz de interactuar con el residuo de selenocisteína del centro activo, inhibiendo por tanto la actividad catalítica de la enzima.

Esta interacción directa del átomo de oro con el centro activo de la TrxR se vio reflejada en la determinación de la actividad TrxR con los complejos de oro(I) y oro(III) de las tres familias ensayadas: Complejos de oro(I) con ligandos ditiocarbamato derivados de la bencenosulfonamida (capítulo IV.3.), complejos de oro(I) con la fosfina PTA alquilada con cadenas largas hidrocarbonadas y polifluoradas (capítulo IV.2.) y los ditiolato-ditiocarbamato derivados de oro(III) (capítulo IV.1.). La actividad de la tioredoxina reductasa humana 1 recombinante se vio reducida cuando esta se incubaba con cualquiera de los complejos analizados. Por lo tanto, se confirma que esta proteína es una de las posibles dianas de los fármacos de oro y, en concreto, de las nuevas familias de complejos de oro(I) y oro(III) descritas.

Además, la focalización de la TrxR como diana intracelular, puede permitir una mayor selectividad frente a células cancerígenas. El estudio de la citotoxicidad de los complejos de oro(I) en modelos de células sanas, apoya esta teoría. Tanto los complejos del capítulo IV.2. como los complejos del capítulo IV.3. disminuían su efecto antiproliferativo en fibroblastos humanos con respecto a las células de cáncer de colon (Caco-2), obteniendo, en la mayoría de los casos, índices de selectividad superiores a 2. En cuanto a los complejos del capítulo IV.1. la citotoxicidad sobre Caco-2 diferenciadas (modelo de enterocito sano) también disminuyó con respecto a las Caco-2 indiferenciadas, obteniendo buenos índices de selectividad (superiores a 5) frente a células cancerosas.

Sin embargo, en la presente tesis se ha buscado el desarrollo de complejos que presenten una doble diana intracelular. De esta manera, se puede potenciar el efecto de los complejos de oro al actuar a través de dos vías diferentes, o se puede mantener la capacidad citotóxica en caso

de que una de las hipotéticas estrategias propuestas en la fase de síntesis no se vea traducida a nivel celular.

El segundo caso sería el de los complejos de oro(III) con ligandos ditiocarbamato y tiolato en la misma molécula, estudiados en el capítulo IV.1. Estudios previos con complejos similares, habían propuesto al proteasoma como una de las posibles dianas de los mismos, así como para los complejos de oro(III) en general [6-8]. Siguiendo esta idea, se sintetizaron nuevos complejos de oro(III) con ligandos ditiocarbamato que pudiesen dirigirse tanto a la TrxR como al proteasoma. Análisis teóricos sugerían la interacción de estos derivados y la TrxR y, aunque la determinación de la actividad de la TrxR1 recombinante resultó en una inhibición de la enzima en presencia de los complejos de oro, estudios de la actividad a nivel celular no mostraban cambios en la actividad TrxR total. Además, tampoco se observó el aumento de los niveles de ROS intracelulares que suele ir asociado a la inhibición de una enzima antioxidante como la TrxR.

Tras fallar la primera de las dianas propuestas para estos complejos se estudió la segunda de las estrategias diseñadas. La determinación de la actividad quimotripsina, asociada a la subunidad $\beta 5$ del proteasoma, demostró que esta actividad se veía disminuida en las células tratadas con los complejos de oro(III). Estos resultados, además, concuerdan con la detención del ciclo en fase G_1 observada por citometría de flujo en las células incubadas con estos derivados metálicos. El proteasoma juega un papel importante a la hora de regular la actividad de determinadas proteínas involucradas en el control del ciclo celular y en la apoptosis. La inhibición del proteasoma impediría la degradación de proteínas como p53 o p27, que a través de la interacción con el complejo ciclina E/Cdk2 controla la proliferación celular deteniendo el ciclo en fase G_1/G_0 . La inhibición del proteasoma también podría inhibir la translocación del NF- κ B al núcleo impidiendo la transcripción de proteínas oncogénicas. Todo esto finalmente lleva a la muerte por apoptosis con despolarización mitocondrial asociada.

