



Universidad
Zaragoza

Trabajo Fin de Máster

Evaluación *in vitro* de la actividad antitumoral
de complejos de oro con ligandos
ditiocarbamato

Autor:

Luis Javier Quero Bellido

Directoras:

Elena Cerrada Lamuela
M^a Jesús Rodríguez Yoldi



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza

Septiembre 2017

Índice

RESUMEN	1
ABSTRACT	1
1. INTRODUCCIÓN	3
1.1. El cáncer de colon	3
1.2. Complejos metálicos en el tratamiento del cáncer de colon.....	3
1.2.1. Los complejos de platino.....	4
1.2.2. El oro en la medicina	5
1.3. Los complejos de oro(III)	5
1.4. Ligandos del tipo ditiocarbamato	6
1.5. Dianas celulares de los complejos de oro(III) con ligandos ditiocarbamato.....	6
1.5.1. Inhibición de la tiorredoxina reductasa	7
1.5.2. Inhibición del proteasoma.....	7
1.6. Mecanismos de muerte celular.....	9
2. OBJETIVOS	11
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	13
3.1. Complejos de oro(III) y preparación de las disoluciones madre	13
3.2. Línea celular (Caco-2/TC7)	13
3.3. Cultivo celular.....	14
3.4. Estudios de viabilidad en cultivos 3D. Generación de esferoides.....	14
3.5. Estudio de la proliferación celular y determinación del IC ₅₀ . Ensayo MTT	15
3.6. Estudios de apoptosis. Doble tinción Anexina V/yoduro de propidio	15
3.7. Análisis de la activación de las caspasas 3 y 7 mediante microscopía confocal	15
3.8. Determinación de la activación de caspasa-3 mediante citometría de flujo.....	16
3.9. Determinación de BAX y BCL-2	16
3.10. Cuantificación de la liberación del citocromo C.....	16
3.11. Análisis del ciclo celular. Tinción del DNA con yoduro de propidio	17
3.12. Determinación del potencial mitocondrial (ψ_m)	17
3.13. Evaluación de los niveles intracelulares de H ₂ O ₂	17
3.14. Inhibición de la actividad de TrxR humana purificada	17
3.15. Estudio teórico de interacción complejo-TrxR. Docking	18
3.16. Determinación de la actividad tiol-reductasa de un lisado celular.....	18

3.17. Determinación de la actividad quimotripsina del proteasoma en células.....	18
4. RESULTADOS	20
4.1. Capacidad antiproliferativa de los complejos de oro.....	20
4.2. Muerte celular inducida por los complejos de oro	23
4.2.1. Activación de caspasas.....	24
4.2.2. Expresión de Bcl-2 y Bax.....	26
4.2.3. Modificación del potencial de membrana mitocondrial (Ψ_m) y liberación del citocromo c.....	26
4.3. Modificación del ciclo celular.....	28
4.4. Interacción con la enzima TrxR	29
4.5. Efecto sobre los niveles de ROS en células Caco-2/TC7	31
4.5.1. Efecto sobre la TrxR de células Caco-2/TC7	31
4.6. Interacción con el proteasoma	32
5.DISCUSIÓN.....	34
6. CONCLUSIONES	37
6. CONCLUSIONS	37
REFERENCIAS.....	38

RESUMEN

En la actualidad, el cáncer es uno de los trastornos a los que más esfuerzos ha dedicado la investigación, debido a su alta incidencia, el desconocimiento existente acerca de su aparición y desarrollo y la elevada tasa de mortalidad que presenta. En concreto, el cáncer de colon es el tercero con mayor incidencia a nivel mundial y uno de los que peor pronóstico poseen. Debido a la escasa efectividad de los tratamientos convencionales (la radioterapia y la quimioterapia), junto a los efectos secundarios que producen en el paciente, es necesaria la búsqueda de nuevos tratamientos.

En esta línea y a raíz del descubrimiento de las propiedades anticancerígenas del *cisplatino*, comenzaron a desarrollarse complejos metálicos entre los que se encuentran los complejos metálicos de oro(I) y de oro(III).

En el presente trabajo se ensayó el efecto de nueve complejos de oro(III) con ligandos ditiocarbamato sobre una línea celular de carcinoma de colon humano (Caco-2/TC7). Estos complejos demostraron tener la capacidad de inhibir la actividad de tipo quimotripsina del proteasoma, deteniendo el ciclo celular en fases G₀ y G₁ y desencadenando la muerte por apoptosis.

ABSTRACT

Nowadays, cancer is one of the most investigated disorders due to its high incidence, the ignorance about its development and its low survival rate. In particular, colorectal cancer is the third most common cancer in the world, as well as having one of the worst prognosis, due to the low efficacy of the traditional treatment (radiotherapy and chemotherapy), together with the adverse reactions caused in the patients.

In an attempt to overcome these drawbacks, and since the anticancer properties of *cisplatin* were discovered, new metal complexes appeared and started to be used in chemotherapy. Among these complexes, we can find gold(I) and gold(III) derivatives.

In the present work, nine different dithiocarbamate gold (III) complexes were tested in Caco-2/TC7 cells (human colon carcinoma cell line), in order to evaluate their cytotoxic effect. These complexes showed the capacity of inhibiting the proteasome chymotrypsin-like activity, which would arrest cell cycle in G₀ and G₁ phases, triggering apoptosis.

PALABRAS CLAVE

Cáncer, oro(III), ditiocarbamato, proteasome, apoptosis

ABREVIATURAS:

CDK: quinasa dependiente de ciclinas

C-L (activity): (actividad) tipo caspasa

CT-L (activity): (actividad) tipo quimotripsina

DCFH-DA: dicloro-dihidrodiacetato de fluoresceína

DilC1: yoduro de 1,1',3,3'-hexametilindodicarbo-cianina

DTNB: ácido 5,5-ditiobis-2-nitrobenzoico

MTT: 3(4,5 dimetil-2-tiazoil)-2,5-difeniltetrazólico

PGPH: peptidilgultamil péptido hidrolasa

PI: yoduro de propidio

PS: fosfatidilserina

ROS: especies reactivas de oxígeno

T-L (activity): (actividad) tipo tripsina

TrxR: tiorredoxina reductasa

UPS: sistema ubiquitina/proteasoma

Ψ_m : potencial de membrana mitocondrial

1. INTRODUCCIÓN

1.1. El cáncer de colon

El término cáncer recoge cientos de enfermedades que se definen como el resultado de dos procesos. El primero de ellos es la división incontrolada de las células, que pierden su morfología normal, dando lugar a un tumor. La segunda de las características común a todas estas enfermedades es la adquisición de la capacidad de invadir otros tejidos, es decir, de producir metástasis¹.

Sin embargo, el cáncer puede aparecer en cualquier tejido, adquiriendo en cada caso unas características específicas que lo diferencian de los tumores propios de otros órganos. El cáncer de colon, el tercero más diagnosticado y cuarto que más muertes provoca², es un adenocarcinoma propio de las células epiteliales, concretamente de la mucosa del intestino grueso³. Como el resto de cánceres, es el resultado de un proceso de acumulación de mutaciones y cambios epigenéticos que suponen la pérdida sucesiva de genes supresores de tumores y la ganancia de función de los oncogenes^{1,3-5}.

La causa de la adquisición de estas mutaciones aún se desconoce, pero existen una gran cantidad de factores de riesgo. Aunque los más importantes son los factores ambientales (estilo de vida, dieta o exposición a radiaciones)⁶, también influyen factores genéticos⁷ o el padecimiento de afecciones intestinales como la enfermedad de Crohn, que predisponen al desarrollo de cáncer colorrectal.

A pesar de los importantes avances en la biología y genética del cáncer, la revolución terapéutica no ha sido la esperada y, hoy en día, el cáncer se considera un grave problema de salud pública, situándose como la segunda causa de mortalidad en países desarrollados como Estados Unidos⁸. Además, de entre todos ellos, el cáncer colorrectal es el tercero más diagnosticado, presentando altas tasas de mortalidad⁹.

1.2. Complejos metálicos en el tratamiento del cáncer de colon

En estadios tempranos del cáncer de colon, como en la mayoría de los tumores en estadios poco avanzados y de fácil acceso, la intervención quirúrgica es el tratamiento de principal elección. Sin embargo, es habitual la recurrencia tras la extirpación del tumor, por lo que cuando el cáncer ha evolucionado hasta fases más avanzadas de la enfermedad, la radioterapia y la quimioterapia son las armas principales para combatir la enfermedad³.

Entre los agentes empleados en quimioterapia encontramos antimetabolitos como el 5-fluoroacilo, anticuerpos monoclonales como Bevacizumab (anti-VEGF) y complejos metálicos de platino como el *cisplatino* y el *oxaliplatino* (figura 1).

1.2.1. Los complejos de platino

La aplicación farmacológica de iones metálicos para el tratamiento de diferentes enfermedades como el cáncer se ha desarrollado a lo largo de la historia de la medicina. Uno de los primeros complejos metálicos usados para combatir el cáncer fue el *cisplatino* (*cis*-[PtCl₂(NH₃)₂]), un complejo de platino(II) cuyas propiedades anticancerígenas se descubrieron en los años 60 y que permitió la cura de un elevado porcentaje de casos de cáncer de testículos, jugando además un papel muy activo en el tratamiento de cánceres de ovario, vejiga y cérvix, melanomas y linfomas¹⁰.

Sin embargo, a pesar de su excelente capacidad anticancerígena, la efectividad del *cisplatino* se ve comprometida por dos razones. La primera de ellas es una toxicidad debida a su modo de actuación, ya que el *cisplatino* se intercala en el DNA, generando cambios conformacionales que impiden su replicación y transcripción, lo que desencadena la muerte por apoptosis¹¹. Esto le dota de una escasa especificidad por el tejido cancerígeno, ya que el fármaco también actúa sobre las células sanas, que sufren un entrecruzamiento Pt-GG, desarrollando graves efectos secundarios entre los que destacan nefrotoxicidad y neurotoxicidad¹². La segunda de las razones que limita el uso del *cisplatino* es la capacidad de los tumores de desarrollar resistencias ante este tratamiento.

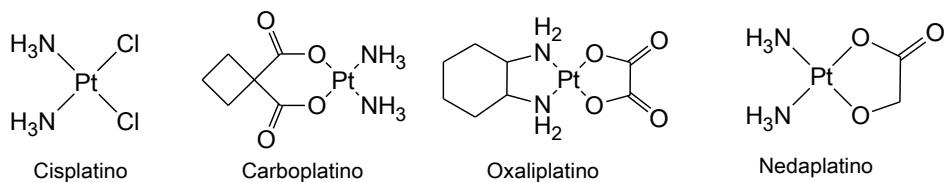


Figura 1. Estructura del *cisplatino* y sus derivados.

Con el objetivo de reducir estos efectos adversos, se evolucionó en la síntesis química de estos compuestos, diseñando complejos de platino de segunda y tercera generación como el *carboplatino* (*cis*-diamino(ciclobitano-1,1-dicarboxilato-*O,O'*)platino(II)) y el *oxaliplato* (*cis*-[oxalato(*trans*-1,2-diaminociclohexano)platino(II)])¹³. De hecho, en la actualidad, el *oxaliplato* se emplea, en combinación con 5-fluorouracilo y leucovorina como coadyuvantes, en el tratamiento de primera línea contra el cáncer de colon metastásico¹⁴. Aunque son más efectivos que el *cisplatino*, estos nuevos compuestos siguen resultando tóxicos, ya que su mecanismo citotóxico es el mismo, por lo que su impacto como fármacos anticancerígenos no ha sido el deseado.

Por lo tanto, en los últimos años, los nuevos avances en terapia antitumoral basada en agentes metálicos se han dirigido hacia la síntesis de complejos no basados en platino, para evitar los efectos adversos asociados al *cisplatino* y sus análogos. Entre ellos, el interés por los complejos de oro se ha incrementado en la actualidad debido a su potente efecto sobre la proliferación de las células tumorales.

1.2.2. El oro en la medicina

Las propiedades medicinales del oro se han utilizado ampliamente a lo largo de la historia. Las primeras aplicaciones terapéuticas del oro datan del año 2500 a.c. en China, donde se usaba para el tratamiento de la viruela, úlceras de piel y el sarampión¹⁵. Posteriormente, culturas como la india o la egipcia también emplearon el oro para la confección de diferentes preparados médicos¹⁵.

Durante todos esos siglos, el oro era considerado como un símbolo de longevidad e inmortalidad debido a sus poderes curativos. Sin embargo, fue en los primeros años del pasado siglo cuando la crisoterapia comenzó a utilizarse de manera racional, como resultado de las pruebas realizadas para determinar su efecto bacteriostático. Con este propósito, se emplearon distintos complejos de oro(I) para la eliminación de la micobacteria causante de la tuberculosis¹⁶. Posteriormente, algunos de los compuestos menos tóxicos de entre aquellos que habían sido ensayados, la *miocrisina* (aurotiomalato) y el *solganol* (aurotioglucosa) (tiolato complejos de oro(I)) (figura 2), fueron destinados también para el tratamiento de la artritis reumatoide (AR), disminuyendo además el dolor articular¹⁷.

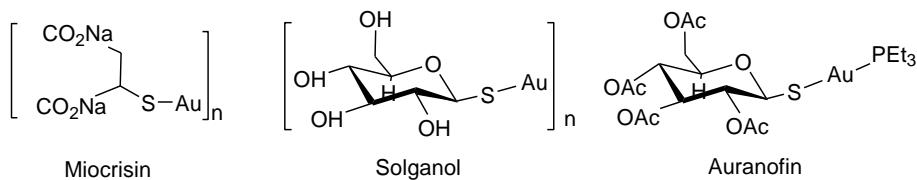


Figura 2. Estructura de complejos de oro empleados como fármacos frente a AR.

Sin embargo, estos compuestos presentaban algunos efectos secundarios adversos, por lo que se sintetizaron nuevos compuestos metálicos de oro con menor toxicidad y vías de administración menos invasivas. En este contexto, en los años 80 apareció el *auranofin* (1-tio-β-D-glucopiranosa-2,3,4,6-tetraacetato-S-trietilfosfina oro(I)), un derivado de oro(I) (figura 2) con efectos antiartríticos¹⁸. Además, posteriormente se descubrió que este compuesto presentaba unas propiedades anticancerígenas muy similares al *cisplatino*, especialmente sobre leucemias¹⁹, por lo que en los últimos años han surgido una enorme variedad de complejos de oro con capacidad de detener la proliferación de células tumorales^{20, 21}.

1.3. Los complejos de oro(III)

El oro se puede presentar en dos estados de oxidación distintos: Au(I) y Au(III). Aunque los complejos de oro(I) han sido los más estudiados debido a la influencia del *auranofin*, el oro(III) suscita un gran interés debido a la analogía que existe entre estos complejos y los de platino(II), ya que ambos son isoelectrónicos (configuración electrónica d^8) e isoestructurales (geometría plano-cuadrada)²². Esto ha hecho que en los últimos años hayan ido surgiendo una enorme variedad de complejos de oro(III) con actividad anticancerígena^{23, 24}.

