



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza



Trabajo Fin de

Autor/es

Director/es

Facultad de Veterinaria

Mº JESUS RODIGREZ YOLDI Profesora titular del departamento de Fisiología de la Universidad de Zaragoza.

CERTIFICA

Que la presente memoria titulada " Ensayo de compuestos de oro en células cancerígenas" ha sido realizada en el Departamento de Fisiología de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza, bajo mi dirección, autorizando su presentación.

Zaragoza, 27 Noviembre 2015

Fdo.: Dra. Mº Jesus Rodrigez

INDICE

1. Resumen	1
2. Introducción	2
2.1.- El cáncer de colon	2
2.2.- Función terapéutica del oro	3
3. Objetivos del estudio	5
4. Metodología	6
4.1.- Estudios Farmacodinámicos: Cálculo de IC50	6
4.1.a.- Preparación del Medio de Cultivo	8
4.1.b.- Preparación y mantenimiento de la línea celular	10
4.1.c.- Separación de células/ Tripsinación	12
4.1.d.- Siembra de Células	16
4.1.e.- Tratamiento con compuestos de Oro	17
4.2.- Estudios toxicológicos: Apoptosis y Ciclo Celular	21
4.2.a.- Protocolo Apoptosis	23
4.2.b.- Protocolo Ciclo celular con Ioduro de Propidio	23
4.3.- Medida del estres oxidativo	24
4.3.a.- Protocolo ROS	25
5. Resultados y discusión	27
5.1.1.- Estudios farmacodinámicos: Estudios de IC50	28
5.1.1.a.- Apoptosis	33
5.1.1.b.- Ciclo Celular	42
5.1.2.- Ros	46
6. Conclusiones	48
7. Referencias Bibliográficas	50

Este TFM constituye una segunda parte del TFG realizado por la alumna Rebeca Monteagudo en Junio 2014 y a su vez esta basado en la tesis doctoral de la alumna Elena Garcia Moreno 2012.

1. Resumen.

A día de hoy solo en España se diagnostican 22.000 casos anuales de cáncer de colon, lo que representa aproximadamente el 12.7 % de los tumores en el sexo masculino y el 15 % de los femeninos, de los cuales un 54% no sobrevive más de 5 años. La incidencia en este país se puede considerar alta en ambos sexos y su tendencia es a aumentar. A lo largo de los años se ha estudiado el uso terapéutico de compuestos de oro frente al cancer, sin embargo, presentan graves efectos secundarios "in vivo". A causa de esto, el objetivo de este trabajo fue el estudio biológico de cuatro compuestos de oro con ligandos solubles en agua en células no diferenciadas. Para ello se realizaron ensayos de viabilidad celular (MTT) en células Caco -2, determinando el IC₅₀ de estos compuestos, el ciclo celular y apoptosis a través de citometrías de flujo, así como la medida del estrés oxidativo intracelular (ROS). Consecuencia de estos estudios se observó una viabilidad reducida con respecto al cisplastino, el incremento de la fase G1 en el ciclo celular así como un efecto mayormente antioxidante de los complejos.

Summary.

Nowadays, 22.000 yearly cases of colon cancer are diagnosed just in Spain what represents the 12.7% of male sex tumors aproximateadly and the 15% of female ones of which the 54% does not outlast more than 5 years. The incidence rate in this country can be considered high in both sexes and its tendency is to grow. All along the years, the therapeutical use of gold compounds facing cancer has been studied, however, they present severe secondary live effects. Because of that, the objective of this project was the biological study of four gold compounds wit soluble ligands in water in no differentiated cells. In order to do that, cellular viability test were made in cells Caco-2, determining the IC₅₀ of this compounds, the cellular cycle and apoptosis though flow cytometry besides the meadure of intracellular oxidative stress. As a consequence of these studies, a reduced viability was observed in relation to the ciplastine, the increasing of fase G1 in the cellular cycle besides a highly antioxidant effect of the complexes.

2. Introducción.

2.1. - El cáncer de colon.

El cáncer de colon, también llamado tumor maligno o neoplasia que procede de las células de la mucosa intestino grueso y de sus glándulas, está aumentando en incidencia en los países occidentales y desarrollados.

En España, en los varones es el tercero en frecuencia, detrás del cáncer de pulmón y próstata. En las mujeres es el segundo en frecuencia, detrás del de mama. Según datos de la SEOM, se calcula una incidencia de 32.240 pacientes al año en España, siendo responsable de 14.700 fallecimientos y una prevalencia a cinco años de 89.705 casos.

La mayoría de los casos se diagnostican entre los 65 y los 75 años, con un máximo a los 70, aunque se registran casos desde los 35-40 años. Los casos que aparecen a edades tempranas suelen tener una predisposición genética. Aproximadamente un 54 % de los pacientes que sufren un cáncer de colon en España sobreviven más de 5 años.

La cirugía suele ser el tratamiento más importante y el primero en llevarse a cabo en la mayoría de los tumores de colon, seguido de la quimioterapia cuyo objetivo es destruir, empleando una gran variedad de fármacos, las células que componen el tumor con el fin de lograr la reducción o desaparición de la enfermedad. Actualmente, se ha investigado que los anticuerpos monoclonales asociados a la quimioterapia mejoran los resultados frente a la quimioterapia sola, ya que estos actúan destruyendo las células tumorales, sin poseer prácticamente efecto sobre las células sanas, por lo que los efectos secundarios suelen ser bien tolerados.

Existen distintos tipos de anticuerpos monoclonales autorizados para su uso:

- Dirigidos contra el receptor del factor de crecimiento epidérmico (anti-EGFR)
- Dirigidos contra el factor de crecimiento del endotelio vascular (anti- VEGF). El mecanismo de acción de este tipo de fármacos es impedir o dificultar que se formen vasos sanguíneos que “alimenten” a las células tumorales.

- Dirigidos contra varias proteínas involucradas en el crecimiento tumoral. Es un inhibidor multiquinasa que inhibe varias quinasas involucradas en el crecimiento y progresión del tumor, angiogénesis, oncogénesis y microambiente tumoral, incluyendo VEGFR 1-3, KIT, RET, PDGFR y FGFR, que individual y colectivamente afectan al crecimiento del tumor, la formación del microambiente del estroma y progresión de la enfermedad.

2.2. - Función terapéutica del oro.

El oro, como metal precioso, siempre ha sido codiciado en cualquier época de la historia. Pero retrocediendo en el tiempo encontramos otra utilidad que nada tiene que ver con el puramente financiero o monetario, es su uso medicinal.

En el antiguo Egipto ya lo describen en el papiro de Ebers y unos siglos después en los escritos de Hipócrates. Aunque su uso comenzó a extenderse durante el siglo XIV como cura ante una gran variedad de dolencias: prurito palmar, elixir de la vida, asma, lepra, sífilis, epilepsia, esterilidad... no fue hasta finales del siglo XIX cuando se inició su uso racional en el tratamiento de la tuberculosis con el descubrimiento del médico **Robert Koch**, pues solo las sales aurosas, que contienen azufre, eran capaces de inhibir el crecimiento del bacilo tuberculoso en cultivos.

En aquel entonces se pensaba que la artritis reumatoide estaba relacionada con la tuberculosis, de ahí que el doctor Forestier comenzará a usar complejos de este tipo en los años 30 para su tratamiento. En la actualidad, el oro se sigue utilizando como tratamiento de segunda línea para el tratamiento de la artritis reumatoide y en el lupus discoide por su efecto antiinflamatorio.

Se ha demostrado que el Auranofin inhibe el crecimiento celular *in vitro* en una serie de diferentes tipos de células cancerosas. Actúa inhibiendo la actividad de la enzima mitocondrial tioredoxina reductasa. En algunos tipos de cáncer se encuentra sobreexpresada y este hecho se asocia con un peor pronóstico para el paciente.

Al inhibir esta enzima la permeabilidad de la membrana mitocondrial, ésta se altera y consecuentemente también el potencial de membrana. Este hecho induce la activación de la vía mitocondrial de la apoptosis. La actividad anticancerígena del

auranofin mostrada en varios tipos de células de cáncer ha llevado a la búsqueda de nuevos complejos d oro que puedan presentar una mayor citotoxicidad. De hecho se ha descubierto un elevado número de complejos que han mostrado actividad anticancerígena que en muchos casos supera en gran medida al cisplastino, uno de los fármacos más empleados en una gran variedad de tipos de cáncer.

Además de complejos del tipo tiolato similares al auranofin, durante los últimos años se han descrito una importante variedad de complejos tanto de oro (I) como de oro (III) con diferentes tipos de ligandos.

3. Objetivos del estudio.

En esta memoria nos hemos propuesto como **objetivo** principal el estudio biológico de complejos de oro (I) con ligandos alquino, además de las fosfinas solubles en agua PTA y PTA alquiladas que fueron preparadas por Rebeca Monteagudo para su TFG en Junio del 2014.

Estos complejos reúnen unas características en común:

- Tienen un coeficiente de reparto entre agua/n-octanol próximo a 0, lo cual indica que están cerca del balance óptimo entre lipofilicidad e hidrofiliicidad para facilitar la distribución del fármaco en el cuerpo a través de sangre y atravesar las membranas para actuar como anticancerígenos.
- Son estables en disolución en condiciones fisiológicas y a 37 °C, de modo que no indican ningún tipo de reacción lateral o descomposición.

Para su estudio biológico hemos realizado ensayos de viabilidad celular MTT en células Caco -2 (carcinoma de colon humano), determinando el IC₅₀ de estos compuestos, el ciclo celular y apoptosis a través de citometrías de flujo, así como la medida del estrés oxidativo intracelular (ROS).

4. Metodología.

ESTUDIOS BIOLÓGICOS

Los experimentos de citotoxicidad “*in vitro*” se realizaron en el Laboratorio de Fisiología Animal del Departamento de Farmacología y Fisiología de la facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza.

4.1.- Estudios Farmacodinámicos: Cálculo de IC₅₀

Todos los trabajos de manipulación realizados con cultivos celulares y la realización de los propios experimentos se hicieron en campana de flujo laminar vertical de clase II (Telstar AV-100), para proteger tanto al operador como a las propias células. En todo momento, se realizaron siguiendo el protocolo de trabajo existente, cuya secuencia de pasos se detalla a continuación:

- 1) Se enciende la luz ultravioleta, que tiene propiedades bactericidas y se deja actuar durante 30 minutos.
- 2) Seguidamente, se enciende el flujo de aire en posición máxima, se quita la tapa frontal, y se deja circular el aire, al menos durante 15 minutos, para que se estabilice el flujo.
- 3) Se limpia la zona interior de trabajo con alcohol 70%, como medida de asepsia.
- 4) Al empezar a trabajar, se apaga la luz UV para evitar dañar los ojos del operador y se enciende la luz blanca de la campana (no antes, para evitar que se acumule calor).

- 5) Se introduce poco a poco el material de trabajo dentro de la campana, limpiándolo previamente con alcohol 70%, evitando acumular mucha cantidad, ya que se puede obstaculizar el flujo de aire en el interior de la campana.
- 6) Es conveniente cerciorarse, de tener preparadas y colocadas en buena posición las papeleras para material de desecho, y posteriormente se enciende la bomba de vacío, verificando que el recipiente de recogida de líquidos no este lleno. Este recipiente contiene una solución de hipoclorito de sodio al 10%.
- 7) Antes de empezar a trabajar dentro de la campana, es imprescindible lavarse bien las manos con agua y jabón, y posteriormente con alcohol 70% o sterilium (solución desinfectante para la piel). Esta última acción, se debe repetir cada vez que se manipulaba algo fuera de la campana.
- 8) En todo momento se debe trabajar con cuidado dentro de la campana, sin hacer movimientos bruscos y sin acumular material innecesario, además no se debe hablar, ya que es una fuente de micoplasmas.
- 9) Solamente se utiliza material y medios propios, que deben estar todos marcados y especificados su uso, fecha preparación,... etc.
- 10) Al finalizar el trabajo, y después de retirar todo el material, se debe limpiar bien la superficie de trabajo con alcohol, limpiando igualmente (con alcohol) el conducto de absorción que lleva al erlenmeyer de filtración a vacío (kitasato). Si alguien va a trabajar en la campana en un corto periodo de tiempo, se deja el flujo de aire en posición media.

Además al realizar cualquier trabajo, se tienen en cuenta las siguientes normas de bioseguridad:

- Utilizar equipos de protección individual adecuados (guantes, mascarilla, gorro, calzas, gafas) en función del trabajo a realizar.
- Lavado de manos antes y después de cualquier manipulación.
- No tocarse el cuerpo mientras se está trabajando con material biológico.
- No comer, beber, fumar, ni llevar cosméticos en el área de manipulación.
- No pipetear nunca con la boca.