En una segunda familia de complejos de oro, se propuso el uso de hipertermia para aumentar la actividad citotóxica de los compuestos como complemento a la inhibición de la TrxR. Para ello, en el capítulo IV.2. se sintetizaron complejos de oro(I) con ligandos PTA alquilados con cadenas hidrocarbonadas o perfluoradas. La determinación de la actividad de la TrxR1 humana recombinante sugirió la posibilidad de estos complejos de inhibir a la enzima, lo que concuerda con el aumento de los niveles de ROS observado en células Caco-2 tras 24 horas de incubación con los complejos metálicos. Además, se observó que el aumento de temperatura hasta los 40 °C durante la primera hora de tratamiento potenció la citotoxicidad de los complejos. La hipertermia no solo disminuye los valores de IC_{50} , sino que también aumenta la activación de p53 y de caspasas para inducir la parada del ciclo celular y la apoptosis. Estudios previos habían postulado la presencia de cadenas perfluoradas como un elemento importante a la hora de desarrollar complejos metálicos termoactivos [9,10]. Sin embargo, en el caso de los complejos de oro(I) con ligandos PTA los resultados obtenidos no permiten afirmar que la presencia de cadenas fluoradas mejoren la citotoxicidad o la termosensibilidad de los complejos.

Para finalizar con los complejos de oro, en el capítulo IV.3. se exploró la posibilidad de dirigir los derivados de oro contra la anhidrasa carbónica IX, una isoforma específica de células cancerígenas, como diana complementaria de la TrxR. Habida cuenta de que derivados de bencenosulfonamida por un lado y ditiocarbamatos por otro son capaces de inhibir diferentes isoformas de la enzima anhidrasa carbonica [11,12], se diseñaron ligandos del tipo ditiocarbamato derivados de la bencenosulfonamida y se procedió a su coordinación de centros de oro(I). Ensayos de inhibición con las enzimas humanas recombinantes AC-IX y TrxR sugirieron que estos nuevos complejos de oro(I) son capaces de inhibir estas dos enzimas, aumentando el poder citotóxico de estos complejos. La interacción con estas enzimas podría ser la responsable de aumentar los niveles de ROS en las células Caco-2 tras 24 horas de tratamiento con los complejos. En última instancia, este estrés oxidativo parece conducir a la expresión de genes como p53 que detiene el ciclo celular en fase G₁/G₀, así como a la alteración del potencial de membrana mitocondrial que acaba en la activación de la caspasa 3 y la apoptosis.

Por otro lado, el cáncer está estrechamente relacionado con procesos inflamatorios y de estrés oxidativo, por lo que el uso de compuestos con características antioxidantes y antiinflamatorias como los polifenoles puede ser una estrategia adecuada [13,14] y complementaria al uso de fármacos basados en metales. Por esta razón, en el capítulo IV.4. se estudiaron las posibilidades de un extracto de raspones rico en polifenoles a la hora de tratar y/o prevenir el cáncer de colon y de mama, además de buscar un reaprovechamiento de los residuos generados en la industria del vino.

En cuanto al tratamiento, la incubación de células Caco-2, MCF-7 y MDA-MB-231 con el extracto de raspones supone la inhibición de la proliferación celular debido al aumento de los niveles de ROS intracelulares. Este aumento del estrés oxidativo acaba causando un estrés celular que se traduce en la despolarización de la membrana mitocondrial y, en última instancia, la apoptosis. Aunque pasadas 72 horas los valores de IC₅₀ en células Caco-2 fueron muy superiores a los obtenidos para los modelos de cáncer de mama, la actuación del extracto de raspones sobre las primeras demostró ser más rápida que en células MCF-7 y MDA-MB-231.