Sin embargo, los complejos de oro(III) son muy reactivos y su elevado potencial redox y baja estabilidad pusieron en entredicho la eficacia de estos compuestos como fármacos anticancerígenos, ya que bajo las condiciones reductoras fisiológicas, se podrían reducir fácilmente a oro(I) y oro metálico²⁵. A pesar de estos inconvenientes, se ha conseguido aumentar la estabilidad de los complejos de oro(III) gracias al uso de determinados ligandos, especialmente aquellos que presentan átomos de nitrógeno como grupos dadores de densidad electrónica²⁵.

1.4. Ligandos del tipo ditiocarbamato

Uno de los ligandos que ha demostrado incrementar la estabilidad de los complejos de oro(III) son los ditiocarbamatos, ya que, gracias a su efecto quelante y su capacidad para actuar como donadores de electrones, son capaces de estabilizar el átomo de oro en su estado de oxidación +3²⁶.

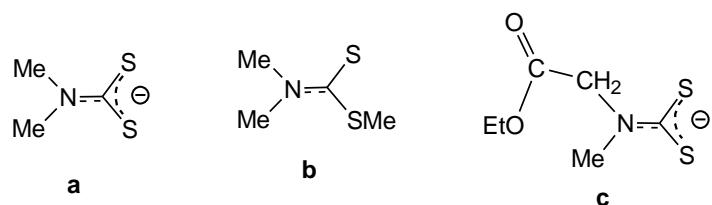


Figura 3. Ligandos de tipo ditiocarbamato: (A) *N,N*-Dimetilcarbamato (DMDT); (B) *S*-Metil-*N,N*-dimetilditiocarbamato (DMDTM); (C) Etilsarcosinaditiocarbamato (ESDT)

Además, los ditiocarbamatos tienen la habilidad de regular la función de algunas proteínas claves en la proliferación celular, siendo capaces de activar o suprimir procesos como la apoptosis, el estrés oxidativo o la traducción y degradación de proteínas. Por lo tanto, estos compuestos son de gran interés para su aplicación clínica, no solo como agentes quimioterapéuticos para el tratamiento del cáncer, sino también como antivirales, antiinflamatorios y contra otras afecciones²⁷.

1.5. Dianas celulares de los complejos de oro(III) con ligandos ditiocarbamato.

Dada la analogía entre los complejos de platino(II) y los de oro(III), se esperaba que ambos compartieran el DNA como diana molecular. Sin embargo, aunque en algunos casos se ha obtenido evidencia de una interacción directa oro(III)-DNA, en la mayoría de los casos, los efectos sobre el DNA parecen ser muy débiles, mientras que los complejos sí son capaces de unirse a diferentes proteínas celulares. Es decir, el DNA no es la diana principal de los complejos de oro(III), sino que existen mecanismos bioquímicos alternativos asociados a la modificación selectiva de proteínas cruciales para el desarrollo celular²⁸.

Se ha propuesto un mecanismo por el cual las proteínas que presentan residuos de cisteína expuestos podrían ser atacadas por los complejos de oro(III), que romperían los puentes disulfuro y oxidarían las metioninas y glicinas, por lo que los extremos amino terminales podrían ser desaminados por tales compuestos²⁹. Entre las proteínas

con las que estos complejos de oro son capaces de interactuar destacan la tiorredoxina reductasa (TrxR) y el proteasoma.

1.5.1. Inhibición de la tiorredoxina reductasa

Existen estudios que ponen en evidencia la capacidad del *auranofin* para inducir un incremento en los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS)³⁰. Estudios posteriores demostraron que complejos de oro(I) y oro(III) inhibían la enzima TrxR³¹⁻³³, lo cual se traduciría en un aumento de los niveles de ROS mitocondrial^{32, 34}.

El sistema tiorredoxina es uno de los sistemas antioxidantes más importantes de la célula y está implicado en mantener el ambiente redox en el interior celular, en el crecimiento de la célula, en la defensa del estrés oxidativo y en el control de la apoptosis³⁵. Está constituido por la tiorredoxina (Trx), la enzima tiorredoxina reductasa (TrxR) y el NADPH.

La tiorredoxina reductasa (TrxR1) (EC:1.8.1.9, es la forma citosólica de la TrxR. Se trata de una proteína homodimérica que posee actividad tiorredoxinreductasa y que, además, puede actuar como glutarredoxina. Se encuentra codificada en el gen TXNRD1 y se han descrito 7 isoformas diferentes, de las cuales la isoforma 1, expresada en ovario, bazo, corazón, hígado, riñón y páncreas, así como en células cancerígenas, es considerada la secuencia canónica. TrxR1 contribuye a la homeostasis oxidativa, evitando los daños causados por estrés oxidativo asociado a H₂O₂, además de inducir la polimerización de actina y tubulina.

Como consecuencia del desequilibrio redox en las células tumorales, la expresión de tiorredoxina y tiorredoxina reductasa se ve incrementada en un gran número de cánceres. Además, sus niveles están relacionados con la proliferación activa del tumor y un peor pronóstico del paciente³⁶.

Se piensa que los complejos de oro pueden atacar selectivamente a los grupos tioles y selenoles de las proteínas, claves para mantener la función reductasa de las proteínas implicadas en el equilibrio redox³⁷. La TrxR1, por ejemplo, presenta en la cola C-terminal una selenocisteína muy accesible susceptible de ser modificada (selectiva e irreversiblemente) por compuestos eletrofílicos, lo que provocaría la desactivación de la enzima³⁸. En concreto, iones metálicos blandos tales como platino(II) y oro(I) y (III) pueden interaccionar con el residuo de selenocisteína actuando como inhibidores de la enzima^{37, 38}.

1.5.2. Inhibición del proteasoma

Inicialmente, los inhibidores del proteasoma se usaban para el estudio de las actividades catalíticas del mismo³⁹. Sin embargo, se han encontrado diferentes resultados que sugieren que las células tumorales presentan una mayor sensibilidad a la inhibición del proteasoma que las células sanas⁴⁰⁻⁴², por lo que se comenzó a

estudiar el uso potencial de los inhibidores del proteasoma como un agente anticancerígeno.

El sistema ubiquitina/proteasoma (UPS) es una maquinaria molecular compleja que constituye la vía de proteólisis principal en las células eucariotas⁴³ y juega un papel fundamental en la regulación a la alza (*up-regulation*) de la proliferación celular y la regulación negativa (*down-regulation*) de la muerte celular. Esta vía consta de dos pasos:

(1) La ubiquitinación de la proteína, que consiste en una modificación covalente reversible catalizada por un proceso enzimático en tres pasos. En el primero de ellos, la ubiquitina (Ub) es activada por la enzima Ub-activadora (E1), en el segundo la ubiquitina activada es transferida a la enzima Ub-conjugadora (E2) y por último la ubiquitina se une a la proteína sustrato mediante la Ub-ligasa (E3)⁴⁴.

(2) La degradación de la proteína poliubiquitinada en el proteasoma 26S. El proteasoma 26S es un complejo enzimático multicatalítico que consiste en un núcleo catalítico 20S asociado a dos subunidades reguladoras 19S (*figura 4*). Cada una de estas subunidades 19S es capaz de unirse a una cadena poliubiquitinada y separarla de la proteína sustrato. Posteriormente, la proteína es desnaturalizada e introducida en el núcleo 20S para ser degradada⁴⁵.

En el proteasoma han identificado tres actividades enzimáticas diferentes, la de tipo quimotripsina (CT-L), la actividad tipo caspasa (C-L o PGPH -peptidilglutamilo péptido hidrolasa-) y la tipo tripsina (T-L), llevadas a cabo por las subunidades β 5, β 2 y β 1, respectivamente, que se caracterizan por presentar residuos de treonina N-terminales que sirven como centros activos nucleófilos⁴⁶.

La inhibición del proteasoma en las células cancerígenas conlleva la regulación de las rutas proliferativas y anti-apoptóticas. La mayoría de las células tumorales presentan una elevada proliferación, por lo que aumentan la síntesis de proteínas, lo que podría hacerlas más sensibles a la inhibición del proteasoma. Algunos de los mecanismos que se han identificado como causantes del efecto apoptótico de la inhibición del proteasoma en las células tumorales son la inhibición de la actividad de NF- κ B (factor nuclear activador de las cadenas ligeras κ de las células B activadas), la alteración del ciclo celular por la degradación de proteínas reguladoras, alteración del equilibrio entre proteínas anti y pro-apoptóticas, estrés del retículo endoplasmático e inhibición de la angiogénesis y de la reparación del DNA³⁹.

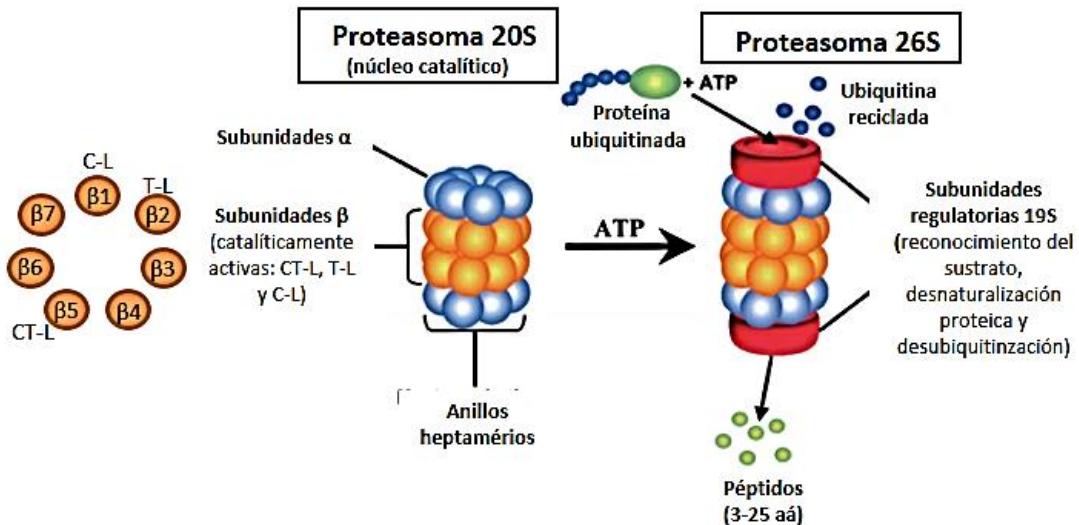


Figura 4. Esquema de la estructura y funcionamiento del proteasoma. El núcleo 20S es un cilindro compuesto por 4 anillos apilados. Los dos anillos exteriores (anillos α) forman, junto a las subunidades regulatorias 19S, un canal lo suficientemente estrecho como para impedir el paso de las proteínas que mantienen sus estructuras secundarias y terciarias. Las proteínas desnaturalizadas por las subunidades 19S entrarán en la cámara catalítica, formada por los dos anillos β interiores, cada uno de los cuales contiene 3 centros activos (β_1 -tipo caspasa o PGPH-, β_2 -tipo tripsina- y β_5 -tipo quimotripsina-) que degradan las proteínas progresivamente, generando pequeños péptidos de entre 3 y 25 aminoácidos.

En los últimos años, se han desarrollado complejos metálicos con ligandos ditiocarbamato específicos contra la subunidad β_5 del proteasoma^{24,47}, ya que se ha comprobado que la inhibición de la actividad CT-L es la más efectiva a la hora de inducir la apoptosis en células cancerígenas⁴⁸.

1.6. Mecanismos de muerte celular

Tradicionalmente, los dos tipos de muerte celular principales han sido la apoptosis y la necrosis, aunque actualmente se conoce que también existen otras vías como la autofagia, la catástrofe mitótica y la necroptosis⁴⁹.

La apoptosis o muerte celular programada conlleva una serie de cambios morfológicos entre los que se encuentran la contracción del citoplasma, la formación de yemas en la membrana o la pérdida de la capacidad de adhesión, tanto a las células vecinas como a la matriz extracelular, todo ello dirigido a la formación de unas estructuras vesiculares denominadas *blebs* que son eliminadas por células fagocitarias. Sin embargo, la necrosis se caracteriza por una ganancia de volumen celular que provocará la rotura de la membrana plasmática y la consiguiente pérdida del contenido citoplasmático. Así, la principal diferencia entre ambos tipos de muerte celular es el hecho de que la necrosis va acompañada por una reacción inflamatoria debido a la salida a la matriz extracelular de los componentes celulares, mientras que en la apoptosis esto no tiene lugar dado que la célula apoptótica es fagocitada por los fagocitos propios del sistema inmune.

Por lo tanto, para tratar de evitar la inflamación asociada a la necrosis y así reducir las molestias del paciente, lo más recomendable es utilizar fármacos que induzcan la vía apoptótica de muerte celular.

La apoptosis, a su vez, puede comenzar por dos vías diferentes que confluyen en la activación de la caspasa 3, principal caspasa ejecutora. Se trata de las vías extrínseca e intrínseca. Mientras que la vía extrínseca requiere de la activación de unas proteínas transmembrana denominadas receptores mortales, la vía intrínseca o mitocondrial no está mediada por receptores, sino que se activa en respuesta a estreses celulares⁵⁰.

Uno de los primeros eventos que se observan al activarse la vía intrínseca es un aumento de la permeabilidad de la membrana externa mitocondrial, que a su vez se traduce en un descenso del potencial mitocondrial (ψ_m)⁵¹. Esta despolarización de la membrana mitocondrial se debe a la activación de proteínas pro-apoptóticas como Bax, que al activarse se une a la membrana mitocondrial externa formando canales. Al producirse este aumento en la permeabilidad el citocromo C, una proteína que se encuentra en el espacio intermembrana de la mitocondria, se libera al citoplasma. Aquí, oligomeriza con Apaf-1, reclutando a la caspasa 9 (caspasa iniciadora) y dando lugar a un complejo llamado apoptosoma⁵⁰. Por último, el apoptosoma activa a la caspasa 3 que acabará produciendo la muerte celular. Es destacable también el descenso en la actividad de las proteínas anti-apoptóticas de la familia BCL, como por ejemplo la proteína Bcl-2, que tiene lugar al activarse esta vía.

2. OBJETIVOS

Teniendo en cuenta todos estos antecedentes, y dado que el número estudiado de complejos de oro(III) con propiedades anticancerígenas es mucho menor que el de complejos de oro(I), además de presentar mecanismos de acción menos conocidos, a la hora de iniciar el desarrollo de este trabajo se plantearon tres objetivos o vías de estudio principales:

- 1.** El estudio del poder citotóxico de diferentes complejos metálicos de oro(III) con ligandos del tipo ditiocarbamato, para así poder determinar sus propiedades anticancerígenas.
- 2.** El estudio del tipo de muerte celular que inducen los compuestos
- 3.** El estudio de las posibles dianas y mecanismos de acción de estos complejos de oro(III).