Para el crecimiento y mantenimiento de las líneas celulares utilizadas, se empleó una estufa de incubación (Haeraeus BB16) a una temperatura constante de 37°C, y una atmósfera humidificada con un 95 % de O₂ y un 5% de CO₂. En la bandeja de la parte inferior de la estufa, se pone aproximadamente 4 litros de agua destilada, a la cual se le añade un desinfectante (Bathcleanen Sigma) a la dosis de 0,16 mL/ litro agua para evitar posibles contaminaciones.

Para la eliminación de contaminantes potenciales del material utilizado en el cultivo celular: como botellas, instrumentos de vidrio o el agua utilizada en los medios, se deben tratar de forma rutinaria mediante autoclave. Además de los materiales indicados anteriormente, se utilizó también:

- Baño termostatzado.
- Material de plástico rígido estéril: tubos cónicos, placas de 96 pocillos, ...
- Pipetas estériles de diferentes tamaños y Pipetboy
- Microscopio de luz invertida Olympus CK2 para visualizar y examinar, en contraste de fases, el tapiz celular de las cajas de cultivo, y realizar el recuento de células.
- Cámara de Nebauer utilizada para el recuento de células.
- Centrífuga 5810R Eppendorf

4.1.a.- Preparación del Medio de Cultivo.

Cada tipo celular, requiere unas condiciones y unos medios de cultivo específicos. Para el mantenimiento habitual de la línea celular Caco-2 en el laboratorio, se utilizó el medio Modificado Dubelcco's Eagle (DMEM).

La composición del medio de crecimiento de las células, en mg/l es la siguiente: $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 264; $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 0,1; KCl 400; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 200; NaCl 6400; NaHCO_3 3700; $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 141; glucosa 4.5 g/l ; rojo fenol 15; hipoxantina 13,6; inositol 4; L-arginina 84; L-cistina 48; L-glutamina 584; glicina 30; L-histidina 42; L- isoleucina 105; L-leucina 105; L-lisina 146; L-metionina 30; L-fenilalanina 66; L-serina 42; L-treonina 95; L-valina 94; cloruro de colina 4; ácido fólico 4; nicotinamida 7,2; piridoxal 4; riboflavina 0,4; tiamina 4 (Gibco BRL).

Este medio es suplementado con:

- Solución de aminoácidos no esenciales (Gibco BRL) 1:100.
- Solución de penicilina-estreptomina (1000 U/mL de penicilina, 1000 $\mu\text{g/ml}$ de estreptomina, Gibco BRL) 1:100.
- Solución de anfotericina B (250 U/ml, Gibco) 1:100.
- Solución de L-Glutamina 200mM 100X (Gibco BRL): Si el medio ha sido preparado hace más de un mes, debe añadirse de nuevo ya que, la glutamina se degrada.

La preparación del medio que permita el crecimiento del cultivo celular se realizó dentro de la campana de flujo laminar, su composición se detalla a continuación:

➤ Medio DMEM 10X con glucosa	400mL
➤ Penicilina/Estreptomicina 100X	5mL
➤ Aminoácidos no esenciales (AANE) 10M:	5m
➤ L-Glutamina. 200mM 100X	10mL
➤ Anfotericina B	5 mL
➤ Suero fetal bovino (SFB)	100mL

Una vez preparado se conserva en frigorífico a 4°C hasta su uso. Para evitar un choque térmico sobre las células, antes de su utilización debe ser calentado a 37°C en un baño termostático.

4.1.b.- Preparación y mantenimiento de la línea celular

El mantenimiento de una línea celular estable, se realizó mediante congelación de la misma en Nitrógeno líquido. Para su utilización posterior se introduce en baño a 37°C, el tiempo necesario hasta su descongelación. Posteriormente, se toman 5 ml de medio de cultivo, se vierten en un tubo cónico y se añade el vial de células ya descongeladas. Se homogeneiza bien y se pasa esta mezcla a una caja de 25 cm para su crecimiento.

Para realizar el cambio del medio de cultivo, se sacan las cajas de la estufa de incubación, asegurando que el tapón este bien cerrado y se observan al microscopio para comprobar su crecimiento.



Figura 4.1.1. Cajas de cultivo en la estufa de incubación

Posteriormente se llevan a la campana de flujo laminar, donde se aspira el medio con una pipeta pasteur conectada a una bomba de vacío, teniendo cuidado de no aspirar las células, para lo cual se aspira en el ángulo opuesto al que estén las células. Se añade el medio de cultivo con pipeta, este debe estar a temperatura ambiente, además deben seguirse todas las reglas necesarias para que los procedimientos se realicen bajo una atmósfera estéril en campana de flujo laminar. Para cajas de 25 cm, se añaden 5 ml de medio y se cambia cada 2 ó 3 días. Una vez añadido el medio, se vuelve a colocar la caja en posición horizontal dentro de la estufa con el cuello hacia arriba y con el tapón ligeramente abierto para permitir la entrada de oxígeno, y evitar que las células mueran.



Figura 4.1.2. Campana de Flujo Laminar

4.1.c.- Separación de células/ Tripsinación

Cualquiera que sea la utilización de las células, la individualización se realiza sobre células en multiplicación, es decir, antes de la confluencia, cuando las células ocupan de 60 al 70% de la superficie de soporte de cultivo. Aproximadamente esta operación debe ser realizada 6-7 días tras la siembra (pero siempre previa observación al microscopio, para confirmar el crecimiento de las células). Para la obtención de pasajes de las células antes de alcanzar la confluencia, se utilizó el método de tripsinización, ya que nuestros cultivos son adherentes y es necesario despegarlos del recipiente para su manipulación. Se empleó Tripsina-EDTA (g/l): Tripsina 5, EDTA 2 y NaCl 8,5 (Gibco BRL) sin Ca^{+2} y Mg^{+2} . Si no se tripsiniza la monocapa, crecería hasta alcanzar cerca del 100% de confluencia (máxima capacidad de cubrimiento de superficie); pasado esta etapa, el crecimiento se detiene por inhibición por contacto y las células pueden comenzar a degenerar, despegarse y morir. No obstante, algunas variantes de células tumorales son capaces de “apilarse” y dar lugar a multicapas.

Tripsinización para una botella de 25 cm²:

Se lleva a temperatura ambiente el medio de cultivo y el PBS diluido (100 mL de PBS comercial en 400 mL de agua destilada), así como la mezcla de tripsina, EDTA y PBS (50 mL de agua destilada + 5.5 mL de PBS 10X + 7,7 mL de tripsina 10X + 7,7 mL de EDTA 10 Mm).



Figura 4..1.3. Botellas de 25 cm²

Procedimiento:

- 1) Se retira el medio de cultivo de la caja
- 2) Se añaden 5 mL de solución de PBS diluida para lavar las células, realizando movimientos ligeros de la caja para asegurar un lavado correcto de estas.
- 3) Se aspira el PBS. Se añade 2 mL de la solución de tripsina, EDTA y PBS precalentada a 37°C, cantidad suficiente para cubrir la superficie de la caja donde crecen las células. Tras añadir la solución, se incubaba la caja, bien cerrada, durante 10 minutos en la estufa.
- 4) Pasados los 10 minutos, se retira la caja de la estufa y con ligeros golpes se desprenden las células de la superficie. Se homogeneiza con una pipeta Pasteur, deslizando el líquido por la pared para desprender las células. Una vez bien lavada la pared, se homogeneiza el líquido que había quedado en el fondo (10-15 veces) con una pipeta, evitando que queden grumos o agregados celulares para facilitar así su conteo y una correcta siembra posterior.
- 5) Se cogen estas células en suspensión y se vierten en un tubo cónico estéril al que previamente se ha añadido 10ml de medio de cultivo.
- 6) Se centrifuga durante 5 minutos a 900g (ó 3900 rpm), a temperatura ambiente.
- 7) Una vez centrifugado, se aspira el sobrenadante del tubo cónico con movimientos circulares, teniendo cuidado de no aspirar las células que han quedado depositadas en el fondo.

- 8) Se añaden 10mL de medio de cultivo y se homogeneiza, evitando la formación de burbujas (quedan células en suspensión).
- 9) Por último, se determina la densidad celular para poder hacer la siembra posterior.

Determinación de la densidad celular

Se emplean diferentes técnicas: desde la relativamente simple cámara de conteo celular de la que existen numerosas variantes (entre ellas la cámara de Neubauer), hasta equipos automáticos de conteo celular como el "*Cell Counter*". En nuestro caso se utilizó una cámara de Neubauer, adaptada a un microscopio. Se trata de un portaobjetos con una depresión en el centro, en el fondo de la cual se ha marcado con la ayuda de un diamante una cuadrícula como la que se ve en la imagen.

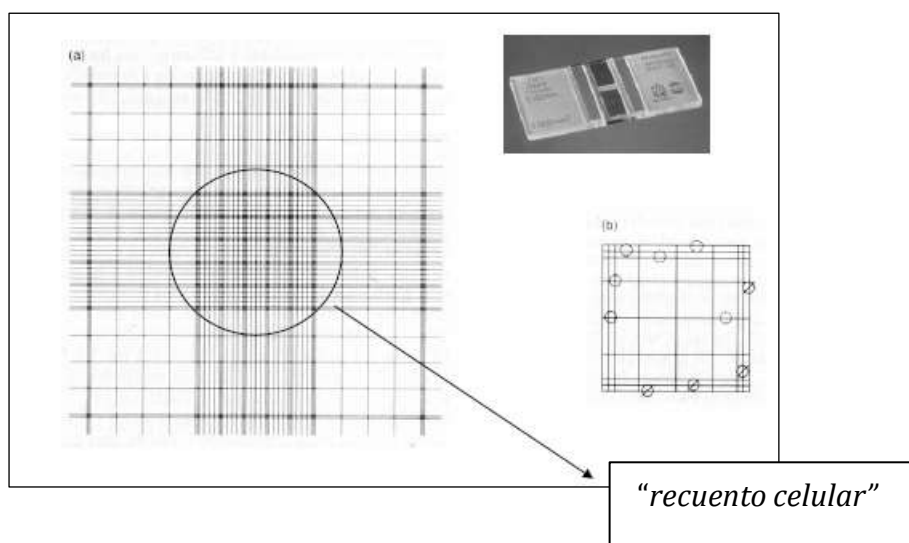


Figura 4.1.4. Cámara de Neubauer

Para ello, se toma 0.5 mL de la mezcla de células y se depositan en un tubo eppendorf (de esta forma se evita contaminar el resto) y se lleva fuera de la campana. De este tubo, se toman 20 μ L al que agregando 100 μ L de colorante Azul Trypan (dilución 1:6). Este colorante, permite diferenciar las células viables de las no viables, que se tiñen de azul al estar alterada la permeabilidad de su membrana plasmática.

Se toma una muestra de esta mezcla y se coloca en la cámara de Neubauer. Se deben contar las células existentes, en las dos cuadrículas pequeñas que hay en el centro, con ayuda de un microscopio de luz invertida.

Una vez contadas las células, se puede calcular cuantas hay por *mL*. Para ello se tiene en cuenta, que la profundidad de la cámara de Neubauer que es de 0.1mm (que es lo mismo que 0.1 μL). Si la media del conteo celular es X células, se debe multiplicar por 6 (que es el factor de dilución).

$$\text{N}^{\circ} \text{ células} / 0.1 \mu\text{L} = \text{Promedio del recuento celular} \bullet 6$$

Si en 0,1 μL hay X células, se calculaban cuantas células habrá por *mL*, es decir en 1000 μL , multiplicando el dato por 10^4 , así se obtendrá el número de células ($\text{n}^{\circ}\text{células}/\text{mL}$).

4.1.d.- Siembra de Células.

Una vez llevado a cabo la tripsinización de las células, se realiza su siembra en cajas de 96 multipocillos.

Para que la siembra de células sea eficaz, se recomienda sembrar 40.000 células por pocillo en las placas de 24 pocillos ($V_{\text{pocillo}} = 1 \text{ mL}$), calculando el volumen necesario a partir del conteo ($\text{n}^{\circ}\text{células} / \text{mL}$). En nuestro caso, como tenemos 96 pocillos de 100 μL cada uno, se deben sembrar 4.000 células por pocillo (para obtener la proporción recomendada), por tanto se necesitan un total de 384.000 células por placa. Así pues, se puede calcular el volumen necesario que habría que tomar para tener ese número de células. Se mezcla con 9.6 *mL* de medio de cultivo y se homogeneiza bien la mezcla.



Figura 4.1.5. Pipeta multicanal

Posteriormente, depositando 100 μ L de la mezcla en cada pocillo, se lleva la caja a la estufa de incubación, con el tapón ligeramente abierto para permitir la entrada de aire. A las 24 horas se observaba el aspecto de las células, considerando que de esta forma, todas las células viables tendrían tiempo suficiente para adherirse a la superficie de la caja.