Dado que en muchas ocasiones el cáncer comienza con mutaciones ocasionadas tras sufrir situaciones de estrés que pueden afectar al DNA, como el estrés oxidativo, se analizó la capacidad del extracto de raspones para proteger a la barrera intestinal frente a un estrés de este tipo. Tras inducir un estrés oxidativo en las células Caco-2 diferenciadas al añadir H₂O₂, se observó que aquellas células que habían sido previamente pre incubadas con el extracto de raspones eran capaces de revertir los niveles de H₂O₂ intracelulares a valores basales. Por lo tanto, un extracto de este tipo rico en polifenoles puede ser una buena opción para proteger a la barrera intestinal frente al daño oxidativo.

Como se puede observar por los resultados obtenidos, los extractos vegetales tienen una dualidad prooxidante (citotóxica) y antioxidante (protectora), en función de la concentración. Este hecho, tiene una gran importancia a la hora de enfrentarnos al manejo de una enfermedad relacionada con el estrés oxidativo como el cáncer.

Dado que el poder citotóxico de los polifenoles generalmente reside en mecanismos diferentes a los de los complejos metálicos, el uso combinado de ambos podría resultar en un incremento terapéutico. Además, los complejos metálicos, sobre todo los de oro, suelen tener características prooxidantes como se ha visto en los capítulos IV.2. y IV.3., mientras que los polifenoles a bajas concentraciones son antioxidantes. Por ello, es posible que la administración conjunta de los complejos de oro con los extractos vegetales permita que estos últimos reduzcan los efectos secundarios causados por los derivados metálicos. Diferentes estudios con el cisplatino y diferentes extractos de plantas ya han apoyado estas hipótesis [15,16]. Por todo ello, en el futuro, sería de gran interés estudiar el efecto sobre las células Caco-2 de la combinación del extracto de raspones con alguno de los nuevos complejos de oro sintetizados y analizados en esta tesis y examinar las posibles sinergias entre ellos. Siguiendo esta línea, en el grupo de investigación donde se ha desarrollado la presente tesis ya se ha analizado la sinergia entre extractos de la planta rosa canina y complejos metálicos de oro [17].

REFERENCIAS:

1. Global Health Estimates 2020: Deaths by cause, age, sex, by country and by region, 2000-2019. <https://www.who.int/data/gho/data/themes/mortality-and-global-health-estimates/ghe-leading-causes-of-death>. Available online: (accessed on February 10, 2022).
2. Gamberi, T.; Chiappetta, G.; Fiaschi, T.; Modesti, A.; Sorbi, F.; Magherini, F. Upgrade of an old drug: Auranofin in innovative cancer therapies to overcome drug resistance and to increase drug effectiveness. *Med Res Rev* **2022**, *42*, 1111-1146, doi:10.1002/med.21872.
3. Li, H.; Hu, J.; Wu, S.; Wang, L.; Cao, X.; Zhang, X.; Dai, B.; Cao, M.; Shao, R.; Zhang, R.; et al. Auranofin-mediated inhibition of PI3K/AKT/mTOR axis and anticancer activity in non-small cell lung cancer cells. *Oncotarget* **2016**, *7*, 3548-3558, doi:10.18632/oncotarget.6516.
4. Zhang, J.; Li, X.; Han, X.; Liu, R.; Fang, J. Targeting the Thioredoxin System for Cancer Therapy. *Trends Pharmacol Sci* **2017**, *38*, 794-808, doi:10.1016/j.tips.2017.06.001.
5. Zhang, X.; Selvaraju, K.; Saei, A.A.; D'Arcy, P.; Zubarev, R.A.; Arner, E.S.; Linder, S. Repurposing of auranofin: Thioredoxin reductase remains a primary target of the drug. *Biochimie* **2019**, *162*, 46-54, doi:10.1016/j.biochi.2019.03.015.
6. Cvek, B.; Dvorak, Z. Targeting of nuclear factor-kappaB and proteasome by dithiocarbamate complexes with metals. *Curr Pharm Des* **2007**, *13*, 3155-3167, doi:10.2174/138161207782110390.
7. 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*, 1649-1660, doi:10.1016/j.ccr.2009.01.032.
8. Buac, D.; Schmitt, S.; Ventro, G.; Kona, F.R.; Dou, Q.P. Dithiocarbamate-based coordination compounds as potent proteasome inhibitors in human cancer cells. *Mini-Rev Med Chem* **2012**, *12*, 1193-1201, doi:10.2174/138955712802762040.
9. Clavel, C.M.; Paunescu, E.; Nowak-Sliwinska, P.; Dyson, P.J. Thermoresponsive organometallic arene ruthenium complexes for tumour targeting. *Chem Sci* **2014**, *5*, 1097-1101, doi:10.1039/c3sc53185f.
10. Renfrew, A.K.; Scopelliti, R.; Dyson, P.J. Use of Perfluorinated Phosphines to Provide Thermomorphic Anticancer Complexes for Heat-Based Tumor Targeting. *Inorganic Chemistry* **2010**, *49*, 2239-2246, doi:10.1021/ic9020433.
11. Liu, J.; Liu, C.; Zhang, X.; Yu, L.; Gong, X.; Wang, P. Anticancer sulfonamide hybrids that inhibit bladder cancer cells growth and migration as tubulin polymerisation inhibitors. *J Enzyme Inhib Med Chem* **2019**, *34*, 1380-1387, doi:10.1080/14756366.2019.1639696.
12. Saglik, B.N.; Osmaniye, D.; Cevik, U.A.; Levent, S.; Cavusoglu, B.K.; Buyukemir, O.; Nezir, D.; Karaduman, A.B.; Ozkay, Y.; Koparal, A.S.; et al. Synthesis, characterization and carbonic anhydrase I and II inhibitory evaluation of new sulfonamide derivatives bearing dithiocarbamate. *Eur J Med Chem* **2020**, *198*, 112392, doi:10.1016/j.ejmech.2020.112392.
13. Reuter, S.; Gupta, S.C.; Chaturvedi, M.M.; Aggarwal, B.B. Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? *Free Radic Biol Med* **2010**, *49*, 1603-1616, doi:10.1016/j.freeradbiomed.2010.09.006.
14. Li, G.; Ding, K.; Qiao, Y.; Zhang, L.; Zheng, L.; Pan, T.; Zhang, L. Flavonoids Regulate Inflammation and Oxidative Stress in Cancer. *Molecules* **2020**, *25*, doi:10.3390/molecules25235628.
15. Pinmai, K.; Chunlaratthanabhorn, S.; Ngamkitidechakul, C.; Soonthornchareon, N.; Hahnvajjanawong, C. Synergistic growth inhibitory effects of *Phyllanthus emblica* and

- Terminalia bellerica extracts with conventional cytotoxic agents: doxorubicin and cisplatin against human hepatocellular carcinoma and lung cancer cells. *World J Gastroenterol* **2008**, *14*, 1491-1497, doi:10.3748/wjg.14.1491.
16. Karaboga Arslan, A.K.; Pasayeva, L.; Esen, M.A.; Tugay, O. Synergistic Growth Inhibitory Effects of Eryngium kotschy Extracts with Conventional Cytotoxic Agents: Cisplatin and Doxorubicin against Human Endometrium Cancer Cells. *Curr Pharm Biotechnol* **2022**, *23*, 740-748, doi:10.2174/1389201022666210826160307.
 17. Marmol, I.; Jimenez-Moreno, N.; Ancin-Azpilicueta, C.; Osada, J.; Cerrada, E.; Rodriguez-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 (Basel)* **2019**, *9*, doi:10.3390/antiox9010017.