Para el desarrollo de estos objetivos se han utilizado 9 complejos de oro(III) (figura 5), cuyo efecto citotóxico ha sido testado en células Caco-2/TC7, una línea celular de cáncer de colon humano. Los análisis que se han llevado a cabo para la consecución de los objetivos planteados son los siguientes:

- 1.** Estudios farmacodinámicos realizados mediante ensayos de viabilidad celular (MTT), tanto en células indiferenciadas (cancerígenas) como en células diferenciadas (enterocitos normales).
- 2.** Identificación de vías y proteínas que intervienen en los procesos apoptóticos (inversión de fosfatidilserina, liberación del citocromo C, caspasas, Bax o Blc-2).
- 3.** Análisis de las actividades enzimáticas de la tiorredoxina reductasa y el proteasoma y estudio del daño oxidativo.

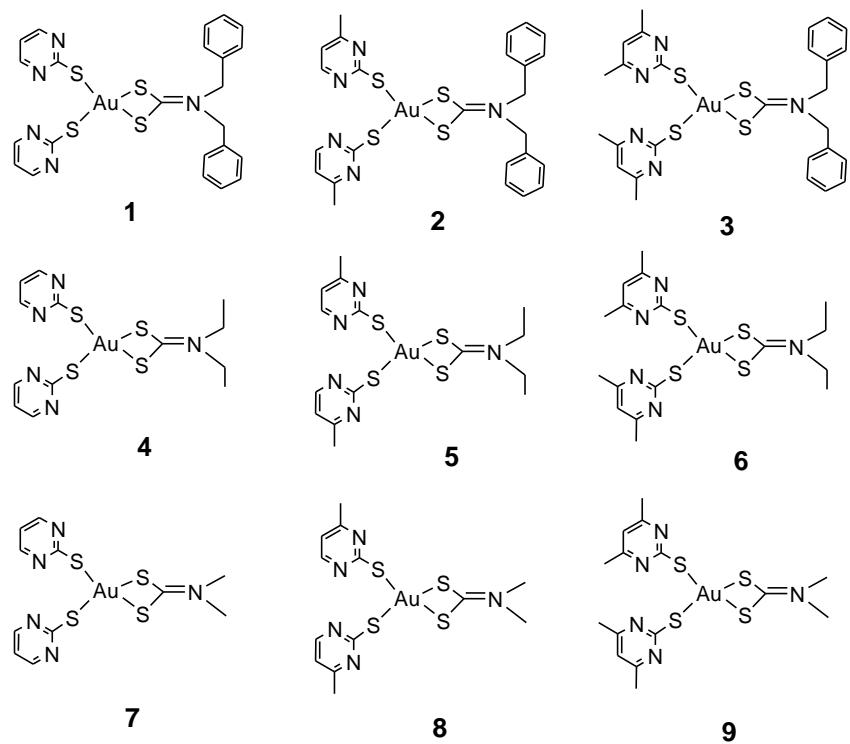


Figura 5. Complejos de oro(III) cuyo estudio se ha abordado en este trabajo

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Complejos de oro(III) y preparación de las disoluciones madre

Los complejos de oro(III) empleados en este trabajo, que habían sido previamente sintetizados en el grupo de la Dra. Elena Cerrada, del Departamento de Química Inorgánica de la Universidad de Zaragoza, son derivados de tres ditiocarbamatos diferentes (S_2CNR_2 , con $R = Me$, Et o CH_2Ph) en combinación con otros tres ligandos tiolato (pirimidina tiolato, metilpirimidina tiolato y dimetilpirimidina tiolato) que proporcionan estabilidad al complejo resultante. En la figura 5 (ver objetivos) se recogen las estructuras de los mismos, así como el número con el que se hará referencia a cada uno de ellos a lo largo del trabajo.

A continuación, se detallan los complejos empleados para el desarrollo del trabajo, que fueron disueltos en DMSO a una concentración de 20 mM (disolución madre):

Complejo 1: $[Au(S\text{Pirimidina})_2(S_2C=NBz_2)]$. PM: 685,48 g/mol.

Complejo 2: $[Au(S\text{MePirimidina})_2(S_2C=NBz_2)]$. PM: 715,50 g/mol.

Complejo 3: $[Au(S\text{Me}_2\text{Pirimidina})_2(S_2C=NBz_2)]$. PM: 747,77 g/mol.

Complejo 4: $[Au(S\text{Pirimidina})_2(S_2C=NEt_2)]$. PM: 566,99 g/mol.

Complejo 5: $[Au(S\text{MePirimidina})_2(S_2C=NEt_2)]$. PM: 595,58 g/mol.

Complejo 6: $[Au(S\text{Me}_2\text{Pirimidina})_2(S_2C=NEt_2)]$. PM: 621,42 g/mol.

Complejo 7: $[Au(S\text{Pirimidina})_2(S_2C=NMe_2)]$. PM: 539,47 g/mol.

Complejo 8: $[Au(S\text{MePirimidina})_2(S_2C=NMe_2)]$. PM: 567,53 g/mol.

Complejo 9: $[Au(S\text{Me}_2\text{Pirimidina})_2(S_2C=NMe_2)]$. Este complejo no se pudo disolver en DMSO, por lo que las características de su disolución madre se detallan a continuación: 9mM (en acetonitrilo, clorometano y acetona). PM: 595,38 g/mol.

Se parte de los productos obtenidos directamente de la síntesis, es decir, de los complejos en forma sólida. Para poder proceder con la realización de los diferentes ensayos, es necesario que los complejos se encuentren en un medio líquido, para lo que se utilizan disolventes orgánicos. Se obtiene así una disolución de concentración conocida (disolución madre) de la que se partirá para elaborar todas las que se requieran posteriormente.

3.2. Línea celular (Caco-2/TC7)

Para ensayar los complejos se ha trabajado con células Caco-2, una línea celular adherente procedente de carcinoma de colon humano. Esta línea presenta la peculiaridad de que, al alcanzar la confluencia, a los 7 días de haber sido sembradas, se diferencian espontáneamente a enterocitos normales⁵², como queda representado en

la figura 6. Además, la cepa utilizada, la TC7, procede de pasajes tardíos (140-150), hecho que se refleja en su estabilidad y homogeneidad.

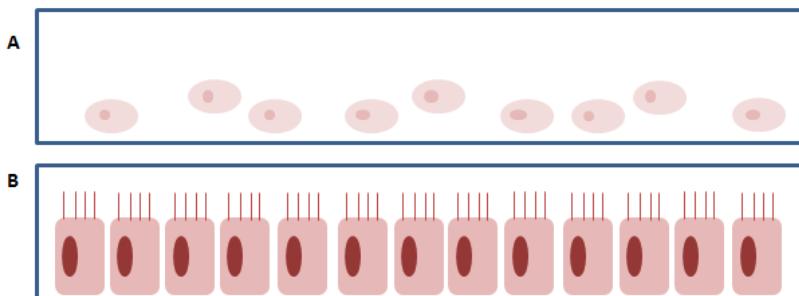


Figura 6. Representación de las células Caco-2/TC7 en estado: (A) indiferenciado (células cancerígenas) antes de entrar en confluencia (B) diferenciados a enterocitos normales una vez se ha alcanzado la confluencia.

3.3. Cultivo celular

El cultivo se ha realizado en una estufa de CO₂ (Haeraeus BB16) a una temperatura de 37°C y una atmósfera humidificada que contiene un 95% de O₂ y un 5% de CO₂. Para el crecimiento celular se empleó el medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle (DMEM) suplementado con suero fetal bovino (FBS) al 20%, aminoácidos no esenciales al 1%, estreptomicina (1000 g/ml) al 1%, penicilina (1000 U/ml) al 1% y anfotericina (250 U/ml) al 1%. Para el cultivo de células tratadas con los complejos se ha utilizado el mismo medio sin el suplemento de FBS. Además, el cultivo debe permanecer siempre en condiciones estériles, por lo que su manipulación se ha llevado a cabo siempre con material estéril y en una campana de flujo laminar vertical de clase II (Telstar AV-100). La tripsinización, para llevar a cabo los cambios de pasaje o las siembras para los ensayos, se realizó utilizando 0,25% tripsina-1 mM EDTA, subcultivando las células en botellas de 25 cm² a una densidad de 300.000 cél/ml.

Los experimentos con células indiferenciadas se llevaron a cabo 24 horas después de la siembra, mientras que la adquisición de la confluencia (80%) se identificó por microscopía.

3.4. Estudios de viabilidad en cultivos 3D. Generación de esferoides

Las células Caco-2 (3.000 células por placa) se mezclaron con una solución de elevada viscosidad de metilcelulosa y se sembraron 100 µl de la suspensión final a cada uno de los pocillos de una placa de 96 pocillos. Los esferoides se dejaron crecer durante 72 horas y posteriormente se incubaron 24 horas con el complejo de oro(III) a distintas concentraciones. Para poder evaluar la viabilidad celular, los esferoides se tiñeron con Hoechst 33342 (4 mg/ml) y yoduro de propidio (4 mg/ml) y se tomaron imágenes de los esferoides gracias a un microscopio confocal (Eclipse Ti, Nikon).

3.5. Estudio de la proliferación celular y determinación del IC₅₀. Ensayo MTT

La inhibición de la proliferación celular fue estudiada mediante la reducción del bromuro de (4,5 dimetil-2-tiazoil)-2,5-difeniltetrazólico (MTT) por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa o ensayo MTT. Se trata de un ensayo colorimétrico que permite medir la funcionalidad mitocondrial de un determinado cultivo y determinar su estado tras ser sometido a un tratamiento que haya podido ejercer un efecto citotóxico sobre éste. La reducción metabólica del MTT en un compuesto coloreado (azul de formazán) permitirá evaluar la actividad de la succinato-deshidrogenasa mitocondrial. De esta manera, se considera que la cantidad de células vivas será proporcional a la cantidad de formazán producido, que midió con un espectrofotómetro.

Para llevar a cabo el ensayo MTT se sembraron, en una placa de 96 pocillos, 100.000 células por pocillo y, tras 24 horas de crecimiento se procedió al tratamiento con diferentes concentraciones de los complejos. Después de 72 horas de incubación se realizó el ensayo MTT, para ello se añadió a cada pocillo 10 µl de reactivo MTT (5mg/ml PBS) y se dejó incubar durante 3 horas. Finalmente, se eliminó el medio de cultivo por inversión y se disolvieron los cristales de azul de formazán en 100 µl de DMSO, para así leer la densidad óptica de la placa a 540 nm en un espectrofotómetro (SPECTROstar Nano, BMG LABTECH).

3.6. Estudios de apoptosis. Doble tinción Anexina V/yoduro de propidio

Para determinar la muerte por apoptosis en las células se recurrió a una tinción doble con Anexina V conjugada al fluorocromo FITC y yoduro de propidio (PI). En primer lugar, se sembraron 600.000 células Caco-2/TC7 en una botella de 75 cm² y se trataron con los complejos durante 24 y 48 horas. Tras la incubación, las células se recogieron y tiñeron con Anexina V-FITC de acuerdo con las instrucciones del fabricante. A continuación, se transfirieron a tubos de citometría de flujo y se lavaron dos veces con tampón fosfato salino (PBS) a temperatura ambiente, se resuspendieron en 100 µl de buffer de unión a Anexina V (10 mM Hepes/NaOH pH 7,4, 140 mM NaCl, 2,5 mM CaCl₂) y se añadieron 5 µl de anexina V-FITC y 5 µl de PI a cada 100 µl de suspensión celular. Tras 15 minutos de incubación a temperatura ambiente y en oscuridad, se añadieron 400 µl de buffer de unión a anexina V 1X y se analizó por citometría de flujo (FACSDIVA BD) durante 1 hora. La intensidad de señal se analizó con FACSDIVA BD.

3.7. Análisis de la activación de las caspasas 3 y 7 mediante microscopía confocal

El primero de los métodos utilizados para estudiar la activación de caspasas se basó en la microscopía confocal de fluorescencia. Para ello, se utilizó reactivo CellEvent™ Caspase-3/7detection (C10423, ThermoFisher). Las células Caco-2/TC7 se sembraron en placas de 96 pocillos a una densidad de 4.000 células por pocillo. Tras la incubación con los complejos durante 3 horas, se retiró el medio y se añadió el reactivo, previamente diluido en PBS (90 µl/ml) dejando incubar durante 10 minutos. Por

último, se utilizó un microscopio de fluorescencia invertido (Eclipse Ti, Nikon) junto a un módulo confocal para observar la fluorescencia en las células. Los filtros de excitación y emisión eran de 488 y 590/50 nm, respectivamente.

3.8. Determinación de la activación de caspasa-3 mediante citometría de flujo

El segundo de los procedimientos se basó en la determinación de la fluorescencia por citometría de flujo. Las células Caco-2/TC7 se sembraron en botellas de 75 cm² a una densidad de 600.000 células por botella. Tras ser incubadas con los complejos de oro las células se fijaron en formaldehído 0,01% durante 15 minutos y se centrifugaron 5 minutos a 300 g y temperatura ambiente. Posteriormente, para provocar la ruptura de las membranas plasmáticas se resuspendió el pellet en 100 µl de digitonina (en PBS 0,5% v/v) y se incubó 15 minutos en oscuridad a temperatura ambiente. Tras la incubación, las células se lavaron con 2 ml de PBS con digitonina (0,1%) y se centrifugaron 5 minutos a 300 g. El sobrenadante se descartó y el pellet se resuspendió en 200 µl de PBS con digitonina (0,1%). A continuación, se añadieron 2 µl del anticuerpo anti-caspasa3 (Novus, Clone C92-605) y se incubó 1 hora a temperatura ambiente. Tras la incubación, las células se centrifugaron 5 minutos a 500 y se lavaron dos veces con PBS. Por último, las células se resuspendieron en 400 µl de PBS y se analizó la fluorescencia a 494 nm (excitación) y 520 nm (emisión) mediante citometría de flujo usando un FACSARRAY BD equipado con una láser de argón.

3.9. Determinación de BAX y BCL-2

El procedimiento seguido es el mismo que el descrito en el apartado anterior (3.8), utilizando en este caso los siguientes anticuerpos:

Anti-Bax (Abcam, T22-A). Excitación: 493 nm; Emisión: 528 nm

Anti-Bcl-2 (Abcam). Excitación: 645 nm; Emisión: 660 nm.

3.10. Cuantificación de la liberación del citocromo C

Las células Caco-2/TC7 se sembraron en botellas de 75 cm² a una densidad de 600.000 células/botella. Tras el periodo de incubación con los complejos de oro, la liberación del citocromo c se determinó según lo descrito por Christensen *et al*⁵³. En primer lugar, las células se resuspendieron en 100 µl de buffer de permeabilización enfriado en hielo (100 mM KCl, 50 µg/ml digitonina en PBS) y se incubaron durante 5 minutos. Después de añadieron 100 µl de paraformaldehído al 4% en PBS y se centrifugó la solución resultante a 500 g durante 5 minutos a 4°C. Se descartó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en paraformaldehído al 4%, incubándose la mezcla 20 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, las células se lavaron tres veces con 200 µl de PBS. El pellet resultante se resuspendió en 200 µl de buffer de permeabilización (0,05% saponina, 3% BSA en PBS) y se incubó 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se añadieron 2 µl del anticuerpo anti-citocromo C (Novus, 1H8.2C12 PE) y se incubó 1 hora a temperatura ambiente. A

continuación, las células se centrifugaron durante 5 minutos a 500 g a temperatura ambiente y se lavaron dos veces con PBS. Finalmente, se resuspendieron en 400 μ l de PBS y la fluorescencia se analizó por citometría de flujo (FACSARRAY BD) a 488 nm (excitación) y 575 nm (emisión).