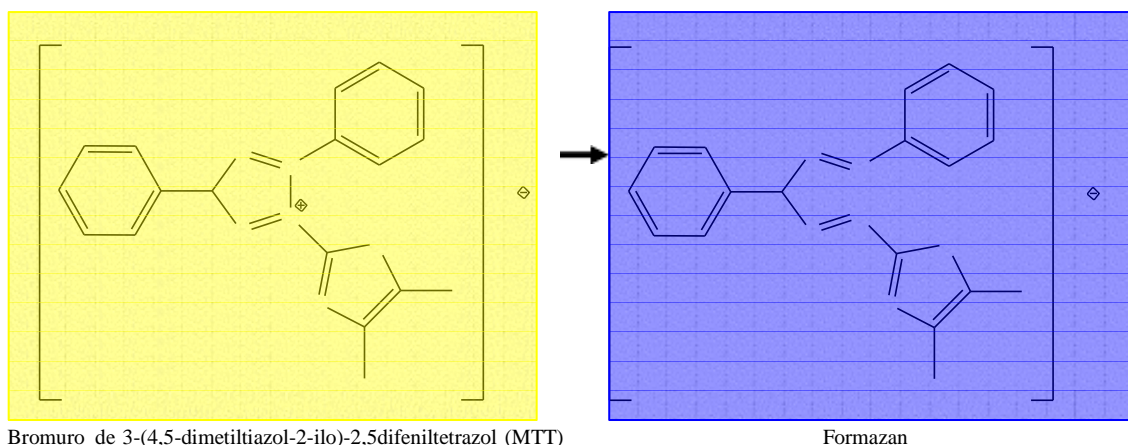


Figura 4.1.6. Estufa de Incubación

4.1.e.- Tratamiento con compuestos de Oro.

Después de la siembra de células y tras 24 horas en la incubadora a 37°C y en las condiciones adecuadas de humedad, las células se adhieren al fondo del compartimento. Estas células no han llegado a la confluencia, por tanto, son células indiferenciadas cancerosas. Se realizó el tratamiento con compuestos de oro, añadiendo a los distintos pocillos diferentes concentraciones de los mismos en el rango 0-20 μ M disueltos en medio de cultivo. Previamente se aspira el medio de cada pocillo, para asegurar el contacto directo de las células con los compuestos de oro.

Dejando las placas en la incubadora durante 72 horas, transcurrido este tiempo se procede a su cuantificación. Para ello se emplea un ensayo colorimétrico estándar de MTT (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5- difeniltetrazol), basado en la reducción metabólica del MTT, de color amarillo a formazán compuesto de color azul.



Esquema 4.1.1. Reducción metabólica de MTT a formazán

Este método es simple y se usa para determinar la viabilidad celular, dada por el número de células presentes en el cultivo capaces de medirse mediante la formación de un compuesto coloreado, debido a una reacción que tiene lugar en las mitocondrias de las células viables, el MTT es captado por las células y reducido por la enzima succínico deshidrogenasa mitocondrial, a su forma insoluble formazán.

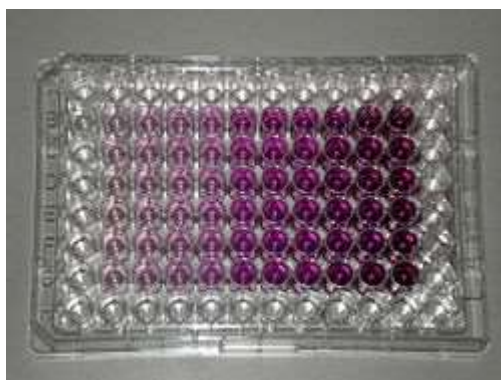


Figura 4.1.7. Ensayo colorimétrico de MTT en placas de 96 pocillos o “wells”.

La capacidad de las células para reducir al MTT, constituye un indicador de la integridad de las mitocondrias y su actividad funcional, es interpretada como una medida de la viabilidad celular. La determinación de la capacidad de las células de reducir el MTT a formazán, después de su exposición a un compuesto, permite obtener

información acerca de la toxicidad del compuesto que se evalúa. Este método ha sido muy utilizado para medir supervivencia y proliferación celular aunque también puede usarse para evaluar la citotoxicidad, de ciertos medicamentos y/o determinadas sustancias tóxicas. La cantidad de células vivas, es proporcional a la cantidad de formazán generado en el proceso, para cuantificarlo se utiliza dimetilsulfóxido (DMSO), que disuelve el formazán, generando, una disolución de color púrpura, cuya absorbancia puede cuantificarse mediante espectrofotometría.

Mediante estos estudios se determinó el valor de IC₅₀, medida de la efectividad de un determinado compuesto, generalmente una droga, en la inhibición de una función bioquímica o biológica. Este dato indica la cantidad de compuesto necesaria para inhibir un proceso a la mitad, en nuestro caso, se refiere a la concentración de compuesto necesaria, para reducir a la mitad la concentración de células responsables del cáncer estudiado. La metodología seguida se describe a continuación:

1. Reconstituir el vial de MTT -Thiazolyl Blue Tetrazol Bromide- (sigma ref.: M5655-100mg) con 20mL de PBS estéril (5mg/mL). Calentar en el baño a 37°C durante 5 minutos.
2. Añadir a cada pocillo 1/10 del volumen de medio de MTT (5mg/mL).
3. Agitar durante 5 minutos en el agitador/plataforma orbital.
4. Incubar a 37°C (incubador) durante 4 horas.
5. Eliminar el medio+MTT de las placas en la fregadera con un golpe seco.
6. Secar con papel secamanos.
7. Añadir el volumen inicial de cada pocillo de DMSO.
8. Resuspender cada pocillo con ayuda de una micropipeta.
9. Leer con el espectrofotómetro. (Absorbancia 560/670)

Figura 4.1.8. Espectrofotómetro de análisis colorimétrico.



A partir de las absorbancias de las disoluciones de DMSO, se puede estimar el número de células vivas, existentes en los diferentes compartimentos de placas. Observando las coloraciones obtenidas para cada una de las placas, se puede ver que las coloraciones más intensas, corresponden a los pocillos cuya concentración de producto es menor, es $0 \mu\text{M}$, indicando así mayor cantidad de células vivas, por el contrario aquellos pocillos cuya concentración de producto es mayor, $20 \mu\text{M}$, su coloración es menos intensa, por tanto, hay más células muertas.

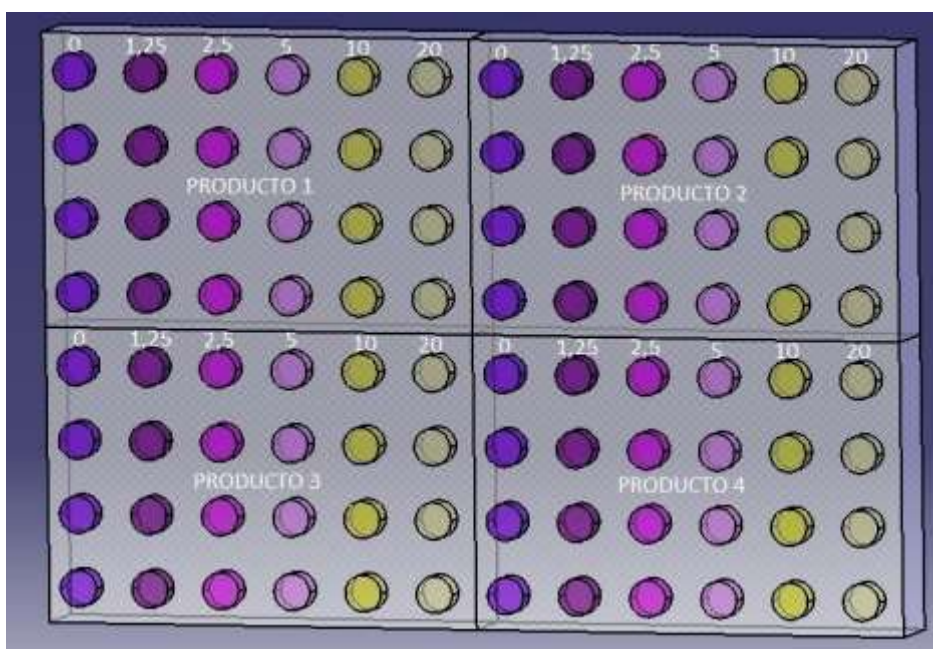


Figura 4.1.9. Distribución de placas tras adición de los complejos de oro(I).

Las absorbancias obtenidas para la concentración de $0 \mu\text{M}$, son utilizadas como control de referencia, este valor, es el máximo valor de absorbancia obtenido, a partir de este dato se puede calcular la absorbancia correspondiente a las células muertas para las distintas concentraciones de producto, A_{vn} (Absorbancia células muertas), restado a este valor de Absorbancia máxima (control-referencia $0 \mu\text{M}$), las distintas absorbancias obtenidas para cada concentración.

Una vez conocida la Absorbancia de células muertas (A_{vn}) se calcula la relación células vivas con respecto células muertas (A_v/A_{vn}). Y se representan los logaritmos de las distintas concentraciones ($\log[]$), frente a los logaritmos de las relaciones de absorbancia, de células vivas con respecto muertas ($\log[A_v/A_{vn}]$).

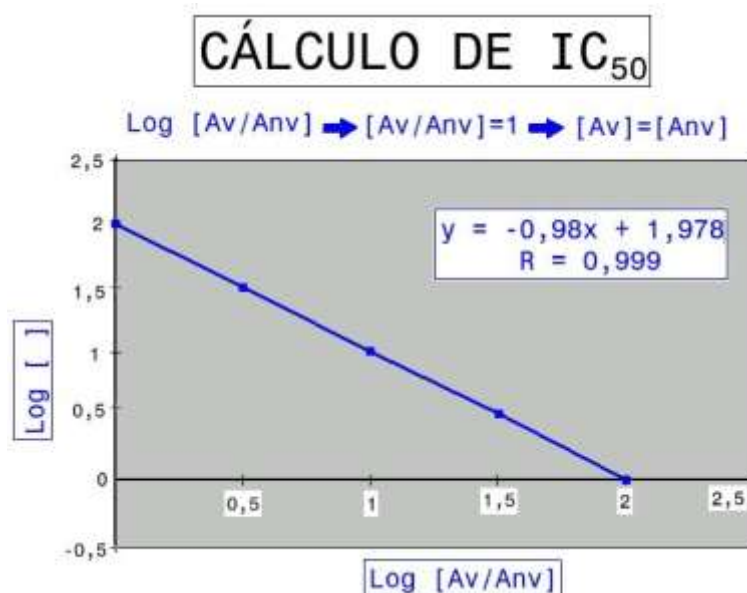


Figura 4.1.10. Cálculo de IC₅₀

La gráfica se ajusta a una línea recta de pendiente negativa ($y = -ax+b$), cuya ordenada en el origen (O.O.) nos permite calcular el valor de IC₅₀. Puesto que en este punto, la Absorbancia de células vivas es igual a la Absorbancia de células muertas, ($\text{Log } [A_v/A_{vn}] = 0$; $[A_v/A_{vn}]=1$; $[A_v]=[A_{vn}]$), la concentración en este punto será el IC₅₀.

Para tener datos fiables de IC₅₀, esta prueba se llevó a cabo por cuadruplicado para cada una de las concentraciones, como muestra la *Figura*

y analizando 4 productos por placa. Además estos análisis se realizaron tres veces para cada compuesto.

4.2- Estudios toxicológicos: Apoptosis y Ciclo Celular.

Los experimentos de toxicidad “*in vitro*” de Apoptosis y Ciclo Celular mediante la técnica de Citometría de Flujo (CMF), se realizaron en la Unidad de Separación Celular y Citometría, (CIBA del Hospital Clínico Universitario “Lozano Blesa” de Zaragoza, proporcionando dicha unidad: el asesoramiento en el diseño de los experimentos, formación en el manejo de los equipos y apoyo en el análisis de los resultados obtenidos.

La preparación del material para la Citometría de Flujo, consiste en conseguir dispersados celulares, en los que se aísla los núcleos, mediante destrucción del citoplasma con pepsina o detergentes. Los núcleos son marcados con fluorocromos, que se unen estequiométricamente con los ácidos nucleicos, por lo que la emisión de fluorescencia, es directamente proporcional a la cantidad de ADN nuclear.

Los fluorocromos más frecuentemente usados son: Ioduro de Propidio, Bromuro de Etidio y DAPI. Estos tienen afección tanto por el ARN como por el ADN, por lo que es necesario eliminar las cadenas de ARN. Esto se consigue, incubando la suspensión celular con ARNasa, antes de la tinción con el fluorocromo.