VI. CONCLUSIONES

1. Se han descrito nuevos complejos de oro(I) y oro(III) que presentan efecto citotóxico, ya que son capaces de inhibir la proliferación de la línea celular Caco-2/TC7 de cáncer de colon, obteniendo valores de IC_{50} bajos (en el rango μM). Además, esta citotoxicidad se ve disminuida cuando los complejos se utilizan en fibroblastos o células Caco-2 diferenciadas, obteniendo índices de selectividad superiores a 2. En cuanto al tipo de muerte celular consecuencia de la citotoxicidad, las tres familias de complejos de oro estudiadas son capaces de inducir la muerte por apoptosis con parada en el ciclo celular y despolarización mitocondrial asociada.
2. Los complejos de oro(III) con ligandos ditiocarbamato son capaces de inhibir la actividad de la tioredoxina reductasa humana 1 recombinante. Sin embargo, a nivel celular la actividad tioredoxina reductasa no se ve comprometida, mientras que la actividad quimotripsina del proteasoma se reduce considerablemente tras el tratamiento con los complejos.
3. Los complejos de oro(I) con la fosfina 1,3,5-triaza-7-fosfaadamantano alquilada con cadenas largas ven su citotoxicidad aumentada cuando las células tratadas son sometidas a un leve aumento de temperatura (40 °C). Además, en algunas parejas de complejos, la presencia de cadenas polifluoradas mejora su efecto antiproliferativo en comparación con las cadenas homologas hidrocarbonadas. Estos complejos derivados de PTA alquilada, inhiben la actividad de la tioredoxina reductasa humana 1 recombinante.
4. Los complejos de oro(I) con ligandos ditiocarbamato derivados de bencenosulfonamida son capaces de inhibir tanto la tioredoxina reductasa humana 1 recombinante como la isoforma IX de la anhidrasa carbónica recombinante, mostrando de esta forma un comportamiento de derivados multidiana.
5. El extracto de raspones rico en polifenoles detiene la proliferación de células cancerígenas *in vitro*. Este extracto tiene efecto citotóxico sobre células Caco-2 y sobre células de cáncer de mama, sobre todo frente a la línea celular MDA-MB-231, carente de receptores de estrógenos, de progesterona y del factor de crecimiento epidérmico humano.
6. El extracto de raspones a concentraciones citotóxicas disminuye la actividad tioredoxina reductasa de las células Caco-2, además de incrementar los niveles de especies reactivas de oxígeno. Sin embargo, cuando el extracto se usa en células Caco-2 diferenciadas, es capaz de disminuir los niveles de especies reactivas de oxígeno, incluso después de haber sido inducidas a estrés oxidativo con H_2O_2 .

VI. CONCLUSIONS

1. New gold(I) and gold(III) complexes have been described and showed cytotoxic effect and inhibition of cell proliferation in Caco-2/TC7 cells, resulting in low IC₅₀ values (μM range). In addition, this cytotoxicity decreases when complexes are used against fibroblasts or Caco-2 differentiated cells, exhibiting selectivity indexes over 2. Regarding cell death resulting from cytotoxicity, the three gold derivatives families induce apoptosis with associated cell cycle arrest and mitochondrial depolarization.
2. Dithiocarbamate gold(III) complexes inhibit the activity of recombinant human thioredoxin reductase 1. However, thioredoxin reductase activity is not modified in treated cells, whereas chymotrypsin-like activity of proteasome is considerably reduced when cells are incubated with the gold derivatives.
3. Gold(I) derivatives bearing alkylated 1,3,5-Triaza-7-phosphaadamantane ligands with long chain, rise their cytotoxicity when treated cells undergo a mild increase in temperature (40 °C). In addition, some of these complexes enhance their antiproliferative effect with the presence of perfluorinated chains when compared with the homolog hydrocarbonated chains. These complexes inhibit the activity of recombinant human thioredoxin reductase 1.
4. Gold(I) complexes with sulfonamide-derived dithiocarbamate ligands inhibit both recombinant human thioredoxin reductase 1 and recombinant carbonic anhydrase IX.
5. Polyphenol-rich grape stem extract stops cancerous cells proliferation *in vitro*. This extract has cytotoxic effect against Caco-2 cells and breast cancer cells, mainly against MDA-MB-231, which lacks estrogen, progesterone and human epidermal growth factor receptors.
6. Cytotoxic concentrations of grape stem extract decrease thioredoxin reductase activity in Caco-2 cells. In addition, intracellular levels of reactive oxygen species are increased. However, when the extract is used in differentiated Caco-2 cells the levels of reactive oxygen species decrease, even after cells undergo H₂O₂-induced oxidative stress.