3.11. Análisis del ciclo celular. Tinción del DNA con yoduro de propidio

Para llevar a cabo este procedimiento se sembraron 600.000 células Caco-2/TC7 en una botella de 75 cm^2 y se trajeron con los complejos durante 24 y 48 horas. Posteriormente, las células se recogieron y se fijaron con etanol 70% enfriado con hielo y se almacenaron 24 horas a 4°C. Pasado este tiempo, se centrifugaron y se rehidrataron con PBS para después teñirlas con PI (50 μ g/ml; la solución final contiene RNasa A 100 μ g/ml). La fluorescencia emitida se analizó con un FACSARRAY BD equipado con un láser de iones de argón. El porcentaje de células en cada fase del ciclo celular se determina usando el software de verificación MODIFIT 3.0.

3.12. Determinación del potencial mitocondrial (Ψ_m)

Las células Caco-2/TC7 se sembraron en botellas de 75 cm^2 a una densidad de 600.000 cél/botella y se incubaron durante 24 horas bajo las condiciones de cultivo estándar. A continuación, se expusieron a la concentración del IC₅₀ de los compuestos de oro durante 24 horas. Posteriormente, las células se lavaron dos veces con PBS atemperado y se resuspendieron en PBS a una concentración de 1·10⁶ cél/ml. Se añadieron a cada muestra 5 μ l de la sonda catiónica yoduro de 1,1',3,3,3'-hexametilindodicarbono-cianina (DiIC₁, 10 μ M) y se incubó 15 minutos a 37°C con un 5% de CO₂. Transcurrido este tiempo se añadieron 400 μ l de PBS a cada muestra y la fluorescencia se analizó por citometría de flujo (FACSARRAY BD) a 633 nm (excitación) y 658 nm (emisión).

3.13. Evaluación de los niveles intracelulares de H₂O₂

Para comprobar si los complejos que se están ensayando en el presente trabajo afectan al equilibrio de los ROS, se va a proceder a determinar sus niveles mediante ensayos de fluorescencia. Se sembraron las células en una placa de 96 pocillos y tras ser incubadas con los complejos de oro(III) se lavaron con PBS. A continuación, se añadieron 100 μ l de DCFH-DA 20 mM en PBS y se incubaron en oscuridad 20 minutos. Transcurrido este tiempo se lavaron dos veces con PBS y se añadieron 100 μ l de PBS en cada pocillo. Finalmente, se analizó la fluorescencia en un espectrofotómetro (FLUOstar Omega, BMG LABTECH), empleando filtros de 485 nm (excitación) y 535 nm (emisión).

3.14. Inhibición de la actividad de TrxR humana purificada

LA TrxRR1 humana recombinante (SIGMA® SRP6081) se incubó con los complejos en placas de 96 pocillos durante 30 minutos a 37°C. Posteriormente, en cada pocillo se añadieron 25 μ l del tampón de reacción (500 μ l de PBS pH7, 80 μ l de EDTA 100mM pH 7,5, 20 μ l BSA 0,05%, 100 μ l de NADPH 20 mM y 300 μ l de H₂O miliQ). Finalmente, se

añadieron 25 μ l de DTNB 20 mM (en etanol puro) para dar comienzo a la reacción y se monitorizó la actividad midiendo la absorbancia a 405 nm cada 60 segundos durante 6 minutos, para lo que se utilizó un espectrofotómetro (SPECTROstar Nano, BMG LABTECH).

3.15. Estudio teórico de interacción complejo-TrxR. Docking

Los dockings fueron realizados por Ruben Laplaza y el Dr. Víctor Polo, del Departamento de Química Física de la Universidad de Zaragoza. Para ello, se utilizaron la estructura cristalográfica de TrxR 3ean (código pdb) refinada con GOLD, además de las estructuras cristalográficas de los complejos de oro (obtenidas por la Dra. Concepción Gimeno del Departamento de Química Inorgánica de la Universidad de Zaragoza). El software empleado para la obtención de los docking se denomina GOLD. La cavidad o *binding site* se restringió a 10 \AA en torno al átomo de Se de SEC498 en la estructura cristalográfica 3ean y en cuanto a la restricción (*constraint*), del átomo de Se de SEC498 al átomo de oro central se favoreció una distancia entre 1,5 \AA y 3,5 \AA . Para la función de *scoring* se realizó un consenso matemático entre CHEMPLP y CHEMSCORE, trabajando con las 10 mejores poses para cada ligando.

3.16. Determinación de la actividad tiol-reductasa de un lisado celular

Las células Caco-2/TC7 se sembraron en placas de 96 pocillos con una densidad de 4.000 células por pocillo y, tras el tratamiento con los complejos durante 24 horas, se añadió a cada pocillo 50 μ l de tampón Tris-HCl (NaCl 5 M, Tris-HCl 1 M pH 8, EDTA 0,5 M pH8, SDS 10%, proteinasa K y PBS) y se incubó 20 minutos en agitación a temperatura ambiente para obtener el lisado celular. Por último, se añaden 25 μ l de tampón de reacción (500 μ l PBS pH 7,4, 80 μ l EDTA 100 mM pH 7,5, 20 μ l BSA 0,05%, 100 μ l NADPH 20 mM, 300 μ l H₂O miliQ) y da comienzo la reacción con 25 μ l de DTNB 20 mM (en etanol puro). La absorbancia a 405 nm se midió cada 60 segundos durante 6 minutos con un espectrofotómetro (SPECTROstar Nano, BMG LABTECH). La actividad thiol-reductasa se normalizó con la cantidad de proteína, determinada por el método de Bradford. Para comparar la actividad tiol-reductasa celular total tras la incubación con los complejos de oro, con la actividad correspondiente tan solo a la TrxR, las células se incubaron también con un inhibidor específico de esta enzima.

3.17. Determinación de la actividad quimotripsina del proteasoma en células

Las células Caco-2/TC7 se sembraron en botellas de 25 cm² a una densidad de 400.000 células por botella y tras la incubación con los complejos de oro, se procedió a la lisis celular. Las células se suspendieron en 400 μ l de saponina 0,05% (en PBS) y se centrifugaron a 13.000 rpm, 15 minutos a 4°C. Tras la centrifugación, se recogió el sobrenadante y se comenzó el ensayo. En una placa de 96 pocillos se añadieron a cada uno de los pocillos 10 μ g de proteína del lisado celular y se completó hasta 100 μ l con tampón de reacción (Tris/HCl 25 mM pH7,5). Por último, se añadió 1 μ l del sustrato de proteasoma N-Suc-L-L-V-T-AMC (SIGMA® SG510) y se incubó a 37°C en oscuridad durante 30 minutos. Se realizaron medidas puntuales de la fluorescencia con un

espectrofotómetro (FLUOstar Omega, BMG LABTECH) con filtros de 360 nm (excitación) y 535 nm (emisión). La cantidad de proteína en el extracto celular se determinó mediante el método de Bradford

4. RESULTADOS

4.1. Capacidad antiproliferativa de los complejos de oro

Para evaluar la citotoxicidad de los diferentes complejos ensayados se determinó el IC_{50} , es decir, la cantidad de complejo que es necesario añadir para reducir en un 50% la población celular, lo que es indicativo de la efectividad a la hora de inhibir el crecimiento celular.

En primer lugar, se estudió el efecto que los complejos ejercían sobre la proliferación de células de carcinoma de colon humano Caco-2/TC7 indiferenciadas tras 72 horas de incubación (tabla 1). Se obtuvieron unos resultados deseables, ya que todos los complejos presentaban un IC_{50} del orden micromolar, por lo que eran capaces de llevar a cabo su actividad citotóxica a bajas concentraciones, disminuyendo así las posibilidades de ocasionar efectos secundarios graves al organismo.

*Tabla 1. Valor IC_{50} determinado por MTT tras incubar las células Caco-2/TC7 con los complejos durante 72 horas. Para ello, el **complejo 1** se ensayó a concentraciones (μM) de 1,25, 2,5, 5, 10 y 20. Para los **complejos 4, 5 y 6** se utilizaron concentraciones (μM) de 0,5, 0,75, 1, 1,5 y 2. Por último, los **complejos 2, 3, 7, 8 y 9** se ensayaron con concentraciones (μM) de 0,5, 1, 2, 2,5 y 5.*

	Complejo 1	Complejo 2	Complejo 3	Complejo 4	Complejo 5
IC50 (μM)	12,55 \pm 1,71	2,40 \pm 1,10	5,00 \pm 0,80	0,70 \pm 0,22	0,56 \pm 0,08

	Complejo 6	Complejo 7	Complejo 8	Complejo 9
IC50 (μM)	1,00 \pm 0,06	3,43 \pm 2,26	1,18 \pm 0,57	5,32 \pm 2,89

A pesar de que todos los complejos de oro presentaban una capacidad antiproliferativa destacable, se seleccionaron 3 de ellos para profundizar en el estudio de su efecto sobre las células. Los escogidos fueron los **complejos 3, 6 y 8**, ya que se quería evaluar si el sustituyente del ligando ditiocarbamato (metilo, etilo o fenilo) podía influir en el modo de actuación de los complejos. Además, la elección del **complejo 3** se vio estimulada por la obtención de su estructura cristalográfica, lo que podría ayudar a entender su mecanismo de acción.

Una vez conocido el IC_{50} en células indiferenciadas (cancerígenas), es de gran interés conocer los efectos sobre el crecimiento celular de estos complejos sobre células normales. Para ello, se determinó el IC_{50} en células Caco-2/TC7 diferenciadas (enterocitos normales), observando un incremento de este valor con respecto al obtenido en células indiferenciadas (tabla 2). Incluso, para todas las concentraciones ensayadas (hasta 50 μM) la viabilidad de estas células no disminuía tras ser tratadas con el **complejo 3**.

Tabla 2. Valor IC_{50} determinado por MTT tras incubar las células Caco-2/TC7 diferenciadas con cada uno de los complejos durante 72 horas.

	Complejo 3	Complejo 6	Complejo 8
IC50 (μ M)	$3,47 \pm 0,29$	$9,86 \pm 0,56$	>50

Además, se estudió si a las concentraciones a las que los complejos eran tóxicos para las células cancerígenas (IC_{50}), la viabilidad de las células no cancerosas también se veía comprometida. En los tres casos se obtuvieron resultados muy adecuados, ya que los complejos, a concentraciones citotóxicas para células cancerígenas, no inhiben la proliferación de los enterocitos normales, incluso la estimulan ligeramente (tabla 3). Por lo tanto, podemos concluir que a concentraciones equivalentes a su IC_{50} los complejos de oro estudiados presentan especificidad por las células cancerígenas, lo que *a priori* disminuiría los efectos secundarios causados en las células sanas.

Tabla 3. Viabilidad de las células Caco-2/TC7 diferenciadas tras ser incubadas con los complejos 3 (5 μ M), 6 (1 μ M) y 8 (1,18 μ M) durante 72 horas.

	Control	Complejo 3	Complejo 6	Complejo 8
Viabilidad	100	$106,59 \pm 1,68$	$111,27 \pm 9,86$	$117,21 \pm 2,17$

Por último, se quiso evaluar el efecto que el IC_{50} de los complejos (calculado a 72 horas) tenía sobre la viabilidad de las células Caco-2/TC7 a distintos tiempos (tabla 4). En los tres casos, el porcentaje de células vivas decrecía a las 48 horas con respecto a las 24 horas. Sin embargo, la capacidad antiproliferativa mostró ser mayor en unos complejos que en otros, siendo el **complejo 6** muy activo desde los primeros instantes del tratamiento, mientras que el **complejo 3** parece ser más lento en su actuación y a las 48 horas de tratamiento sólo consigue reducir la viabilidad en un 19,48%.

Tabla 4. Viabilidad de las células Caco-2/TC7 indiferenciadas tras ser tratadas con los complejos 3 (5 μ M), 4 (1 μ M) y 8 (1,18 μ M) durante 24 horas y 48 horas.

	Control	Complejo 3	Complejo 6	Complejo 8
Viabilidad(24h)	100	$99,81 \pm 1,91$	$32,81 \pm 1,92$	$63,81 \pm 3,84$
Viabilidad(48h)	100	$80,52 \pm 2,18$	$25,38 \pm 5,12$	$38,58 \pm 4,45$

Por último, se quiso profundizar en el estudio antiproliferativo del **complejo 6**, ya que ha mostrado ser el más activo de los 3 complejos seleccionados. Concretamente, se deseaba evaluar su citotoxicidad sobre un cultivo 3D de células cancerígenas, para lo que se ensayaron diferentes concentraciones del complejo en esferoides de células Caco-2/TC7. Este tipo de cultivo se asemeja más a un tejido real y refleja de manera

más fidedigna el ambiente tumoral, por lo que nos ofrece una idea más ajustada a la realidad sobre el poder anticancerígeno de los compuestos.

La viabilidad celular de los esferoides se estudió mediante una tinción doble con Hoechst 33342 (azul) y PI (rojo) que se analizó por microscopía de fluorescencia (figura 7). Se obtuvo un aumento de la fluorescencia roja conforme crecía la concentración del **complejo 6**, lo que indicaba una disminución de la viabilidad (figura 7), ya que sólo las células con la membrana plasmática dañada internalizan el PI. El tinte Hoechst 33342, por su parte, nos permite detectar los núcleos celulares, por lo que se utiliza como tinción de contraste.

Estos resultados confirman los obtenidos en cultivos 2D, ya que el **complejo 6** también comprometió la viabilidad celular de los esferoides, por lo que demostró ser activo frente a las células cancerígenas en un ambiente más semejante al tumoral, aunque el descenso en la viabilidad fue menor que el observado en cultivos 2D.