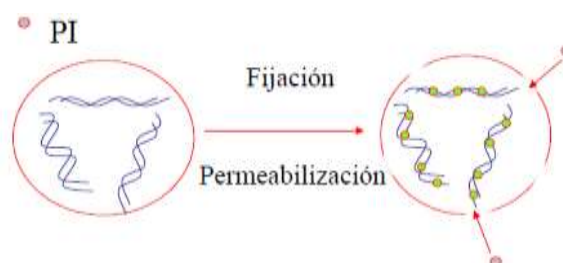


Figura 4.2.1. Unión de Ioduro de Propidio a ADN

Cuando la célula se muere, se abren poros en la membrana, lo que permite la entrada de colorantes que se unen al ADN; estos colorantes, serían incapaces de atravesar la membrana intacta. El protocolo seguido en el Hospital Clínico, utiliza Ioduro de Propidio y se basa en la técnica de Vindelov.

El tratamiento realizado a las células Caco-2 para el clon TC7, es el mismo procedimiento, que el realizado en los estudios farmacodinámicos de citotoxicidad mediante la técnica de MTT, pero en esta ocasión, las células son sembradas, en botellas de 75cm², en vez de en placas, y tras 24h de incubación, son tratadas con los compuestos de oro, añadiéndolos en concentración de 20μM, se dejan actuar durante 48h en la incubadora y posteriormente, se realiza su cuantificación mediante apoptosis o ciclo celular utilizando la técnica de citometría de flujo.

4.2.a.- Protocolo Apoptosis.

El protocolo a seguir en la preparación de las células, una vez tratadas con el complejo de oro, para medir su apoptosis es el siguiente:

1. Preparación del tampón AnexinaV: Hepes 10mM / NaOH (pH 7.4), NaCl 140mM, CaCl₂ 2.5mM.
2. Previamente debe prepararse un control negativo con células no tratadas, que se utiliza para definir el nivel basal de células vivas, necrosis y apoptosis.
3. Centrifugar y recoger las células, después lavarlas con PBS atemperado (tampon salino fosfatado).
4. Resuspender las células en buffer y AnexinaV preparado en concentración 1×10^6 cel/mL.
5. Añadir 5µL AnexinaV-FITC y 5µL de Yoduro de Propidio por cada 100µL de suspensión celular.
6. Incubar las células durante 15min a temperatura ambiente (25°C) y en oscuridad.
7. Tras el periodo de incubación añadir 400µL de tampón AnexinaV. Analizar en citómetro de flujo tras una hora.

4.2.b- Protocolo Ciclo celular con Ioduro de Propidio.

El protocolo a seguir en la preparación de las células, una vez tratadas con el complejo de oro, para determinar su ciclo celular viene detallado a continuación:

1. Partir de 10^6 células resuspendidas en 200µL de PBS.
2. Añadir poco a poco 1ml de Etanol 70 % frío, mezclando continuamente en el vortex.
3. Preferiblemente, dejar 24 horas incubando en nevera. La incubación se puede realizar en 30min. aunque la calidad de los resultados es inferior.

4. Las células pueden guardarse una semana en este paso.
5. Centrifugar a 2000rpm durante 5 min. y eliminar el sobrenadante.
¡Cuidado! Con el etanol el pellet es menos estable.
6. Añadir 1mL de PBS y centrifugar a 2000rpm durante 5 min. Descartar el sobrenadante.
7. Añadir 1ml de tampón de marcaje* e incubar 30 min. a temperatura ambiente en oscuridad.

**Tampón de marcaje*: PBS 1x; Ioduro de propidio 50 μ gr/mL; ARNsa A 100 μ gr/mL

4.3. Medida del estrés oxidativo.

El estrés oxidativo se podría definir como la perturbación grave en el equilibrio entre oxidantes y antioxidantes en favor de los primeros, y que por lo tanto conduce a un daño potencial a las células y órganos.

Las especies reactivas de oxígeno o ROS (reactive oxygen species), son compuestos que se producen durante el proceso de respiración aeróbica en la mitocondria como parte de la reducción del oxígeno. Su gran reactividad se debe a que poseen electrones desapareados que les hace reaccionar con otras moléculas orgánicas en procesos de óxido-reducción.

El daño oxidativo se produce cuando ocurre un desequilibrio entre la producción y degradación de las ROS. Estas moléculas son sumamente reactivas e intervienen en la fisiopatología de la muerte celular.

El diacetato de diclorodihidrofluoresceína (DCFH-DA) es una sonda fluorescente específica para H₂O₂, la diclorodihidrofluoresceína (DCFH) es oxidada por el H₂O₂ intracelular en diclorofluoresceína (DCF) que se une al ADN y emite una fluorescencia verde.

4.3.a. - Protocolo ROS.

El protocolo a seguir en la preparación de las células, una vez tratadas con el complejo de oro, para determinar el ROS viene detallado a continuación:

Preparativos previos:

- Solución de Diacetato-diclorurofluoresceína (2mg/ml): pesar 3 mg y disolverlos en 1.5 mL de metanol. Conservar a -80°C, protegido de la luz.
- Solución de Diacetato- diclorurofluoresceína de trabajo: Hacer una dilución 0.31/25 con PBS. Se prepara en el momento de su uso.

Ensayo:

1. Sembrar dos placas de 96 pocillos durante 24 horas
2. Añadir compuestos e incubar las células con 100 µl de medio de cultivo sin SFB durante 80 - 90 minutos
3. Aspirar medio y lavar con PBS
4. Añadir el DCFH-DA 2 mg/ml de metanol (100 µl DCFH-DA en 20 ml de PBS)
5. Incubar las células con DCFH-DA (100 µl) durante 20 minutos a 37°C.
No utilizar luz.
6. Aspirar medio y lavar con PBS, volver a echar PBS menos en el control negativo que añadimos H₂O₂. (325 µl de H₂O₂ en 13 ml de PBS)
(La H₂O₂ añadirla en el mismo momento de realizar la medición, para que el valor a tiempo 0 sea real. Hacer un mínimo de 2 mediciones con un intervalo de 20 minutos).
7. Se incuba la placa en el lector a 37°C, y se monotoriza la formación del derivado fluorescente de DCF-DA y se van haciendo medidas con 20 minutos de diferencia.

La producción de ROS se expresa en unidades arbitrarias de fluorescencia, expresadas como porcentaje respecto al control (y restando a cada muestra su fluorescencia a tiempo 0).

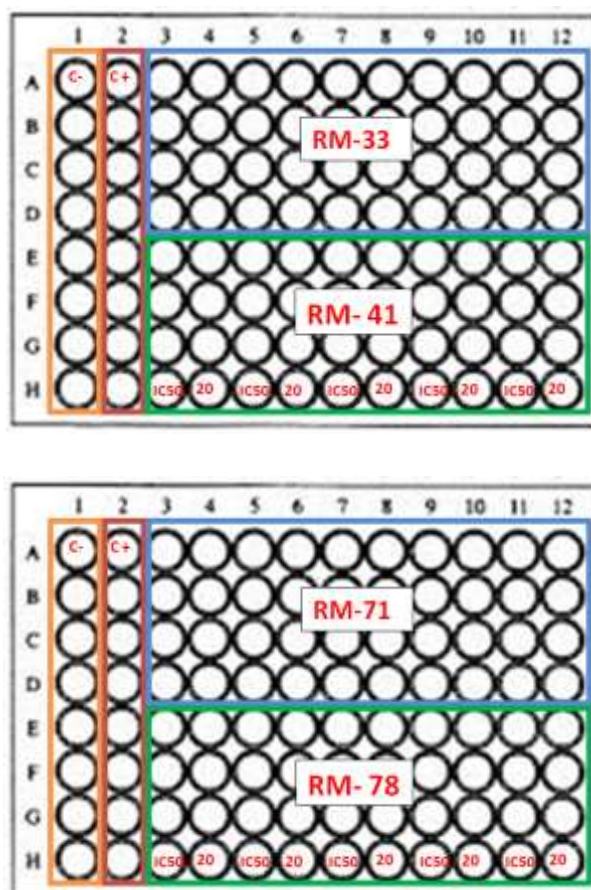


Figura 4.3.1. Placas Ros



Figura 4.3.2. Medidor de fluorescencia

5. Resultados y discusión.

En este trabajo se realizan los siguientes estudios:

1. *Estudios farmacodinámicos*: selección de los productos de mayor interés, definir su actividad y perfil, establecimiento el rango de dosis “*in vitro*”, mediante ensayos de IC50.
2. *Estudios toxicológicos*: ensayos de toxicidad “*in vitro*” mediante estudio de Apoptosis y Ciclo celular.

ESTUDIOS “*IN VITRO*”.

En este apartado, se describen los resultados obtenidos en el estudio “*in vitro*”: Farmacodinámico y Toxicológico, en cultivos celulares con diversos fármacos, basados en compuestos de oro(I), descritos en inicialmente en este trabajo. Se ha evaluado su actividad biológica frente a una línea celular de adenocarcinoma de colon humano denominada Caco-2. Todos los experimentos “*in vitro*” se realizaron en el Laboratorio de Fisiología Animal en el Departamento de Farmacología y Fisiología de la facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza.

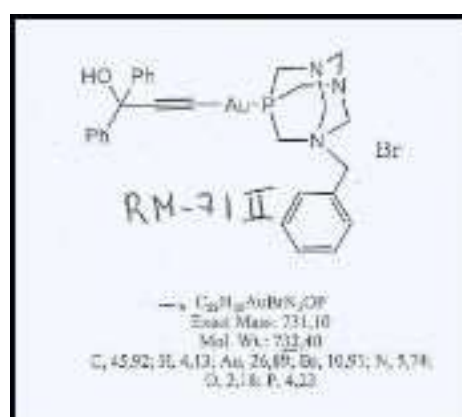
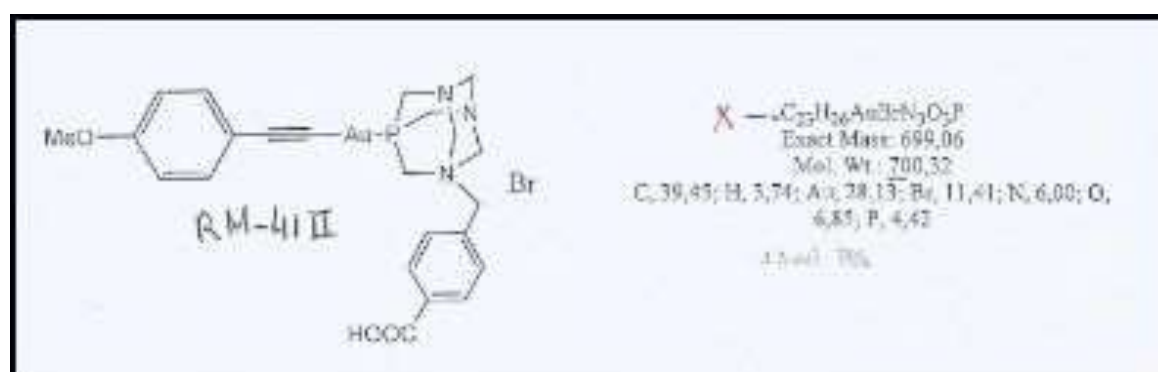
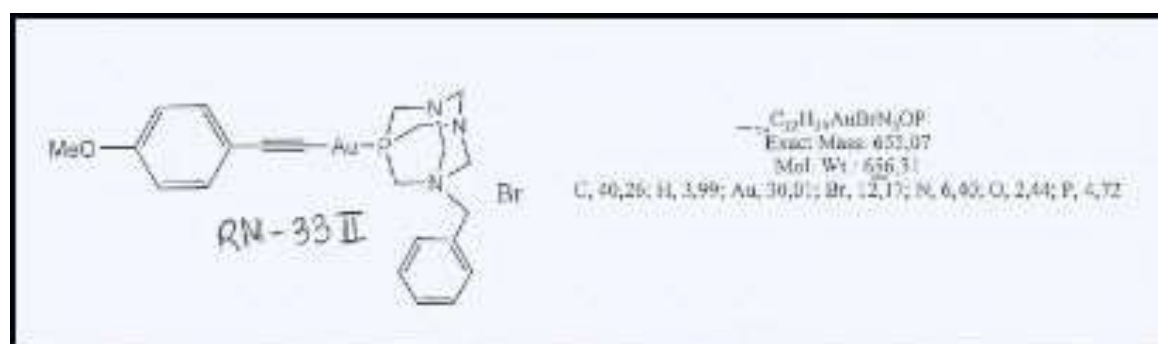
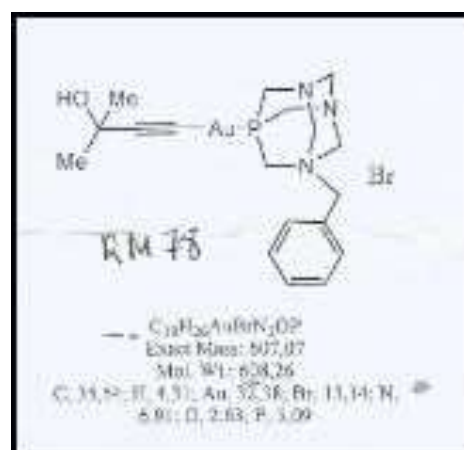
La línea celular Caco-2 fue establecida por Fogh en 1974 a partir de un adenocarcinoma de colon humano. Esta línea, es la única capaz en desarrollar una diferenciación espontánea completa de tipo enterocitario^{1, 2, 3}.