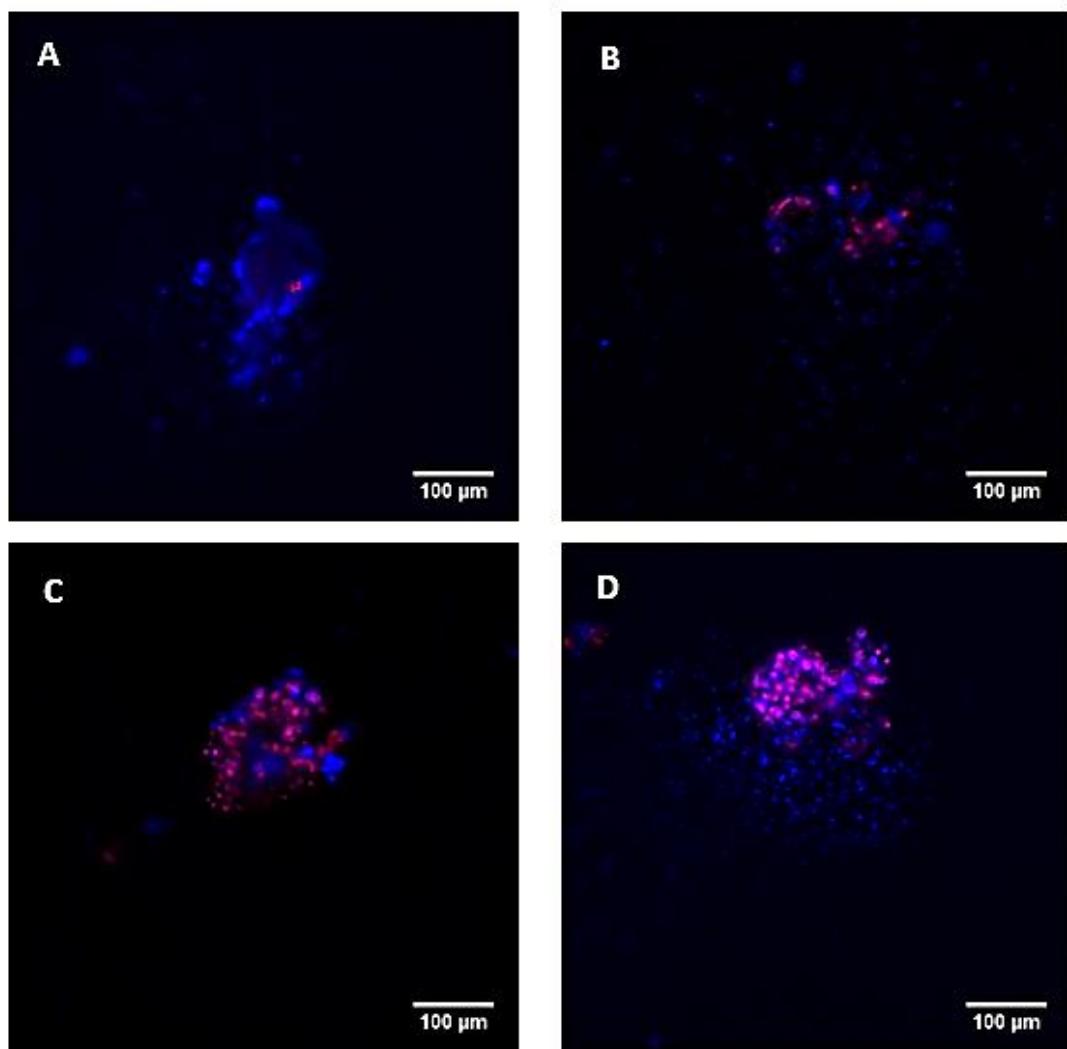


Figura 7. Imágenes de microscopía de fluorescencia de esferoides Caco-2/TC7 tras 24 horas de incubación con el **complejo 6** a diferentes concentraciones: (A) 0 μ M, (B) 1 μ M, (C) 3 μ M y (D) 5 μ M.

4.2. Muerte celular inducida por los complejos de oro

Para estudiar la muerte celular producida por los distintos complejos de oro, se recurrió a la doble tinción de Anexina V y yoduro de propidio (PI), que nos permite identificar las células vivas, las que han entrado en apoptosis e incluso las que han muerto por procesos necróticos. La tinción con Anexina V-PI se basa en la traslocación de la fosfatidilserina (PS), fosfolípido de la monocapa lipídica interior que, cuando la célula recibe un estímulo apoptótico, se expone en la cara externa de la membrana. La Anexina V, que se conjuga al fluorocromo FITC, es capaz de unirse de manera específica a la PS, permitiendo su detección mediante citometría de flujo y el reconocimiento de las células que están sufriendo procesos de apoptosis. El segundo de los elementos de la tinción, el PI, va a ser capaz de atravesar aquellas membranas que se encuentren considerablemente alteradas. Por lo tanto, el PI, que presenta fluorescencia intrínseca, se unirá a los ácidos nucleicos de las células que presenten su membrana dañada, proporcionando una segunda señal de fluorescencia recogida por el citómetro que corresponde a las células muertas.

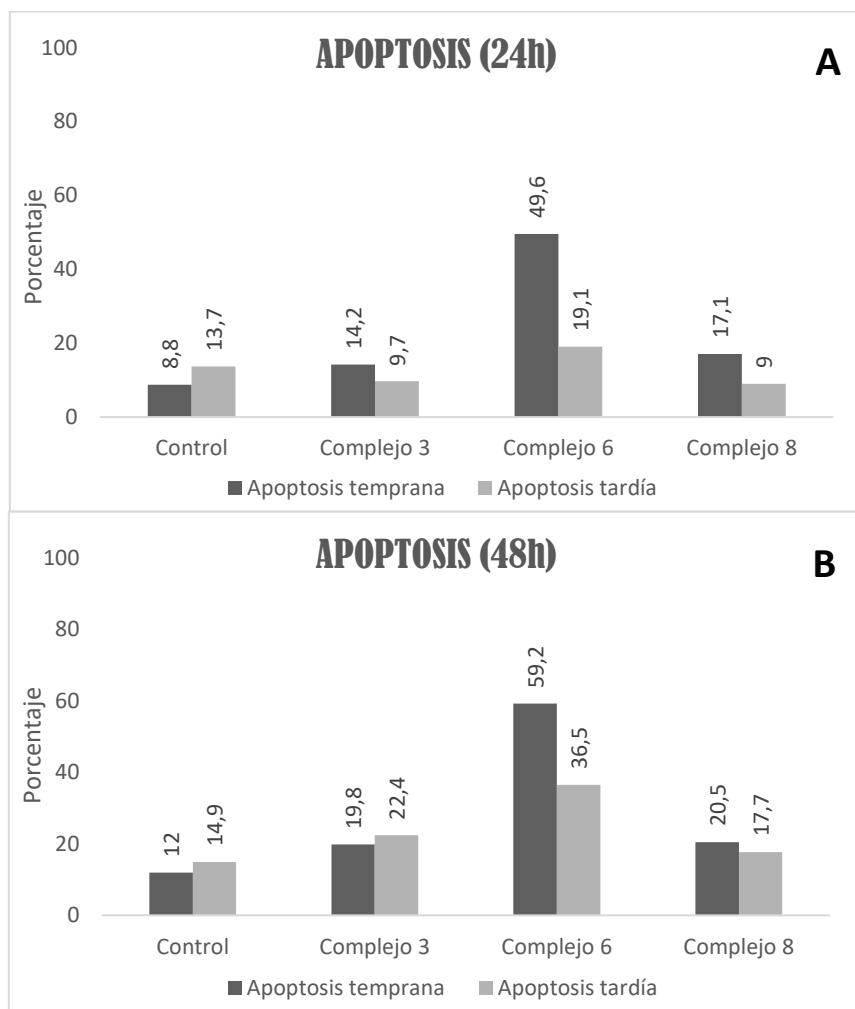


Figura 8. Estudio de los niveles de apoptosis determinados por citometría de flujo tras someter a las células CACO-2/TC7 a un tratamiento con los **complejos 3 (5 M), 6 (1 M) y 8 (1,18 M)** durante (A) 24 horas y (B) 48 horas.

Tras 24 horas de incubación con el complejo 6, las células Caco-2/TC7 ven incrementados los procesos de apoptosis, con casi un 70% de las células expresando PS en la cara externa de la membrana (figura 8A). Debido a que se trata de un corto periodo de tiempo, la mayoría de las células (49,6%) se encuentran en etapas iniciales de la apoptosis, mientras que sólo el 19,1% de las células han llegado a fases más avanzadas en las que ya han sufrido daños en la membrana y, por lo tanto, la muerte celular (figura 8A). Al aumentar el tiempo de tratamiento hasta las 48 h, la cantidad de células bajo procesos apoptóticos crece hasta un 95,7%, además de incrementar la proporción de células en etapas tardías (figura 8B).

En el caso del **complejo 8**, tras 24 horas de tratamiento no se obtuvo el aumento de muerte celular esperado y sólo el 17,1% de las células Caco-2/TC7 se hallaban en etapas tempranas de la apoptosis, por el 8,8% del control (figura 8A). Tras alargar los periodos de incubación a 48 horas, la estimulación del proceso aumentó ligeramente, manteniendo aproximadamente el porcentaje de apoptosis temprana, pero incrementando la apoptosis tardía de un 9% a un 17,7% (figura 8B).

Por último, no parece haber un aumento de la muerte celular tras tratar el cultivo con el **complejo 3** durante 24 horas, ya que se pasa de un 22,5% de células apoptóticas en el control a un 23,9% tras el tratamiento (figura 8A). Tras alargar el periodo de tratamiento, de nuevo parece que se da tiempo al complejo para que actúe e induzca la apoptosis en las células Caco-2/TC7, incrementando hasta el 20,5% las células en las primeras etapas de este proceso (figura 8B). Sin embargo, 48 horas aún no son suficientes para desarrollar procesos más avanzados, ya que sólo el 17,7% de las células presentan daños de membrana, frente al 14,9% en las células tratadas con DMSO.

En vista a los resultados anteriores, se puede afirmar que, con mayor o menor potencia, los complejos de oro estudiados son capaces de inducir la apoptosis en las células Caco-2/TC7. Por lo tanto, se decidió estudiar la expresión de proteínas involucradas en el proceso de apoptosis como son las caspasas 3 y 7, Bcl-2 y Bax.

4.2.1. Activación de caspasas

En primer lugar, se evaluó la capacidad de provocar la activación de las caspasas 3 y 7, dos de las principales caspasas ejecutoras y, por lo tanto, encargadas de finalizar la cadena que culmina con la apoptosis. Para ello, se utilizó el reactivo *CellEvent Caspase-3/7 Green detection reagent*, formado por el péptido DEVD conjugado a una sonda capaz de unirse al DNA. Las caspasas activas van a procesar el péptido, de manera que la sonda se libera y se une al DNA, produciendo una señal fluorescente que podrá detectarse con un microscopio de fluorescencia.

En este caso, se evaluó la activación de caspasas en células Caco-2/TC7 tras 3 horas de incubación con el **complejo 6**, ya que, según los resultados expuestos en la figura 8,

era el que mayor capacidad de inducir apoptosis presentaba. Tras 24 horas, el efecto citotóxico del compuesto disminuía mucho la viabilidad, por lo que la escasez de células dificultaba la determinación de la activación de caspasas por esta técnica, decidiendo así realizar ensayos de 3 horas. Al observar las células al microscopio, se vio un incremento de la fluorescencia verde en algunas de las células tratadas (figura 9), lo que indica presencia de caspasas 3 y 7 activas.

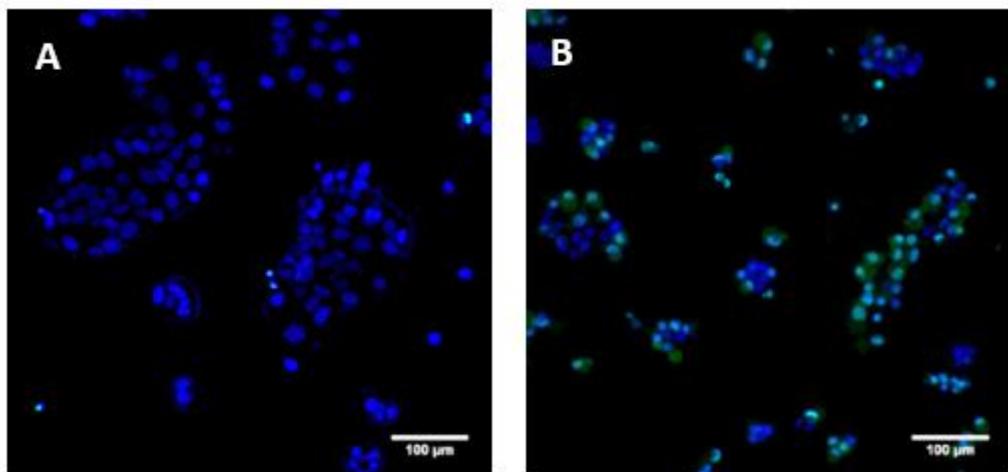


Figura 9. Imágenes de microscopía de fluorescencia para el evaluar la actividad de las caspasas 3 y 7 en células Caco-2/TC7 tras 3 horas de incubación con (A) DMSO (control negativo) y (B) complejo 6 (1 μ M).

En segundo lugar, se procedió a determinar la activación de la caspasa 3 mediante citometría de flujo, ya que esta técnica nos permitiría cuantificarlo con mayor exactitud. La activación de caspasas tras 24 horas aumentaba en 9 veces con respecto al grupo control en las células incubadas con el **complejo 3** y casi 8 y 17 veces en las células tratadas con los **complejos 6** y **8**, respectivamente (figura 10).

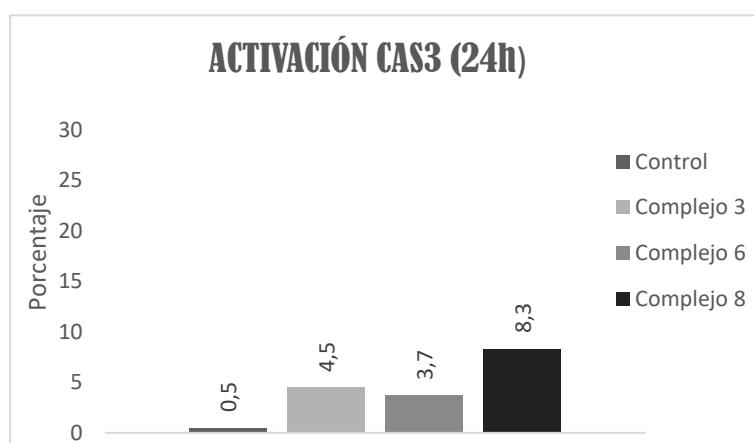


Figura 10. Determinación por citometría de flujo de la activación de la caspasa 3 en células Caco-2/TC7 en respuesta a un tratamiento con los complejos 3 (5 μ M) 6 (1 μ M) y 8 (1,18 μ M).

4.2.2. Expresión de Bcl-2 y Bax

BCL-2 y BAX son dos proteínas anti y pro-apoptóticas respectivamente, por lo que se recurrió a la citometría de flujo para estudiar su expresión en las células Caco-2/TC7 tras ser incubadas durante 24 horas tanto con el **complejo 6** como con el **complejo 8**.

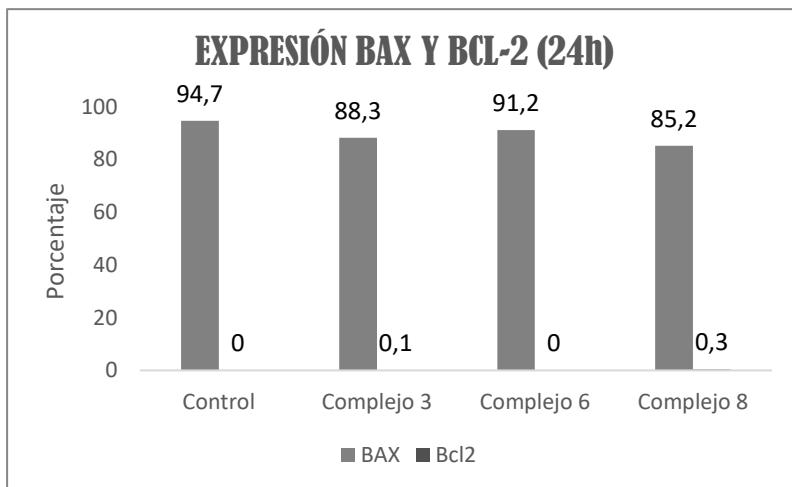


Figura 11. Expresión de BAX y BCL-2 en células Caco-2/TC7 tras ser cometidas a tratamientos con los **complejos 3** (5 μ M), **6** (1 μ M) y **8** (1,18 μ M) durante 24 horas.

Curiosamente, al tratar con los complejos no se observó el aumento esperado de la proteína BAX activa (homodímero BAX-BAX). Esto se debe a que, en el control negativo, los niveles de BAX eran muy elevados, con un 94,7% de las células positivas para la presencia de esta proteína (figura 11), cotas que se mantenían aproximadamente en las células tratadas con los **complejos 3, 6 y 8**. Estos niveles basales tan altos de proteína BAX activa en las células Caco-2/TC7 se podría deber a la mutación E204X de *TP53* una proteína responsable de la regulación positiva de BAX⁵⁴. Esta mutación, característica de las células Caco-2/TC7⁵⁵, afectaría a la capacidad de *TP53* de unirse al DNA e inducir la expresión de BAX.

En el caso de Bcl-2, no se obtuvo presencia de la proteína en ninguno de los cuatro casos ensayados (control negativo y los tratamientos con los **complejos 3, 6 y 8**).

4.2.3. Modificación del potencial de membrana mitocondrial (Ψ_m) y liberación del citocromo c

Con la despolarización de la membrana mitocondrial, ésta se va a alterar y, como consecuencia, se formarán poros por los que el citocromo C podrá ser liberado al citoplasma, iniciando el mecanismo de apoptosis intrínseca que finalizará con la activación de las caspasas ejecutoras. Por lo tanto, y debido a que los **complejos 3, 6 y 8** no parecen ser capaces de romper el equilibrio entre proteínas pro- y anti-apoptóticas (figura 11), se procedió a estudiar si estos complejos de oro podían alterar el Ψ_m desencadenando así la apoptosis. Para determinar el Ψ_m se utilizó la sonda catiónica DiICl(5), capaz de acumularse en las mitocondrias con Ψ intacto, de manera

que cuando ocurre la despolarización, la sonda se libera y disminuye la fluorescencia de DiICl(5), lo que será detectable mediante citometría de flujo.

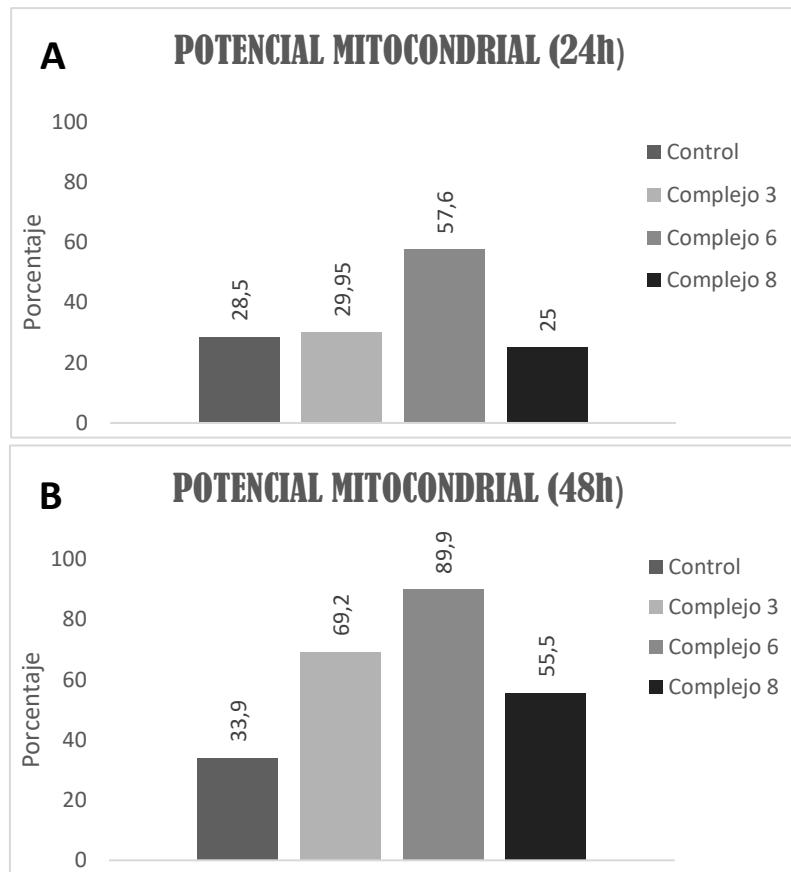


Figura 12. Cuantificación del número de células Caco-2/TC7 que han sufrido despolarización de la membrana mitocondrial, disminuyendo su potencial de membrana (Ψ_m) tras ser sometidas a un tratamiento con los **complejos** de oro **3** (5 μM), **6** (1 μM) y **8** (1,18 μM) tras **(A)** 24 horas y **(B)** 48 horas.

El **complejo 6** de nuevo era el más activo y rápido a la hora de actuar. Tras 24 horas era capaz de duplicar el número de células con el potencial de membrana reducido (figura 12A). Además, tras 48 horas, induce la despolarización de la membrana mitocondrial en el 89,9% de las células Caco-2/TC7 (figura 12B).

Los **complejos 3** y **8**, sin embargo, son más lentos en su actuación y no son capaces de provocar la modificación del Ψ_m transcurridas 24 horas (figura 12A). Es a las 48 horas cuando se observa una disminución del Ψ_m medio en las células tratadas, siendo el **complejo 8** más potente a la hora de inducir la despolarización que consigue duplicar el número de células con el potencial mitocondrial alterado (figura 12B).

Una vez comprobado que los complejos de oro eran capaces de inducir la despolarización de la membrana mitocondrial, se pretendía demostrar si, efectivamente, esto se traducía en una liberación del citocromo C. Para ello, se llevó a cabo una doble permeabilización de las células 24 horas después de ser tratadas con los complejos. Con la primera de estas permeabilizaciones, en la que se emplea

digitonina, la membrana plasmática se desestabilizará, perdiéndose el citocromo C que había sido liberado al citoplasma en primera instancia. Con el uso de saponina se producirá una segunda permeabilización, en este caso de las mitocondrias, por lo que el citocromo C que quedaba en su interior, será liberado al citoplasma. Por último, se evaluarán estos niveles de citocromo C mediante el citómetro de flujo. Por lo tanto, si los complejos de oro inducen la liberación del citocromo C al citoplasma celular, tras las dos permeabilizaciones estos niveles deberán ser inferiores que en las células control sin tratar.

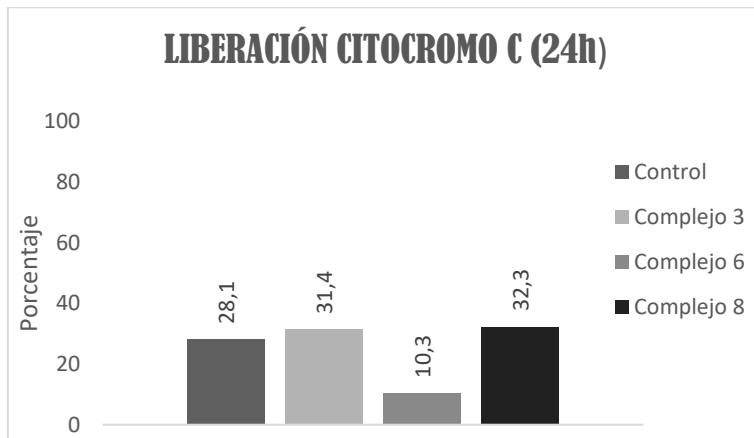


Figura 13. Salida del citocromo C desde la mitocondria al citoplasma en células Caco-2/TC7 tras ser incubadas durante 24 horas con el **complejo 3** (5 μ M) el **complejo 6** (1 μ M) y el **complejo 8** (1,18 μ M).

Con los resultados que se muestran en la figura 13, se puede concluir que, tras 24 horas de tratamiento, el **complejo 6** es capaz de inducir la liberación del citocromo C al citoplasma. Sin embargo, en el caso de los **complejos 3 y 8** el citocromo C se retiene en el interior de las mitocondrias. Estos resultados eran esperados ya que, como se muestra en la figura 12, los **complejos 3 y 8** son más lentos a la hora de actuar y a las 24 horas aún no eran capaces de producir la despolarización de la membrana, mientras que el **complejo 6** sí que disminuía el Ψ_m .

Por lo tanto, los resultados obtenidos hasta el momento parecen indicar que la apoptosis inducida por los compuestos se produce por la vía intrínseca.

4.3. Modificación del ciclo celular

Dado que los **complejos 3, 6 y 8** eran capaces de inhibir la proliferación de las células Caco-2/TC7, se decidió estudiar si estos compuestos eran capaces de producir modificaciones en el ciclo celular, para lo que se analizó el contenido de DNA de las células mediante tinción con PI en un citómetro de flujo. Puesto que el contenido de DNA se duplica durante la fase S, las células en fase G₁/G₀ van a presentar la mitad de fluorescencia que las células en fase G₂/M.

Como se puede observar en la figura 14, tras 24 horas, los complejos de oro **6** y **8** son capaces de provocar la parada del ciclo celular en las fases G_0 y G_1 , por lo que no entrarán en fase S y no duplicarán su DNA para llevar a cabo la división, impidiendo así la proliferación celular. Estos resultados concuerdan con los descritos en otros estudios en los que complejos de oro(III) eran capaces de inducir apoptosis en líneas celulares cancerosas mediante la retención del ciclo celular en G_0/G_1 ⁵⁶. El **complejo 3**, que como ya hemos visto es más lento a la hora de actuar, a las 24 horas aún no sería capaz de detener el ciclo celular.

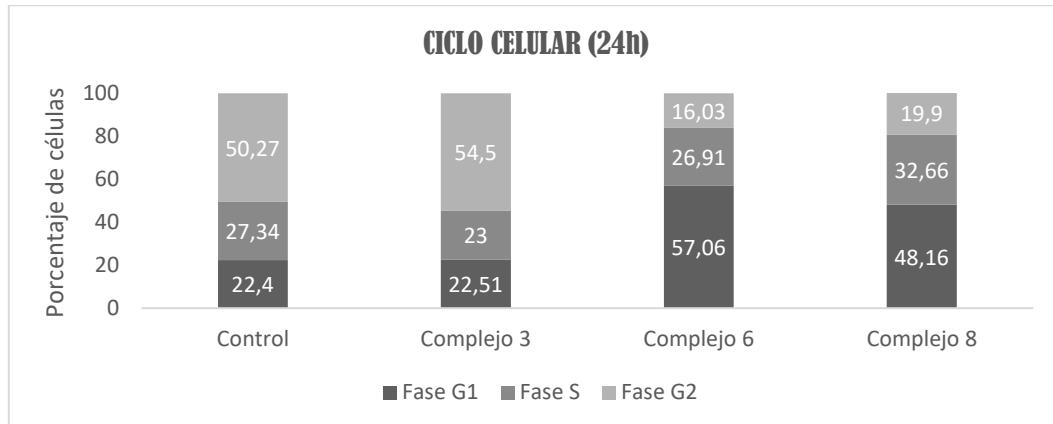


Figura 14. Análisis del ciclo celular en células Caco-2/TC7, tras ser sometidas a tratamientos con el **complejo 3** (5 μ M) el **complejo 6** (1 μ M) y el **complejo 8** (1,18 μ M) durante 24 horas.

4.4. Interacción con la enzima TrxR

Debido a que la TrxR es una de las dianas principales de los complejos de oro, se decidió estudiar la capacidad de nuestros complejos para interferir en la actividad de esta enzima. Con este objetivo, se determinó la actividad enzimática de una muestra de TrxR humana purificada tras ser incubada con los complejos de oro. A la vista de los resultados expuestos en la figura 15, es factible pensar que los complejos ensayados, especialmente los **complejos 6** y **8**, son capaces de inhibir la actividad de esta enzima, lo que en el interior celular se traduciría en un aumento de los niveles de ROS.

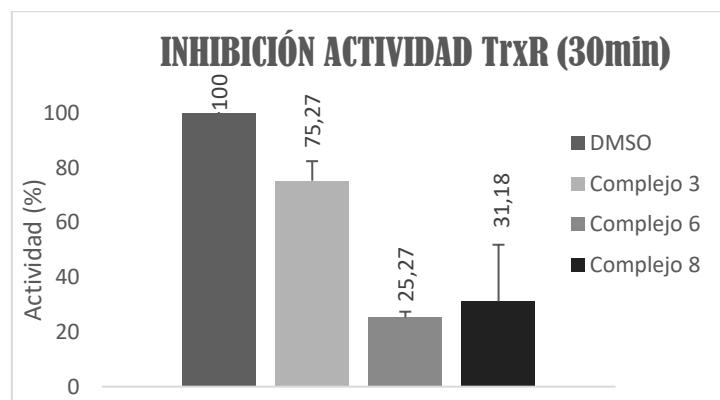


Figura 15. Determinación de la interacción de los complejos de oro con la TrxR. Inhibición de la actividad reductasa de la TrxR humana purificada tras ser incubada con los **complejos 3** (5 μ M), **6** (1 μ M) y **8** (1,18 μ M) durante 30 minutos.

Para apoyar estos resultados experimentales se llevaron a cabo estudios teóricos que permitiesen predecir la interacción existente entre nuestros compuestos metálicos y la enzima TrxR, por lo que se recurrió al docking. Como se muestra en la figura 16, es teóricamente factible que los tres complejos inhibiesen la enzima, ya que el átomo de Au de los compuestos y el átomo de Se de SEC498 quedarían lo suficientemente cercanos como para interaccionar, modificando las características de la región C-terminal, lo que provocaría la desactivación de la enzima y, por lo tanto, la disminución de la actividad que se recogió en los ensayos experimentales.