Aunque todas las células Caco-2 son capaces de diferenciarse, esta línea celular mostró ser heterogénea. Así, los diferentes clones de células que fueron aislados en distintos laboratorios, mostraron diferentes características morfológicas, bioquímicas y electrofisiológicas⁵.

Los clones utilizados en este estudio fueron PD7 y TC7, ambos clasificados como de bajo consumo en glucosa y funcionalmente iguales. Sin embargo, se diferencian en su origen, las células PD7 proceden de pasajes tempranos (30-40) y son más heterogéneas, por el contrario, las células TC7 tienen su origen en pasajes tardíos (140-150), hecho que se refleja en su estabilidad y homogeneidad. Estas diferencias entre ambos clones, nos permitieron referenciar nuestros estudios asemejándose a organismos vivos jóvenes en el caso de las células PD7, y adultos para las TC7.

5.1.1.- Estudios farmacodinámicos:

Estudios de IC_{50} . Se han llevado a cabo estudios biológicos, de algunos de los compuestos de oro sintetizados en otro TFM, evaluando su actividad biológica “*in vitro*” frente a células de cáncer de colon. Los derivados elegidos para llevar a cabo dichos estudios, son los complejos de oro(I) (*Tabla 5.1.1*).



Mediante estos estudios se determinó el valor de IC₅₀ (μM), medida de la efectividad de los compuestos, en la inhibición de una función bioquímica o biológica. Este dato nos proporciona información sobre la cantidad de compuesto necesaria para reducir, en un 50%, el crecimiento celular “*in vitro*”, y se utiliza como patrón de citotoxicidad de células en cultivo.

En general, se busca compuestos que presenten valores bajos de IC₅₀ (μM), ya que cuanto menor sea dicho valor, menor será la dosis necesaria para conseguir reducir a la mitad, la cantidad de un determinado tipo de células cancerígenas. Y por tanto, al ser menor la concentración de la droga, cabe suponer que menores serán los efectos secundarios esperados.

Las líneas celulares que se experimentaron, fueron de carcinoma de colon Caco-2, con dos cepas diferentes PD7 y TC7, para todos los productos citados anteriormente.

Como drogas de referencia hemos elegido un complejo de oro, auranofin, que es un fármaco empleado en el tratamiento de la artritis reumatoide⁴, y que ha mostrado actividad anticancerígena “*in vitro*” en una gran variedad de tipos de cáncer.⁵

El otro derivado elegido es el cisplatino, que siempre se suele elegir como droga modelo, y además porque es uno de los agentes anticancerígenos más efectivos para tratar diversos tipos de cáncer, incluido el de colon.⁶ De hecho, en el tratamiento de quimioterapia de cáncer de colon, se emplean derivados de platino en combinación con otras drogas^{7,8}, tales como 5-fluoracilo y leucovorin. (*Figura 5.1.1.1*). Normalmente, se recomienda este tipo de quimioterapia acompañada de radioterapia antes de una intervención quirúrgica, cuando el paciente está en fase I, II⁹ (antes de que se propague por otras partes del cuerpo), y se mantiene a posterior, para evitar recurrencias.

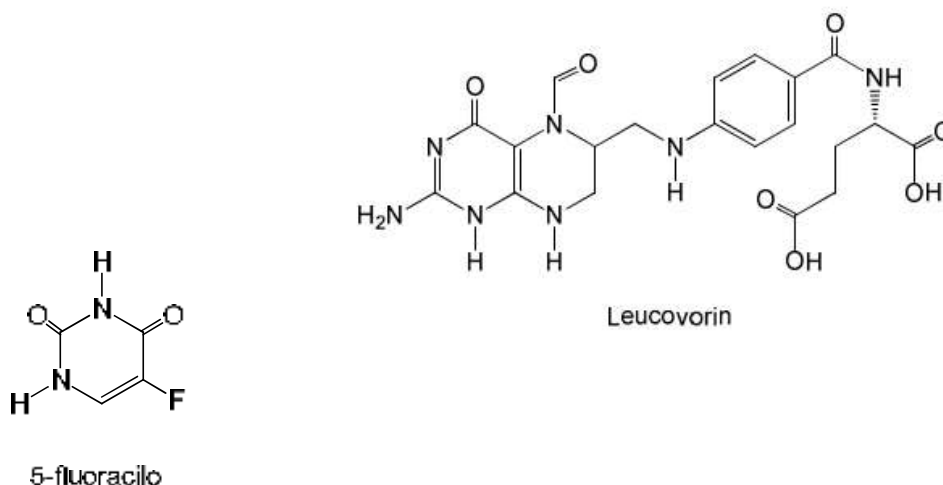


Figura 5.1.1.2. Tratamiento de quimioterapia contra cáncer de colon.

Como ya se explica detalladamente en la parte experimental biológica, vamos a utilizar un método simple para determinar la viabilidad celular, y poder calcular así el IC₅₀ (μM) de nuestros productos en la línea celular testada. Para ello se emplea un ensayo colorimétrico estándar de MTT (Bromuro de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol), basado en la reducción metabólica del MTT, de color amarillo a formazán compuesto de color azul. De esta forma se determina el número de células presentes en el cultivo celular, que son capaces de medirse mediante la formación de este compuesto coloreado, debido a la reacción que tiene lugar en las mitocondrias de las células viables, el MTT es captado por las células y reducido por la enzima succínico deshidrogenasa mitocondrial, a su forma insoluble formazán. Así, a partir de las absorbancias correspondientes, se puede estimar el número de células vivas, existentes en los diferentes compartimentos de placas.

En la *Tabla 5.1.1.2* se muestran los resultados citotóxicos de IC₅₀ (μM), para los complejos de oro(I), obtenidos para las líneas celulares PD7 y TC7 de Caco-2, es decir su potencia inhibitoria en el crecimiento celular.

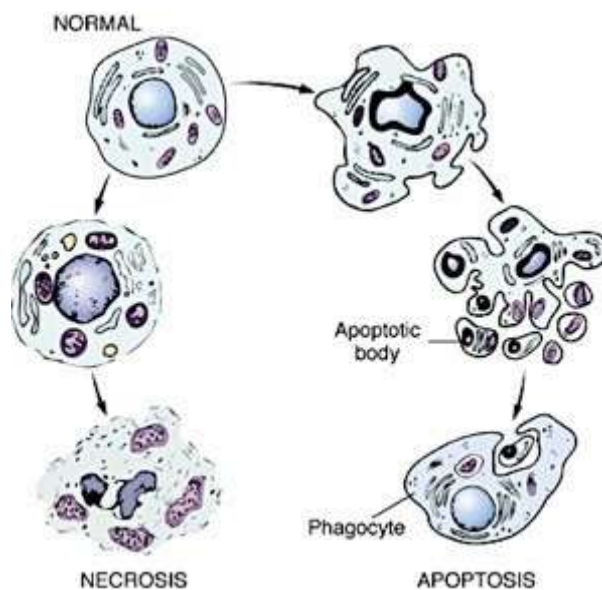
COMPLEJOS	PD7	TC
	IC ₅₀ (μM)	IC ₅₀ (μM)
C ₂₂ H ₂₆ AuBrN ₃ OP (RM-33)	1.92 ± 0.26	2.47 ± 0.97
C ₂₃ H ₂₆ AuBrN ₃ O ₃ P (RM-41)	9.41 ± 6.09	4.05 ± 0.77
C ₂₈ H ₃₀ AuBrN ₃ OP (RM-71)	1.96 ± 0.88	2.30 ± 1.46
C ₁₈ H ₂₆ AuBrN ₃ OP (RM-78)	4.47 ± 0.99	1.73 ± 1.05
Auranofin	1.8 ± 0.1	2.1 ± 0.4
Cisplatino	37.24 ± 5.15	45.6 ± 8.08

Tabla 5.1.1.3. Valores de IC₅₀ obtenidos para complejos de oro(I).

Como se puede observar en la tabla se obtienen valores del orden de 2-5μM para las células PD7, en la mayoría de los casos, excepto en el complejo RM-41, que muestra un valor mucho más elevado (9μM). En la cepa TC7 hay una mayor uniformidad en los valores encontrados, ya que se observan ejemplos con IC₅₀ muy similar entre 1-2μM, para los complejos RM-33, RM71 y RM-78, mientras que para para RM-41 se obtiene un valor de IC₅₀ mas elevadoo 4μM. Para comparar estos valores, se estudio también la citotoxicidad del auranofin y cisplatino en este tipo de células cancerosas, obteniéndose valores de IC₅₀ (μM) = 1.83 ± 0.10 para PD7 y 2.08 ± 0.42 para TC7 en auranofin y IC₅₀ (μM) = 37.24 ± 5.15 en PD7 y 45.6 ± 8.08 y TC7 para Cisplatino. Tal y como puede observarse los valores obtenidos para estos productos, son muy parecidos a los obtenidos para el auranofin en este tipo de células, pero muy por debajo de los obtenidos para el cisplatino, lo cual indica que pueden ser buenos anticancerígenos, ya que inhiben eficazmente el crecimiento celular, incluso mucho mejor que el cisplatino.

5.1.1.a.- Apoptosis.

La Necrosis se define como un fenómeno degenerativo, producido por un daño repentino y severo. A diferencia de la apoptosis, la necrosis es una forma de muerte celular que resulta de una lesión accidental, el proceso es violento y catastrófico, se produce degeneración en el entorno celular como consecuencia de la destrucción progresiva de la estructura, produciendo un daño de carácter irreversible. Es un proceso pasivo desde el punto de vista energético y presenta cambios característicos, como pérdida de la permeabilidad de la membrana celular.



La apoptosis¹⁰ , también denominada muerte celular programada, es un proceso innato en todas las células y está codificado genéticamente; es un proceso activo, es decir necesita ATP (Adenosin Trifosfato) por tanto, es un proceso activo. La célula apoptótica sufre una serie de cambios morfológicos que la definen como tal: disminución de tamaño, aislamiento respecto de las células limitantes y redondeamiento de su forma. Se generan también unas estructuras, a modo de pequeñas invaginaciones esféricas, surgidas a partir de la membrana, que se denominan *blebs*. El núcleo se reduce y la cromatina se hace más densa. La célula apoptótica es fagocitada por macrófagos o

por células vecinas, evitando así la respuesta inflamatoria local ocasionada en la necrosis cuando la célula, al romperse, libera su contenido al medio.

Estudios cinéticos del crecimiento tumoral han revelado una alta frecuencia de apoptosis, tanto en tumores que regresan de manera espontánea, como en tumores tratados con drogas quimioterapéuticas y tratamientos radiativos.¹¹ Las células cancerosas adquieren mutaciones, que convierten a genes reguladores de la proliferación o diferenciación, en oncogenes desencadenantes del cáncer. Esto se logra al inactivar vías, que fisiológicamente inducen la apoptosis, o al activar la maquinaria reguladora que inhibe la apoptosis.

La interrupción de la apoptosis puede también contribuir al desarrollo de la metástasis. Algunas células tumorales, adquieren la capacidad de sobrevivir al torrente sanguíneo e invadir otros tejidos. En condiciones normales, este fenómeno es controlado mediante la inducción de apoptosis, en células en suspensión. Algunos estudios indican que las proteínas p53 y Bcl-2, también influyen en la muerte celular en suspensión.¹²

Vías básicas de iniciación de la Apoptosis

▪ VIA INTRÍNSECA O MITOCONDRIAL.

Tiene lugar como consecuencia de señales internas. Los factores que desencadenan la muerte por este camino pueden ser:

- presencia de toxinas bacterianas
- efecto de radicales libres de oxígeno
- acción de agentes: como rayos gamma
- quimioterapia sobre el núcleo

Estos factores activan dos proteínas conocidas como Bim y Puma, las cuales son dos factores pro-apoptóticos, que a su vez activan otra proteína Bcl-2 (B cell leukemia 2), presente en la membrana de la mitocondria, que interacciona con una proteína cercana llamada Bax, la cual origina poros en la membrana mitocondrial. Esta acción permite la salida del citocromo C del interior de la mitocondria al citosol, donde se une a la proteína Apaf-1 (factor 1 activador de la proteasa apoptótica) y a la procaspasa-9.

La unión se realiza con la intervención de ATP, de este modo se forman los llamados apoptosomas, activando así la procaspasa y formándose la caspasa-9.