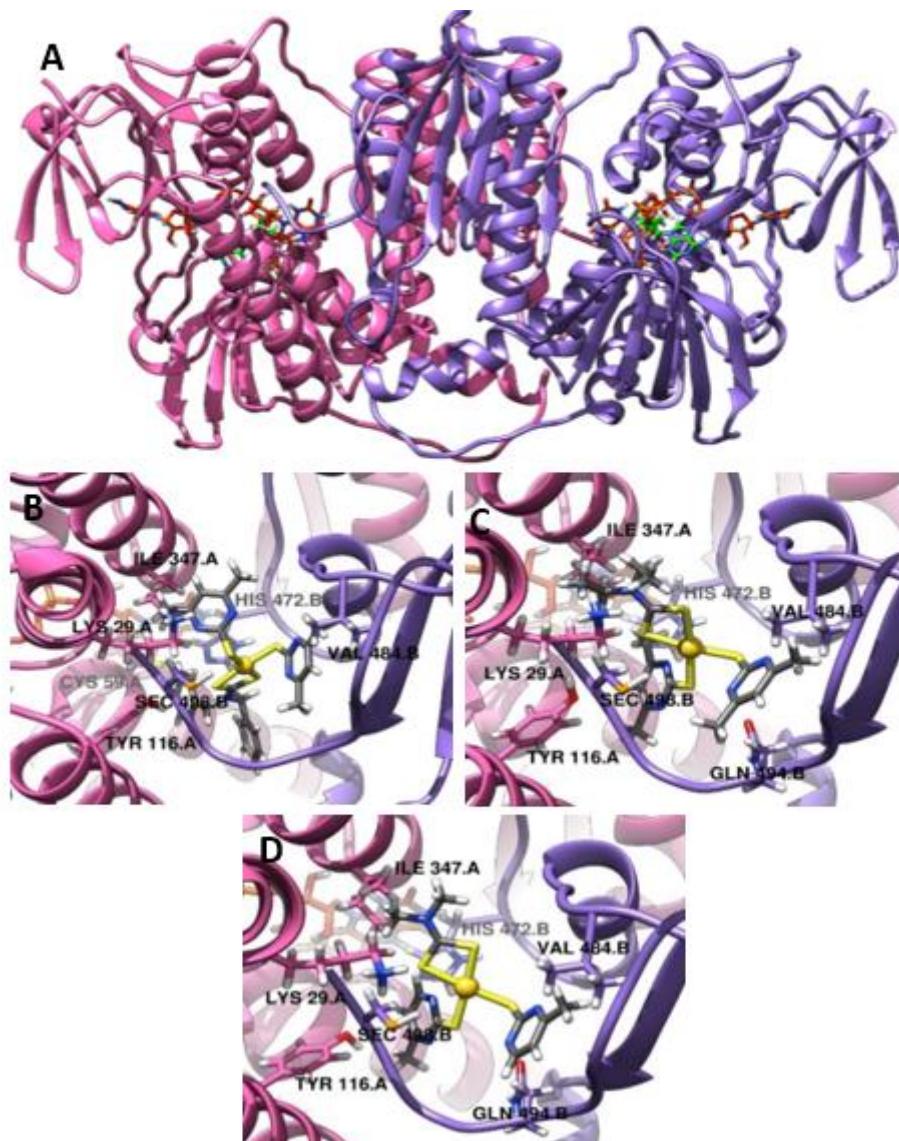


Figura 16. (A) Imagen de las dos cadenas que componen la TrxR (cadena A en rosa y cadena B en púrpura) con el complejo de oro(III) (en verde) introducido en la cavidad correspondiente al sitio activo. El FAD se ha representado en naranja. En las imágenes (B) **complejo 3**, (C) **complejo 6** y (D) **complejo 8**, se presenta la región C-terminal de la cadena B de la enzima, señalando los aminoácidos que, según la predicción realizada, interactuarían con los complejos. Estos residuos son Q494, V484 y H472 de la cadena B e I347, K29, Y116 y C59. Además, cabe destacar la interacción entre el Se de la SEC498.B (representado en naranja) y el átomo de oro (representado con una esfera amarilla) de los complejos.

4.5. Efecto sobre los niveles de ROS en células Caco-2/TC7

A la vista de los resultados observados con la enzima TrxR, el siguiente propósito fue evaluar el efecto que los **complejos 3, 6 y 8** tenían sobre los niveles de ROS, más concretamente H_2O_2 , en las células cancerígenas. Los niveles de H_2O_2 se midieron utilizando una sonda fluorescente (DCFH-DA) sensible a peróxidos, de manera que la fluorescencia detectada será proporcional a los niveles de H_2O_2 .

Como se puede comprobar en la figura 17, los complejos no exhibieron capacidad prooxidante a ninguno de los tiempos ensayados y los niveles de ROS de las células Caco-2/TC7 se mantenían estables tras el tratamiento con los mismos. Estos resultados confrontaban la hipótesis inicial, según la cual, la inhibición de la enzima TrxR provocaría un aumento de los niveles de ROS.

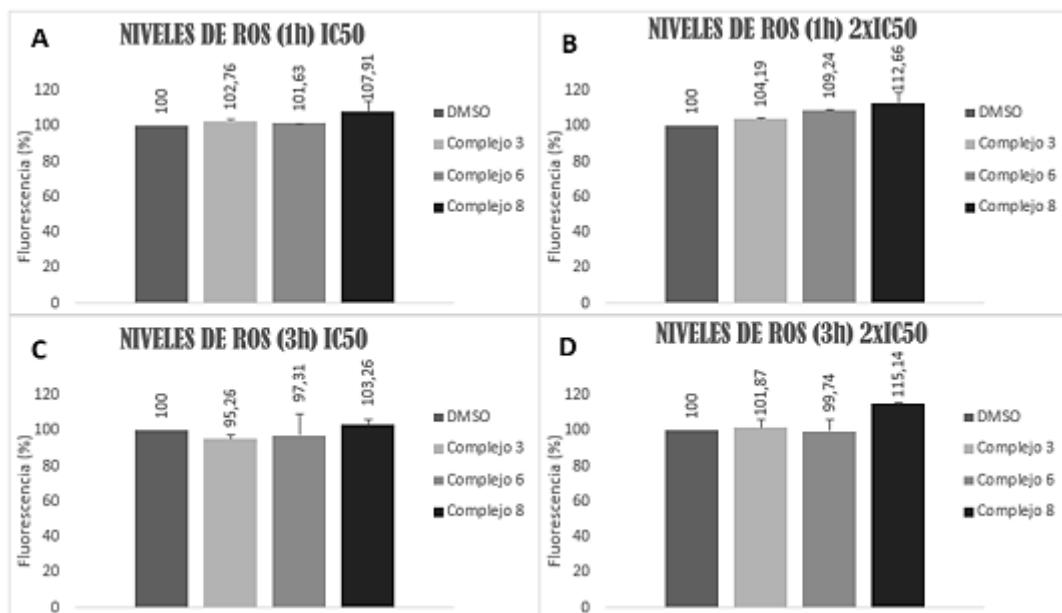


Figura 17. Determinación de la generación de H_2O_2 en células Caco-2/TC7 tras ser incubadas con (A) los **complejos 3** (5 μM), **6** (1 μM) y **8** (1,18 μM) durante 1 hora; (B) los **complejos 3** (10 μM), **6** (2 μM) y **8** (2,36 μM) durante 1 hora; (C) los **complejos 3** (5 μM), **6** (1 μM) y **8** (1,18 μM) durante 3 horas y (D) los **complejos 3** (10 μM), **6** (2 μM) y **8** (2,36 μM) durante 3 horas.

4.5.1. Efecto sobre la TrxR de células Caco-2/TC7

Para intentar resolver este enigma, se procedió al análisis de la actividad de la TrxR de las células cancerígenas previamente tratadas con los complejos de oro. Para ello, se determinó la actividad tiol-reductasa del lisado celular utilizando un ensayo colorimétrico que permite analizar la capacidad de los compuestos para modificar los niveles totales de grupos tioles reducidos y, por lo tanto, inhibir la actividad tiol-reductasa.

Los resultados obtenidos apoyarían los arrojados en los ensayos de determinación de los niveles de ROS, ya que, como se puede observar en la figura 18, los complejos **3, 6 y 8** no son capaces de provocar la inhibición de la TrxR *in vivo*. Por lo tanto, aunque

nuestros complejos tienen la capacidad de inhibir *in vitro* a la TrxR purificada debido a la interacción Au-Se, en el interior celular la afinidad por esta enzima es menor, por lo que los niveles de ROS no se ven alterados.

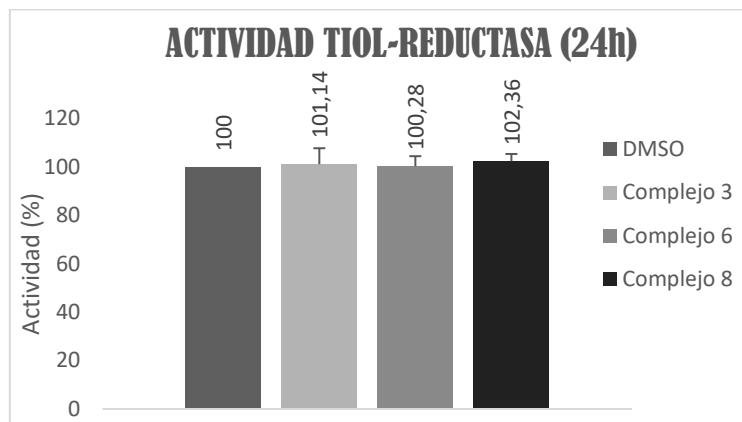


Figura 18. Efecto de los **complejos 3** (10 μ M) **6** (2 μ M) y **8** (2,36 μ M) sobre la actividad tiol-reductasa de un lisado de células Caco-2/TC7 tras 24 horas de incubación.

4.6. Interacción con el proteasoma

Los resultados descritos en el apartado anterior sugieren la existencia de otras posibles dianas por las que, en el interior celular, los complejos metálicos tendrían una mayor afinidad, ejerciendo de este modo su efecto citotóxico. La capacidad que ciertos compuestos metálicos con ligandos ditiocarbamatos presentan para interaccionar con el proteasoma, hace de éste un interesante objeto de estudio como posible diana principal de nuestros complejos de oro.

Para analizar si los **complejos 3, 6 y 8** interaccionan con el proteasoma, inhibiendo su actividad, se realizó un ensayo fluorimétrico en el que se emplea un sustrato fluorogénico (Suc-LLVY-AMC) de la subunidad β 5 del proteasoma que, al ser proteolizado, va a emitir fluorescencia. Por lo tanto, los niveles de fluorescencia se corresponderán con la actividad CT-L del proteasoma.

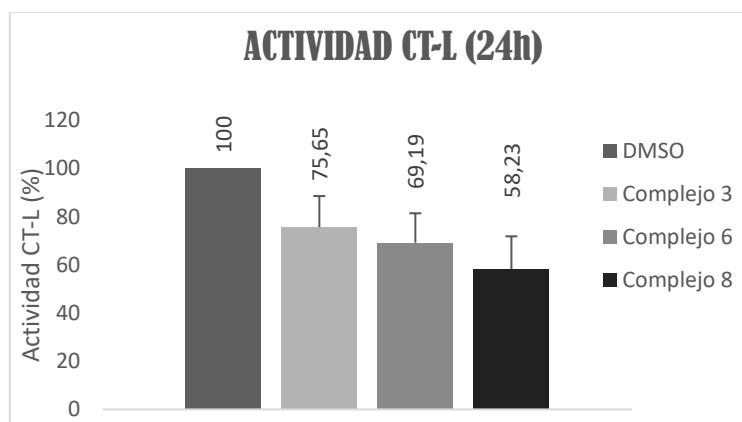


Figura 19. Inhibición de la actividad CT-L del proteasoma de las células Caco-2/TC7 tras 24 horas de tratamiento con los **complejos 3** (5 μ M), **6** (1 μ M) y **8** (1,18 μ M) con respecto al control negativo.

Como se puede observar en los resultados recogidos en la figura 19, tras 24 horas de incubación con los complejos de oro, las células Caco-2/TC7 ven disminuida su actividad CT-L proteasómica. De nuevo, los **complejos 6 y 8** son los más activos, aunque también el **complejo 3** es capaz de reducir la actividad CT-L en un 25%. Estos resultados nos sugieren que, en el ambiente celular, la diana principal de los complejos metálicos objeto de estudio es el proteasoma, cuya actividad se va a ver alterada por la interacción con los complejos, desencadenando una serie de eventos que acabarán con la muerte celular por apoptosis.

5.DISCUSIÓN

Tras el descubrimiento del efecto del *cisplatino* y sus derivados frente a diversas líneas tumorales comenzó el uso de los metales en el tratamiento del cáncer. Los compuestos de platino, aunque efectivos, presentaban numerosos efectos adversos, ya que, debido a su mecanismo de acción, carecen de selectividad frente a las células tumorales. Así, a lo largo de los últimos años se ha buscado encontrar un metal que, manteniendo los efectos antitumorales del platino, redujese sus efectos secundarios, desarrollándose compuestos con diversos metales, tales como cobre⁵⁷, zinc⁵⁸, o rutenio⁵⁹, convirtiéndose el oro en uno de los más prometedores. Por estas razones, en el presente trabajo se ha ensayado una familia de 9 compuestos de oro(III) con ligandos ditiocarbamato, con el objetivo de conocer su potencial uso como agente antitumoral, así como sus mecanismos de acción a la hora de ejercer su efecto citotóxico.

Los 9 complejos resultaron ser activos contra células de carcinoma de colon humano Caco-2/TC7, alcanzándose unos valores IC₅₀ de orden micromolar (tabla 1), similares a los obtenidos para otros complejos metálicos^{58, 60}. De entre los 9 complejos se quiso profundizar en el estudio de tres de ellos, el **complejo 3**, el **complejo 6** y el **complejo 8**, para así poder determinar si el tipo de ligando ditiocarbamato podía influir no sólo en la capacidad citotóxica, sino también en su modo de actuar. Aquellos compuestos con etilo como sustituyente del ditiocarbamato demostraron ser los más activos, mientras que aquellos cuyo sustituyente era un fenilo presentaban valores de IC₅₀ más elevados

El **complejo 6** mostró seguir presentando efecto citotóxico sobre células cancerígenas en cultivos 3D (esferoides), tal y como se observa en la figura 7. Por lo tanto, los compuestos ensayados no sólo demostraron frenar la proliferación celular en cultivos 2D de células Caco-2/TC7 indiferenciadas, sino que también eran capaces de disminuir la viabilidad en un ambiente más semejante al tumoral como es el cultivo 3D, que refleja de un modo más fidedigno el comportamiento de un tejido. Esto, junto a la especificidad que mostraron por las células cancerígenas, ya que, como se recoge en las tablas 2 y 3, sobre células diferenciadas los complejos de oro(III) no sólo aumentaban los valores IC₅₀ con respecto a los obtenidos en células indiferenciadas, sino que la viabilidad celular no se veía comprometida. Por tanto, los complejos de oro(III) estudiados reúnen las dos condiciones iniciales que les hacen perfilarse como potenciales agentes quimioterápicos: potente efecto citotóxico y especificidad por el tejido tumoral.

El análisis del tipo de muerte celular que eran capaces de inducir los compuestos arrojó resultados prometedores, ya que éstos eran capaces de provocar la apoptosis en las células Caco-2/TC7. Sin embargo, los complejos mostraron diferencias en la

celeridad con la que eran capaces de ejercer su acción e inducir la muerte por apoptosis.

El **complejo 6**, que ya había demostrado ser el más activo en los ensayos de proliferación celular, también fue el más rápido a la hora de actuar y 24 horas después de entrar en contacto con las células era capaz de inducir la despolarización de la membrana mitocondrial (figura 12A), lo que provocaría la liberación del citocromo C al citoplasma (figura 13). Una vez en el citoplasma originaría el apoptosoma, que activaría a las caspasas 3 y 7 (figuras 9 y 10), para que estas caspasas ejecutoras acabasen produciendo la muerte celular por apoptosis (figura 8A).