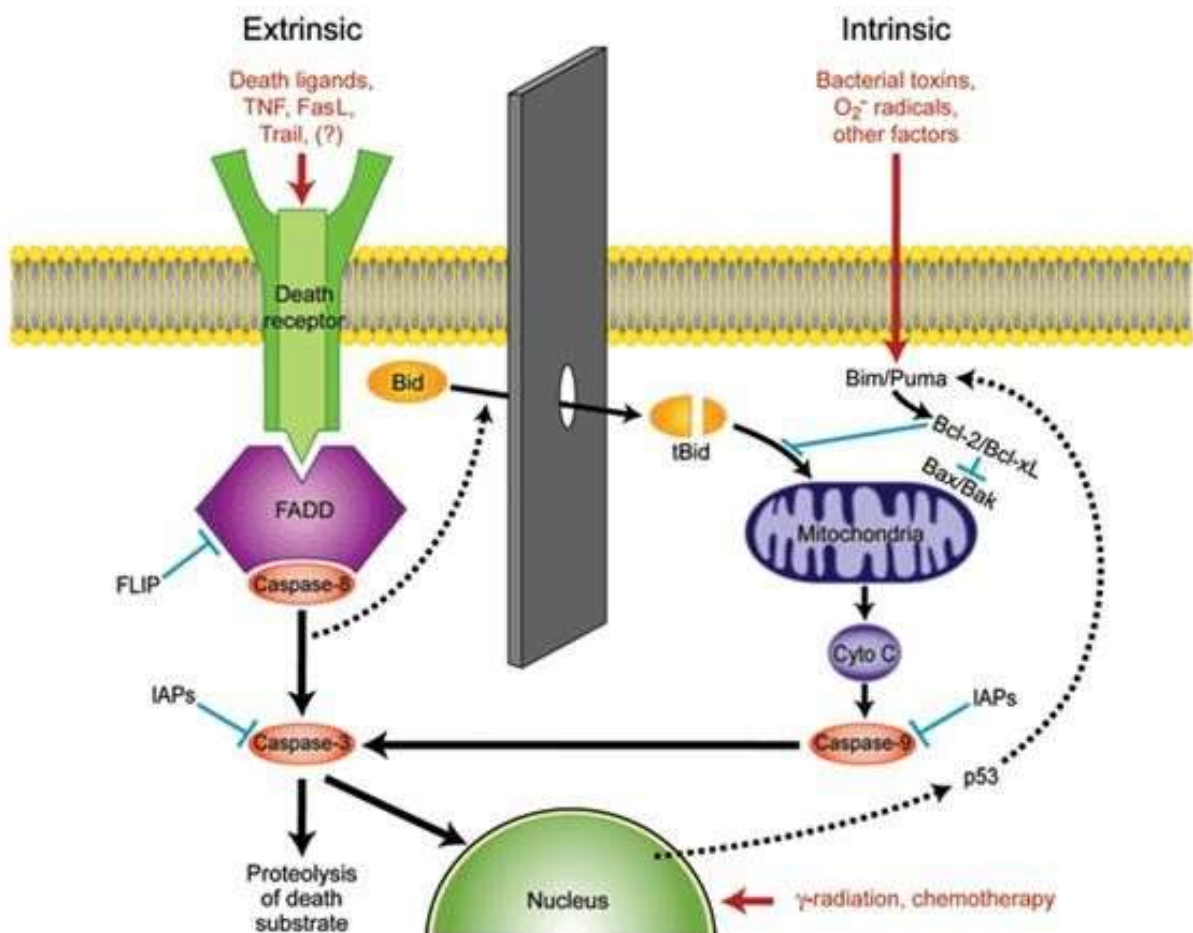


Figura 5.1.2.1. Vías apoptóticas intrínseca y extrínseca.

En el esquema se muestran también los factores llamados IAPs, que son inhibidores de la apoptosis y que funcionan, en ciertas condiciones, uniéndose a los apoptosomas. En cuanto a la proteína p53^{13 14}, se libera en caso de daño al

núcleo y es un potente inductor de la apoptosis, por eso cambios genéticos en el gen de p53 están relacionados con las células cancerosas.

Este gen es comúnmente conocido como “ángel guardián del genoma”, una vez activado, por el daño del DNA, la proteína p53, funciona como activador de varios genes, como p21 que detiene el ciclo celular, para dar tiempo a la célula a repararse. Cuando el daño es irreparable, la p53 activa genes suicidas, cuyos productos proteícos causan la muerte celular mediante apoptosis. Sin embargo, cuando se acumulan muchas mutaciones, las células sobreviven a través de muchas divisiones y la probabilidad de que el gen supresor de tumores p53 sea defectuoso o este ausente, es muy elevada por lo que se propaga el cáncer.

La vía extrínseca, involucra la activación de la cascada apoptótica, a través de receptores de la membrana celular, en respuesta a señales (ligandos) extracelulares. Inductores de esta vía, son los miembros de la familia TNF¹⁵ (TNF, Fas L, Trail) ligandos de los receptores de muerte celular. Una vez activado el receptor se inicia la fase ejecutora intracelular, durante esa fase la señal apoptótica puede ser inhibida y la célula logra sobrevivir, pero una vez pasado cierto punto, no hay retorno y la célula muere.

Como se observa en la *Figura 5.1.2.1*, la proteína FADD está asociada al receptor de muerte y a su vez está en contacto con la caspasa 8. Cuando se desenmascara la unión, la caspasa 8 (al igual que la caspasa 9), desencadena una serie en cascada, que activa a la caspasa-3 que es la ejecutora. Existen factores como el FLIP que tienen la capacidad de evitar la apoptosis, la conexión entre ambas vías se da por medio de la ruptura de la proteína Bid. La caspasa 8 corta a la proteína y se crea la forma truncada Bid (tBid) que, según se ve en el esquema, actúa sobre la mitocondria.

Existen varias técnicas¹⁶ para determinar y cuantificar la apoptosis, la selección de una y otra para realizar un estudio, depende generalmente del modelo de estudio, del tipo de muestra y de la infraestructura disponible.

- CITOFUOROMETRÍA o CITOMETRÍA DE FLUJO. Existen varias técnicas para determinar la apoptosis, que hacen uso de la citofluorometría.

- Detección de moléculas involucradas en la muerte apoptótica, utilizando anticuerpos acoplados a algún fluorocromo.
- Análisis del ciclo celular.
- Determinación de la actividad de las caspasas.

La Citometría de Flujo (CMF), es una técnica de análisis multiparamétrico, que permite medir simultáneamente múltiples características ópticas (dispersión de luz y fluorescencia), de cada una de las células o partículas presentes en una suspensión. Permite obtener información, sobre características físicas y químicas de las células o partículas en suspensión, que atraviesan una fuente de luz (láser), los parámetros medibles pueden ser:

- *Directos*. Tamaño y complejidad celular
- *Indirectos*. Se añaden a la suspensión celular reactivos con propiedades ópticas determinadas: FLUOROCROMOS.
 - Unión a componentes nucleares: ADN
 - Parámetros metabólicos: pH, concentración de Ca^{2+}
 - Unión a proteínas de membrana o intracelulares, a través de anticuerpos conjugados a fluorocromos

El principio básico de la Citometría de Flujo, es la medición de un gran número de células, en forma individual, en un período muy corto de tiempo mientras se desplazan en un sistema de flujo o torrente líquido (100-25.000 células por segundo, en sangre periférica u otros líquidos corporales). Cada célula pasa por un punto donde es impactada por un láser, que emite fluorescencia a una longitud dependiente del tipo de láser, cuya luz es desviada o alterada, de acuerdo a características propias de cada célula.

La variación de la longitud de onda así producida, es captada y depurada por un complejo sistema de lentes y espejos especiales, que concentra esta luz y la transforma en pulsos de voltaje. Estos son codificados e interpretados por un computador provisto del programa adecuado.

Los datos obtenidos de esta manera pueden manejarse muy versátilmente, siendo de gran eficacia y exactitud.

La evaluación de la apoptosis en nuestro estudio se realizó, por la unión de Anexina V y la incorporación de Ioduro de Propidio (IP) a las células tratadas y no tratadas. La Anexina-V es una proteína, que se une específicamente al fosfolípido fosfatidilserina (PS), el cual se encuentra en la cara interna de la membrana plasmática, y es expuesto en la cara externa de dicha membrana, cuando comienza el proceso de apoptosis. El marcaje con Anexina V (acoplada a un fluorocromo como FITC), conjuntamente con el Ioduro de Propidio (usado como colorante supravital), permite la diferenciación de las células viables, de las células apoptóticas tempranas, de las apoptóticas tardías, o necróticas.¹⁷ Para la unión de la proteína con el fosfolípido, se requiere la presencia de calcio, por lo que será necesario preparar una disolución tampón con Ca^{2+} , que ayudará a mantener la suspensión celular

El procedimiento de medida se fundamenta, en hacer pasar una suspensión de células alineadas y de una en una, por delante de un haz de láser focalizado. Las medidas se realizan mientras las células pasan en fila, midiendo así, la dispersión frontal (FSC), la dispersión lateral (SSC) y la emisión de fluorescencia. El análisis se realiza a velocidades de entre 500 y 4000 partículas/segundo, de lo que resulta una elevada fiabilidad estadística (permite analizar poblaciones representadas en baja frecuencia).

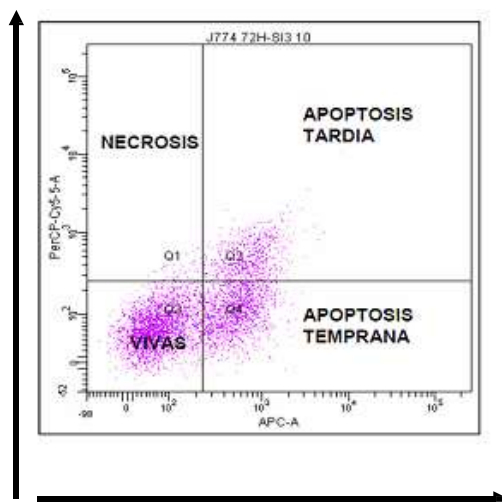
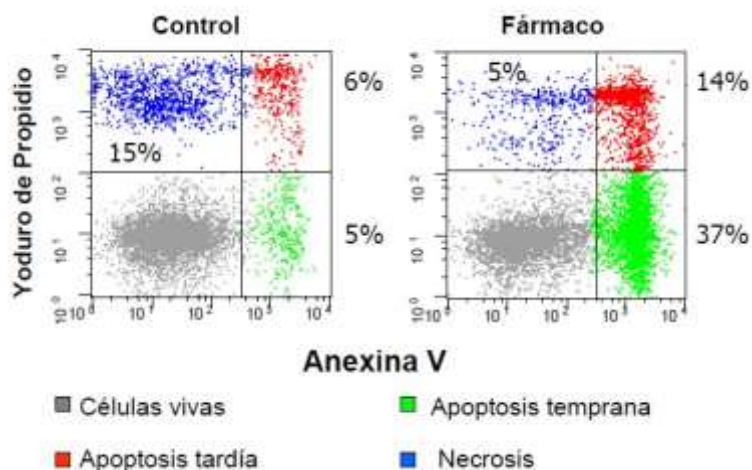


Figura 5.1.2.3. Histograma Anexina-V/IP

Para determinar la viabilidad celular, se utiliza el método de la exclusión de Ioduro de Propidio (IP) por células vivas. La membrana de estas células, forma una barrera con permeabilidad selectiva, entre el contenido intracelular y el medio extracelular. Las células muertas pierden esta propiedad y por lo tanto, incorporan colorante, el cual se intercala entre las bases del ADN y ARN, en una relación de molécula por cada 4-5 pares de bases. Una vez unido a los ácidos nucleicos, la fluorescencia de IP se ve incrementada unas 20-30 veces.

Las células vivas no tienen afinidad por ninguno de los dos marcadores, puesto que la membrana de estas esta intacta. Sin embargo, en el momento que comienza la apoptosis, la membrana empieza a romperse, y la fosfatidil serina (PS) de la membrana queda accesible para unirse a la Anexina V, se trata de Apoptosis temprana. Una vez la membrana esta totalmente fracturada, la Anexina V esta unida a toda la fosfatidil serina (PS) y el Ioduro de Propidio (IP) al ADN, obteniéndose señal de Apoptosis tardía. En cambio cuando se produce la Necrosis, la membrana está completamente destruida, no da señal en este fluorocromo, porque no existe unión con AnexinaV, pero si con Ioduro de Propidio.



Todos los productos a los que anteriormente se había determinado su IC_{50} , frente a la línea celular de adenocarcinoma de colon humano (Caco-2), para los clones de PD7 y TC7, han sido estudiados mediante Citometría de Flujo, para determinar de manera cuantitativa su muerte celular. Se ha utilizado un Citómetro de Flujo FACSARIA de BD, que permite distribuir porcentajes de células vivas y muertas; dentro de las muertas diferenciar necrosis, de apoptosis tardía, o temprana del total de células analizadas, mediante el programa FACSDIVA de BD.

En general en las células cancerígenas, se inhiben los procesos apoptóticos, y favorecen la proliferación celular incontrolada, mediante estos estudios se determina la tendencia de nuestros compuestos a inducir muerte programada.

El *Gráfico 5.1.2.1* es un resumen de los histogramas obtenidos mediante análisis cualitativo, utilizando Citometría de Flujo para todos los complejos de oro(I) sustituidos en células Caco-2, en TC7. En este resumen, para cada uno de los gráficos, se representan en el eje de las abscisas la interacción con Anexina V, y en el eje de las ordenadas la interacción con Ioduro de Propidio (IP). Así pues para los complejos de oro(I), los resultados obtenidos mediante esta técnica se muestran en la tabla *Tabla 5.1.2.1*.

Complejo (*)	TC7			
	% Vivas	% Muertas		
		% Necrosis	% Apop. Tardía	% Apop. Temprana
(RM-33)	84.6	1	6	8.6
(RM-41)	86.6	1.1	6.1	6.3
(RM-71)	84.4	1	8.9	5.8
(RM-78)	84	0.6	7.7	7.7
Cisplatino	55.4	14.6	22.4	7.6
Auranofin	37.4	22.7	32.2	7.7
dmsO	88.7	1.1	4.5	5.7

Tabla 5.1.2.1. Datos

de los complejos de oro(I)

de muerte celular

En la mayoría de los casos, el porcentaje de células vivas, tras el tratamiento con estos compuestos, es elevado (en torno a un 85% de las células siguen vivas).

En todos los complejos analizados, la muerte celular mediante necrosis, con porcentaje por debajo del 1.1% en todos los casos, es inferior a la muerte celular mediante apoptosis, bien sea esta temprana o tardía. Justamente es lo que se busca en un fármaco que pueda ser empleado en quimioterapia, que pueda inducir apoptosis.

Al comparar estos complejos, con los fármacos de referencia cisplatino y Auranofin, se observa que estos obtienen peores resultados que el compuesto cisplatino, cuyo porcentaje de células vivas es 55.4% y que el Auranofin cuyo porcentaje esta en 37.4%.

5.1.1.b.- Ciclo Celular.

Las células son generadas por otras células, y la única manera de producir más células es por división de las que existen. Una célula se reproduce mediante una secuencia ordenada de acontecimientos en los que duplica su contenido y, luego, se

divide en dos. Este ciclo de duplicación y división, es conocido como “*ciclo celular*”, mecanismo esencial de todos los seres vivos, que fue descubierto en 1882, por el anatomista alemán W. Flemming. Este hecho supuso un verdadero avance ya que permitió su observación, mediante un experimento sencillo de tinciones.¹⁸

La función básica del ciclo celular, es duplicar de manera exacta la cantidad de ADN cromosómico, y después distribuir las copias en células hijas genéticamente idénticas. El ciclo celular está compuesto por dos fases: *Fase M*, constituida por Mitosis o división del núcleo y Citocinesis o división de la célula, e *Interfase*, periodo muy activo que comprende las tres fases restantes del ciclo celular. Durante la *fase S* (*Síntesis*), la célula replica su ADN nuclear, un prerequisite esencial para la división celular. Esta fase es precedida y seguida, respectivamente por la *fase G₁* (*Gap = Intervalo*), es el tiempo que media entre el final de la fase M y principio de la fase S, y *fase G₂* (*Gap = Intervalo*), periodo entre final de fase S y principio de fase M. Durante estas fases de intervalo, la célula controla los ambientes intracelulares y extracelulares, asegurándose que las condiciones sean adecuadas. En estos puntos, las células deciden si pasan a la fase siguiente, o hacen una pausa que le permitan tener más tiempo para prepararse.

Figura 5.1.2.4. Fases del Ciclo Celular



La apoptosis puede iniciarse en el tercio final de la fase G₁, para impedir que una célula dañada ingrese en la fase de síntesis, de manera que las mutaciones no se reproduzcan durante la replicación del ADN, también se puede producir en G₂ evitando que las células que no lleguen a la madurez, entren en Mitosis.

Una población de células en proliferación, se tiñe con un colorante que se torna fluorescente cuando se une al ADN, de modo que la magnitud de la fluorescencia, es directamente proporcional a la cantidad de ADN de cada célula. Para medir la cantidad de ADN, se hacen pasar las células a través del citómetro de flujo, instrumento que mide el grado de fluorescencia de cada célula. En el histograma (*Figura 2.1.2.6*) se representa la cantidad de células que hay en cada fase, mostrando su contenido de ADN. Por tanto, este análisis nos da información sobre la distribución de las células en las diferentes fases del ciclo celular.

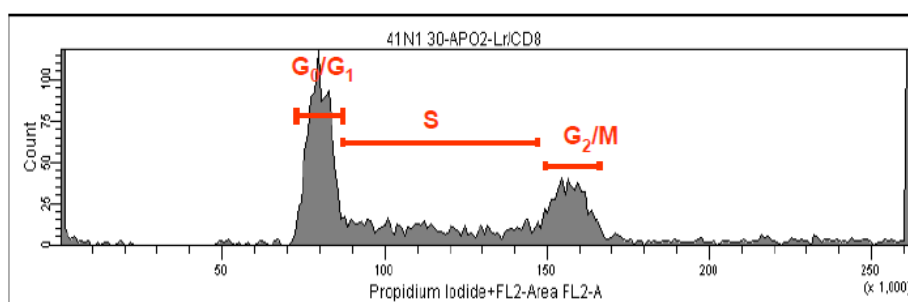


Figura 5.1.2.5. Histograma del Ciclo Celular de población normal

En la Citometría, la ploidía o número de juegos completos de cromosomas en una célula, se recoge en histogramas que se comparan con los de poblaciones celulares control. Normalmente, cerca del 90% de las células en un tejido, están en fase G₀ y G₁ del ciclo celular o lo que es lo mismo, en un momento en que no se están dividiendo, y que su carga cromosómica está formada por el número de pares de cromosomas propios de la especie. Esto se conoce como 2n. El resto de las células están adquiriendo material de ADN, o ya han alcanzado la cantidad doble de ADN (4n), y por tanto están preparándose o están dispuestos para la Mitosis, son las fases S y G₂ /M del ciclo celular. Por ello el histograma representativo de una población celular normal (*Figura 3.1.2.7*), está formado por un pico alto y mayor (2n) que corresponde a las fases G₀/G₁, es decir ADN no replicado, una fase de meseta de las células en fase S que están

sintetizando ADN (fase S), y otro pico menor ($4n$), correspondiente a las células en fase G2 y M, donde se encuentra el ADN replicado. No es posible diferenciar G2 y M ya que en las dos fases se encuentra el mismo contenido de ADN.

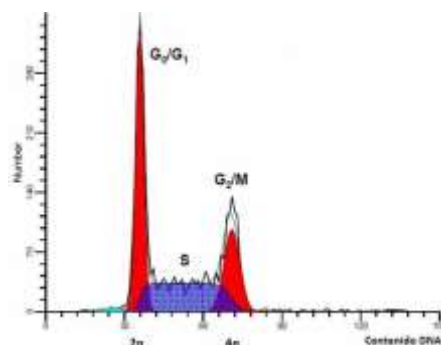
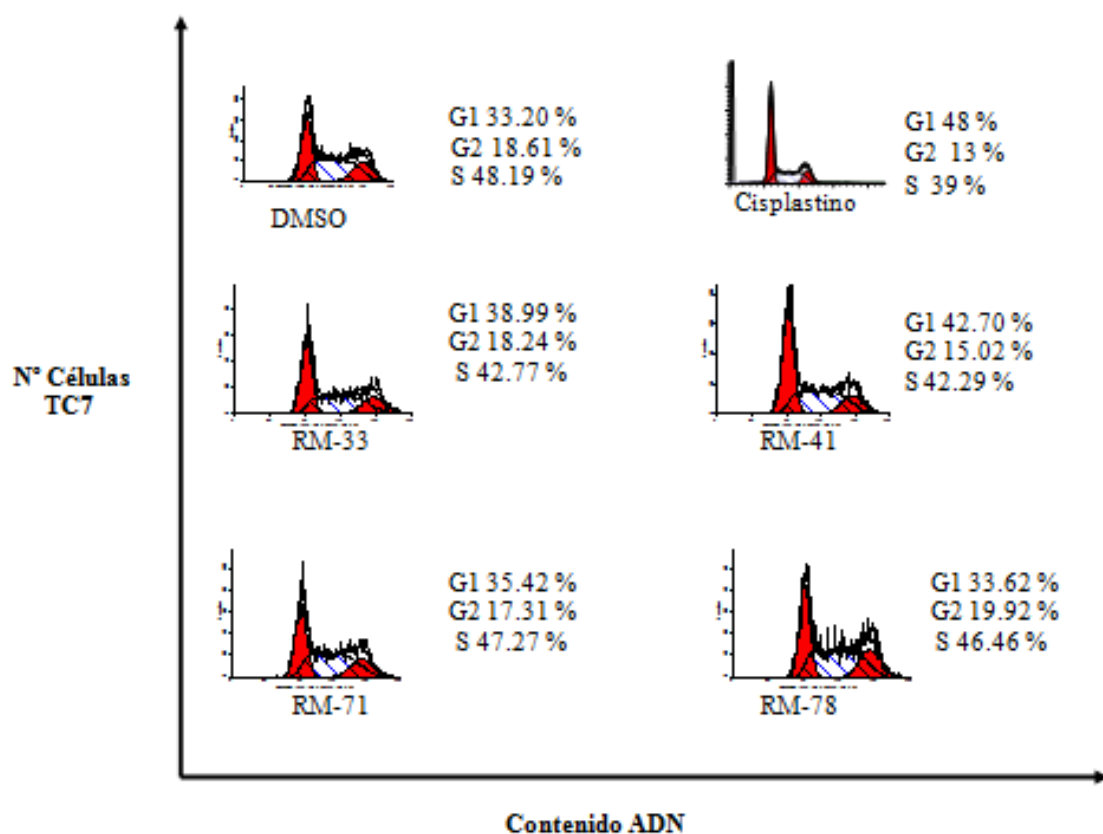


Figura 5.1.2.6. Representación del contenido de ADN vs el número de células

Para delimitar las distintas fases se recurre al programa informático, MODIF

3.0 de Verita Software del Citómetro FACSARRAY de BD, que utiliza modelos matemáticos, para delimitar las fases. El ajuste matemático que realiza el programa, viene determinado por el factor RCS que debe estar dentro del rango 1-4.5 para que se considere correcto. Nos permite conocer porcentajes acerca del número de células que se encuentran en cada una de las fases, respecto al total de células vivas analizadas.

Para la mayoría de los complejos de oro(I), se puede obtener la distribución de células en cada una de las fases del ciclo celular, ya que como se observó en los histogramas anteriores, aproximadamente el 85% de las células analizadas están vivas, tras 48 horas de tratamiento con estos fármacos. Podemos establecer una comparación entre aquellos casos en los que se ha podido medir la distribución de poblaciones, con respecto al experimento realizado como blanco, en las células en DMSO sin ningún complejo adicional.



Gráfica 5.1.2.4. Ciclo Celular para los complejos de oro(I)

En las células TC7, se observan pequeñas perturbaciones en el ciclo celular. En los complejos RM-33, RM-41 y RM-71 se aprecia un ligero aumento de población en la fase G1, consecuencia de la disminución de población en la fase G2. En cambio, en el complejo RM-78, no hay cambio en la fase G1, al compararlo con el blanco, pero si hay diferencias entre las fases G2 y S, disminuyendo la fase S a costa del aumento de la G2. Los análisis del ciclo celular para los complejos de oro, determinados mediante citometría tras 48 h después de añadir el tratamiento en células Caco-2, muestran los porcentajes de cada una de las fases del ciclo. Como era de esperar la mayoría de las células vivas se encuentran en la fase G1 y S y solo un pequeño porcentaje ha alcanzado la fase completa de replicación de ADN (G2) y están preparadas para la división celular.

5.1.2.- Ros

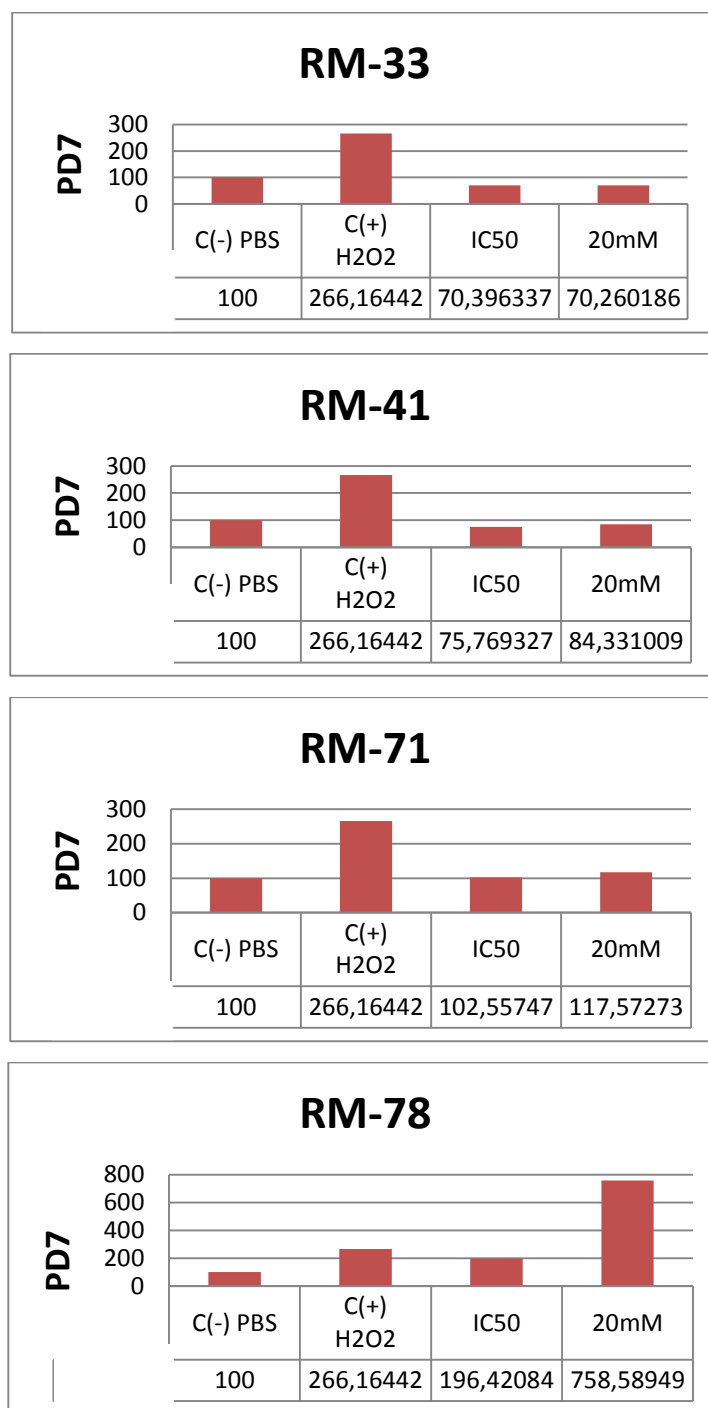
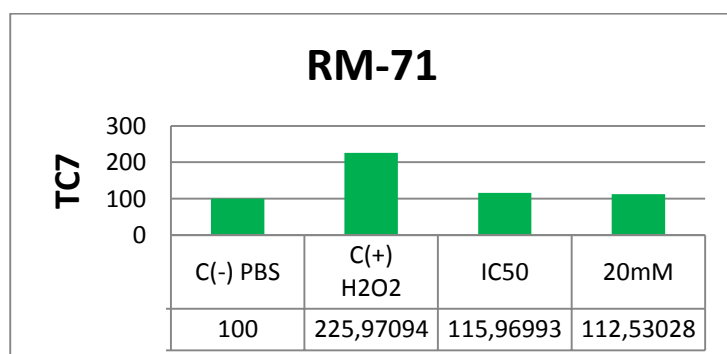
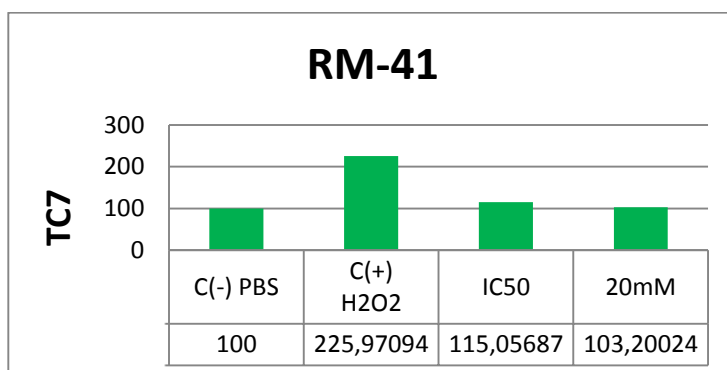
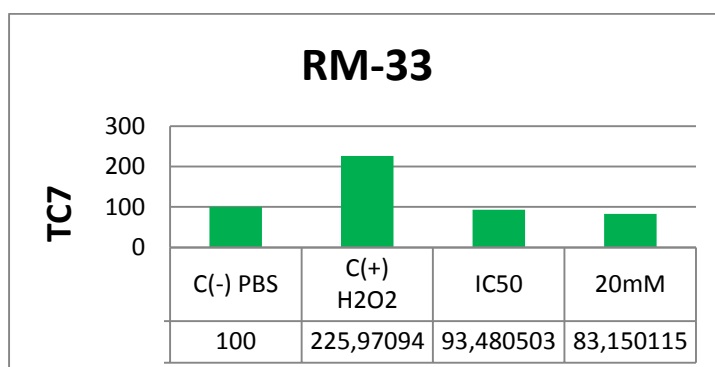


Figura 5.1.2.7. Ros generado

En las células PD7 de los compuestos RM-33 y RM-41 se observan niveles de Ros por debajo del control negativo, lo cual nos hace deducir que estos compuestos tienen un efecto antioxidante.

Los antioxidantes son sustancias que cuando están presentes en bajas concentraciones en comparación con el sustrato oxidable, retrasan o previenen significativamente la oxidación de dichos sustratos.

Los valores dados para RM-41 en IC50 y 20mM, apenas guardan diferencia con respecto al control negativo, es decir, no produce ni aumento ni disminución del estrés oxidativo en las células cancerígenas Caco-2. Por el contrario, el compuesto RM-78, muestra un gran incremento en la formación de Ros. El daño del ADN inducido por ROS puede acelerar el proceso de la apoptosis de las células cancerígenas, lo cual sería deseable.



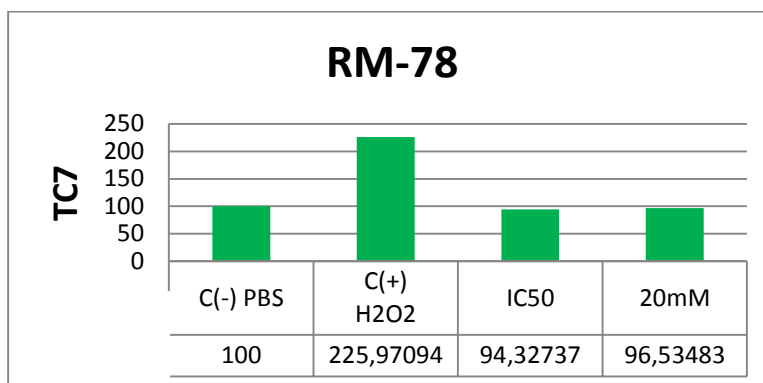


Figura 5.1.2.8. Ros generado

En las células TC7 de los compuestos RM-33 y RM-78 se observan niveles de Ros por debajo del control negativo, lo cual nos hace deducir que estos compuestos tienen un efecto antioxidante, al igual que ocurría con RM-33 y RM-41 en PD7. Respecto a RM-41 y RM-71, sus valores son próximos al control negativo, es decir, no produce ni aumento ni disminución del estrés oxidativo en las células cancerígenas Caco-2.

6. Conclusiones.

1. El estudio biológico de los compuestos de oro (I) ha permitido la familiarización con nuevas técnicas, además de adquirir mayor destreza en el laboratorio.
2. Hemos llevado a cabo el estudio de la viabilidad celular (MTT) de todos los complejos, pudiendo observar que todos ellos presentan valores inferiores al cisplatino e incluso el compuesto RM-78 para células TC7 presenta un valor inferior al auranofin.
3. Se estudió la apoptosis y el ciclo celular de todos los complejos, observándose el aumento de la población en la fase G1.
4. Se midió el nivel de Ros de todos los complejos para valorar el estrés oxidativo de las células cancerígenas, y se observó que únicamente se estaba significativamente aumentado para el complejo RM-78 en las células PD7.

7. Referencias Bibliográficas.

- ¹ V. Meunier, Y. Bounié, G. Berger, G. Fabre. The human intestinal epithelial cell line Caco-2. *Pharmacological and pharmacokinetic applications Cell. Bio. Toxicol.* 1995, 85, 181-194.
- ² M. Pinto, S. Robine-Leon, M. D. Appay, M. Keding, N. Triadou, E. Dussaulx, B. Lacroix, P. Simon-Assmann, K. Haffen, J. Fogh, A. Zweibaum. Enterocyte-like differentiation and polarization of human colon carcinoma cell line Caco-2 in culture. *Bio. Cell.* 1983, 47, 323-330.
- ³ M. Rousset. The human colon carcinoma cell line HT-29 and Caco-2, two in vitro models for the study of intestinal differentiation. *Biochimie.* 1986, 68 (9), 1035-1040.
- ⁴ C. F. Shaw. Gold-Based Therapeutic Agents. *Chem. Rev.* 1999, 99, 2589.
- ⁵ O. M. P. Dhuhghail, P. J. Sadler. *Metal Complexes in Cancer Chemotherapy*. VHC: Weinheim, 1993.
- ⁶ T. Boulikas, M. Vougiouka. Cisplatin and platinum drugs at the molecular level. *Oncol. Rep.* 2003, 10, 1663-1682.
- ⁷ A. Cassidy, J. Boni, C. Cortes-Funes, H. Cervantes, A. Freyer, G. Papamichael, D. Le Bail, N. Louvet, C. Hendler, D. de Braud, F. Wilson, C. Morvan, F. Bonetti. Leucovorin and fluorouracil with or without oxaliplatin as first-line treatment in advanced colorectal cancer. *J. Clin. Oncol.* 2000, 18 (16), 2938-2947.
- ⁸ T. Andre, C. Boni, L. Mounedji-Boudiaf, M. Navarro, J. Tabernero, T. Hickish, C. Topham, M. Zaninelli, P. Clingan, J. Bridgewater, I. Tabah-Fisch, A. de Gramont. Oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment for colon cancer. *N. Engl. J. Med.* 2004, 350 (23), 2343-2351.
- ⁹ N. A. Scott, S. Susnerwala, S. Gollins, A. S. Myint, E. Levine. Preoperative neo-adjuvant therapy for curable rectal cancer reaching a consensus 2008. *Colorectal Dis.* 2009, 11 (3), 245-248.
- ¹⁰ M. D. Esposti. Mitochondria in apoptosis: past, present and future. *Bioch. Soc. Trans.* 2004, 32, 493-495.
- ¹¹ A. H. Wyllie, J. F. Kerr, A. R. Currie. Cell death: the significance of apoptosis. *In Rev. Cytol.* 1980, 68, 251-306.
- ¹² M. A. Nikiforov, K. Hagen, V. S. Ossovskaya, T. M. Connor, S. W. Lower, G. I. Deichman. p53 modulation of anchorage independent growth and experimental metastasis. *Oncogene.* 1996, 13(8), 1709-19.
- ¹³ A. Takaoka, S. Hayakawa, H. Yanai, D. Stoiber, H. Negishi. Integration of interferon alpha/beta signalling to p53 responses in tumour suppression and antiviral defence. *Nature* 2003, 424, 516-523.
- ¹⁴ X. W. Wang, M. K. Gibson, W. K. Vermeulen, K. H. Forrester, W. Sturzbecher. Abrogation of p53-induced Apoptosis by Hepatitis B Virus X Gene. *Cancer Res.* 1995, 55, 6012-6016.
- ¹⁵ H. Wajant. The Fas signaling pathway: more than a paradigm. *Science.* 2002, 296, 1635-1636.

- ¹⁶ J. A. Collin, C. A. Shandl, K. K. Young, J. Vesely, M. C. Major. Major DNA Fragmentation is a late event in apoptosis. *J. Histochem. Cytochem.* 1997, 45, 923-934.
- ¹⁷ I. Vermes, C. Haanen, H. Steffens-Nakken. A novel assay for apoptosis flow cytometric detection of phosphatidyl serine expression on early apoptotic cells using labelled Annexin V. *J. Immunol Meth.* 1995. 184, 39-51.
- ¹⁸ Campbell-Reece. Fisiologia. Ed. Panamericana. California. 2007.

Basada en la tesis doctoral de Elena y en el TFM de Rebeca Monteagudo