Sin embargo, los **complejos 3 y 8** actuaban de manera más lenta y a las 24 horas aún no eran capaces de disminuir el Ψ_m (figura 12A) y por lo tanto el citocromo C quedaba retenido en el espacio intermembrana (figura 13) y no se inducía la apoptosis (figura 8A). Tras 48 horas, sin embargo, estos dos complejos sí que eran capaces de modificar el Ψ_m (figura 12B) y, en última instancia, producir la apoptosis (figura 8B).

El equilibrio entre proteínas pro-apoptóticas (Bax) y anti-apoptóticas (Bcl-2), no se mostró alterado tras el tratamiento de las células Caco-2/TC7 con los complejos de oro(III) (figura 11), por lo que la despolarización de la membrana mitocondrial debería de producirse por otra razón y no porque los complejos interaccionasen con estas proteínas alterando el equilibrio.

En la búsqueda de la causa de la despolarización mitocondrial se estudió si los compuestos eran capaces de inhibir la enzima TrxR, lo que aumentaría los niveles de ROS mitocondriales y, finalmente, provocaría la modificación del Ψ_m . Los resultados *in vitro* con la enzima TrxR humana recombinante apoyaron esta hipótesis, ya que los complejos de oro(III) eran capaces de disminuir su actividad (figura 15), lo cual luego se contrastó con el análisis teórico de la interacción TrxR-complejo. Los dockings confirmaban los resultados experimentales, ya que los complejos de oro podrían introducirse en la cavidad del centro activo de la enzima debido a la interacción que se produce entre el átomo de Se de la SEC498 de la enzima y el átomo de Au de los complejos (figura 16), provocando la inhibición de la TrxR. Sin embargo, en el ambiente celular esta interacción no parece ser significativa y los complejos no son capaces de inhibir la actividad de la TrxR (figura 18) y, por lo tanto, tampoco se ven alterados los niveles de ROS (figura 17). Esto hacía indicar que, aunque la TrxR es una posible diana de la familia de complejos estudiados, una vez estos se encuentran en el ambiente celular, existe otra proteína por la que tienen mayor afinidad.

Los análisis de la actividad quimotripsina del proteasoma de las células Caco-2/TC7 tras ser tratadas con los complejos, mostraron que éstos eran capaces de inhibir este complejo proteico, concretamente la subunidad $\beta 5$ (figura 19), lo que sugiere que, en el interior de la célula, el proteasoma puede ser la diana principal de nuestros complejos de oro, por delante de otras proteínas como la TrxR.

La progresión a lo largo del ciclo celular se da como resultado de la interacción controlada entre diferentes ciclinas y quinasas dependientes de ciclinas (CDKs)⁶¹. La pérdida de la regulación del ciclo celular va a suponer la entrada en proliferación continua, siendo de vital importancia para el desarrollo del cáncer⁶¹. Muchas de estas proteínas implicadas en la regulación del ciclo celular se encuentran a su vez controladas por el sistema UPS⁴⁵, por lo que el uso de inhibidores del proteasoma tiene importantes consecuencias en el desarrollo del ciclo celular.

Por ejemplo, p27 es un inhibidor de CDKs que inhibe la proliferación celular al detener el ciclo celular en fases G₀ o G₁, ya que es capaz de unirse y bloquear varios complejos ciclina/CDK en el núcleo como ciclina E/Cdk2 (complejo que activa la transcripción de los genes que se requieren para la transición G₁-S y que la células pueda dividirse)⁶². La función como supresor de tumores que presenta p27 puede revertirse y volverse pro-oncogénico si, vía UPS, se pierde el p27 nuclear^{63, 64}, lo que favorecería la progresión a través del ciclo celular y por lo tanto la proliferación celular⁶³ y el desarrollo tumoral. En estos casos, la inhibición del proteasoma evitará la degradación de p27 nuclear e inducirá la parada del ciclo en fases G₀/G₁ (tal y como ocurre con nuestros complejos, figura 14). Además, la acumulación anormal de p27 va a desencadenar el proceso de apoptosis⁴⁸, provocando la muerte de las células tumorales.

Todo esto, junto a los resultados obtenidos, sugiere que los complejos de oro(III) estudiados en este trabajo ejercerían su efecto citotóxico al interaccionar con el proteasoma 26S, inhibiendo la actividad tipo quimotripsina de la subunidad β5. Al bloquearse la función del proteasoma y, por lo tanto, la vía de degradación UPS, la regulación de algunas proteínas implicadas en el control del ciclo celular se vería alterada. Entre estas proteínas se encuentra p27 que dejaría de ser degradada por el proteasoma y se acumularía en el núcleo de las células tumorales, deteniendo el ciclo celular en fases G₀/G₁ y desencadenando la muerte celular por apoptosis.

6. CONCLUSIONES

1. Los nuevos complejos de oro(III) ensayados ejercen un efecto citotóxico sobre las células de carcinoma de colon humano Caco-2/TC7. Además, el **complejo 6** compromete la viabilidad de las células en cultivos 3D.
2. Los **complejos 3, 6 y 8** son inocuos para las células normales (Caco-2/TC7 diferenciadas), considerándose selectivos frente a células cancerosas.
3. Los **complejos 3, 6 y 8** son capaces de inducir la despolarización de la membrana mitocondrial, lo que supondrá la liberación del citocromo C y la activación de las caspasas 3 y 7, desencadenando la muerte celular por apoptosis.
4. Los **complejos 3, 6 y 8** interaccionan con la TrxR humana purificada inhibiendo su actividad. Sin embargo, no son capaces de disminuir la actividad de la enzima con el resto de componentes celulares.
5. Los **complejos 3, 6 y 8** tienen la capacidad de interaccionar con el proteasoma, inhibiendo la actividad quimotripsina del mismo.

6. CONCLUSIONS

1. The nine gold(III) complexes tested exert a cytotoxic effect on colon cancer cells Caco-2/TC7. Moreover, **complex 6** compromises cellular viability in 3D cell culture model spheroid.
2. **Complexes 3, 6 and 8** are relatively innocuous on normal cells (Caco-2/TC7 cells that have reached confluence).
3. **Complexes 3, 6 and 8** are capable of inducing mitochondrial depolarization, releasing cytochrome C that activates caspase 3 and caspase 7. These caspases trigger apoptosis.
4. **Complexes 3, 6 and 8** interact with purified human TrxR, inhibiting its activity. However, they are not capable of decreasing enzyme activity in cellular environment.
5. **Complexes 3, 6 and 8** are able of interacting with the proteasome, inhibiting its chymotrypsin-like activity.

REFERENCIAS

1. Hanahan, D. & Weinberg, R.A. The hallmarks of cancer. *Cell* **100**, 57-70 (2000).
2. Ferlay, J. et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer* **136**, E359-86 (2015).
3. Labianca, R. et al. Colon cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* **74**, 106-33 (2010).
4. Ilyas, M., Straub, J., Tomlinson, I.P. & Bodmer, W.F. Genetic pathways in colorectal and other cancers. *Eur J Cancer* **35**, 335-51 (1999).
5. Marmol, I., Sanchez-de-Diego, C., Pradilla Dieste, A., Cerrada, E. & Rodriguez Yoldi, M.J. Colorectal Carcinoma: A General Overview and Future Perspectives in Colorectal Cancer. *Int J Mol Sci* **18** (2017).
6. Wei, E.K. et al. Comparison of risk factors for colon and rectal cancer. *Int J Cancer* **108**, 433-42 (2004).
7. Lynch, H.T. & de la Chapelle, A. Hereditary colorectal cancer. *N Engl J Med* **348**, 919-32 (2003).
8. Siegel, R.L., Miller, K.D. & Jemal, A. Cancer Statistics, 2017. *CA Cancer J Clin* **67**, 7-30 (2017).
9. Siegel, R.L. et al. Colorectal cancer statistics, 2017. *CA Cancer J Clin* **67**, 177-193 (2017).
10. Wong, E. & Giandomenico, C.M. Current status of platinum-based antitumor drugs. *Chem Rev* **99**, 2451-66 (1999).
11. Cheung-Ong, K. et al. Comparative chemogenomics to examine the mechanism of action of dna-targeted platinum-acridine anticancer agents. *ACS Chem Biol* **7**, 1892-901 (2012).
12. Abrams, M.J. & Murrer, B.A. Metal compounds in therapy and diagnosis. *Science* **261**, 725-30 (1993).
13. Criado, J.J., Manzano, J.L. & Rodriguez-Fernandez, E. New organotrophic compounds. Synthesis, characterization and reactivity of Pt(II) and Au(III) complexes with bile acids: DNA interactions and 'in vitro' anticancer activity. *J Inorg Biochem* **96**, 311-20 (2003).
14. Kosmider, S. & Lipton, L. Adjuvant therapies for colorectal cancer. *World J Gastroenterol* **13**, 3799-805 (2007).
15. Fricker, S.P. Medical uses of gold compounds: past, present and future. *Gold bulletin*, 29-53 (1996).
16. Orvig, C. & Abrams, M.J. Medicinal inorganic chemistry: introduction. *Chem Rev* **99**, 2201-4 (1999).
17. Champion, G.D., Graham, G.G. & Ziegler, J.B. The gold complexes. *Baillieres Clin Rheumatol* **4**, 491-534 (1990).
18. Shaw, I.C. Gold-based therapeutic agents. *Chem Rev* **99**, 2589-600 (1999).
19. Mirabelli, C.K. et al. Evaluation of the in vivo antitumor activity and in vitro cytotoxic properties of auranofin, a coordinated gold compound, in murine tumor models. *Cancer Res* **45**, 32-9 (1985).
20. Zou, T., Lum, C.T., Lok, C.N., Zhang, J.J. & Che, C.M. Chemical biology of anticancer gold(III) and gold(I) complexes. *Chem Soc Rev* **44**, 8786-801 (2015).
21. Sanchez-de-Diego, C. et al. The anticancer effect related to disturbances in redox balance on Caco-2 cells caused by an alkynyl gold(I) complex. *J Inorg Biochem* **166**, 108-121 (2017).
22. Nobili, S. et al. Gold compounds as anticancer agents: chemistry, cellular pharmacology, and preclinical studies. *Med Res Rev* **30**, 550-80 (2010).
23. Massai, L. et al. Organogold(III) compounds as experimental anticancer agents: chemical and biological profiles. *Biometals* **29**, 863-72 (2016).

24. Milacic, V. et al. 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* **66**, 10478-86 (2006).
25. Ronconi, L. et al. Gold(III) dithiocarbamate derivatives for the treatment of cancer: solution chemistry, DNA binding, and hemolytic properties. *J Med Chem* **49**, 1648-57 (2006).
26. Ronconi, L. & Fregona, D. The Midas touch in cancer chemotherapy: from platinum- to gold-dithiocarbamate complexes. *Dalton Trans*, 10670-80 (2009).
27. 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* **12**, 1193-201 (2012).
28. Casini, A. et al. Gold(III) compounds as anticancer agents: relevance of gold-protein interactions for their mechanism of action. *J Inorg Biochem* **102**, 564-75 (2008).
29. Fricker, S.P. Cysteine proteases as targets for metal-based drugs. *Metallomics* **2**, 366-77 (2010).
30. Marzano, C. et al. Inhibition of thioredoxin reductase by auranofin induces apoptosis in cisplatin-resistant human ovarian cancer cells. *Free Radic Biol Med* **42**, 872-81 (2007).
31. Vergara, E. et al. 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* **5**, 96-102 (2010).
32. Romero-Canelon, I. & Sadler, P.J. Next-generation metal anticancer complexes: multitargeting via redox modulation. *Inorg Chem* **52**, 12276-91 (2013).
33. Rigobello, M.P. et al. Gold complexes inhibit mitochondrial thioredoxin reductase: consequences on mitochondrial functions. *J Inorg Biochem* **98**, 1634-41 (2004).
34. Vela, L., Contel, M., Palomera, L., Azaceta, G. & Marzo, I. Iminophosphorane-organogold(III) complexes induce cell death through mitochondrial ROS production. *J Inorg Biochem* **105**, 1306-13 (2011).
35. Lu, J. & Holmgren, A. The thioredoxin antioxidant system. *Free Radic Biol Med* **66**, 75-87 (2014).
36. Engman, L. et al. Thioredoxin reductase and cancer cell growth inhibition by organogold(III) compounds. *Anticancer Drugs* **17**, 539-44 (2006).
37. Zhang, J., Li, X., Han, X., Liu, R. & Fang, J. Targeting the Thioredoxin System for Cancer Therapy. *Trends Pharmacol Sci* **38**, 794-808 (2017).
38. Arner, E.S. et al. Analysis of the inhibition of mammalian thioredoxin, thioredoxin reductase, and glutaredoxin by cis-diamminedichloroplatinum (II) and its major metabolite, the glutathione-platinum complex. *Free Radic Biol Med* **31**, 1170-8 (2001).
39. Crawford, L.J., Walker, B. & Irvine, A.E. Proteasome inhibitors in cancer therapy. *J Cell Commun Signal* **5**, 101-10 (2011).
40. Adams, J. Potential for proteasome inhibition in the treatment of cancer. *Drug Discov Today* **8**, 307-15 (2003).
41. Nencioni, A., Grunebach, F., Patrone, F., Ballestrero, A. & Brossart, P. Proteasome inhibitors: antitumor effects and beyond. *Leukemia* **21**, 30-6 (2007).
42. Almond, J.B. & Cohen, G.M. The proteasome: a novel target for cancer chemotherapy. *Leukemia* **16**, 433-43 (2002).
43. Hershko, A. & Ciechanover, A. The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem* **67**, 425-79 (1998).
44. Chen, Z.J. Ubiquitin signalling in the NF- κ B pathway. *Nat Cell Biol* **7**, 758-65 (2005).
45. Adams, J. The proteasome: structure, function, and role in the cell. *Cancer Treat Rev* **29 Suppl 1**, 3-9 (2003).
46. Kisselev, A.F. & Goldberg, A.L. Proteasome inhibitors: from research tools to drug candidates. *Chem Biol* **8**, 739-58 (2001).

47. Milacic, V. et al. Pyrrolidine dithiocarbamate-zinc(II) and -copper(II) complexes induce apoptosis in tumor cells by inhibiting the proteasomal activity. *Toxicol Appl Pharmacol* **231**, 24-33 (2008).
48. 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* **5**, 1062-75 (1998).
49. Chaabane, W. et al. Autophagy, apoptosis, mitoptosis and necrosis: interdependence between those pathways and effects on cancer. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* **61**, 43-58 (2013).
50. Elmore, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* **35**, 495-516 (2007).
51. Cosentino, K. & Garcia-Saez, A.J. Mitochondrial alterations in apoptosis. *Chem Phys Lipids* **181**, 62-75 (2014).
52. Sambuy, Y. et al. 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* **21**, 1-26 (2005).
53. Christensen, M.E., Jansen, E.S., Sanchez, W. & Waterhouse, N.J. Flow cytometry based assays for the measurement of apoptosis-associated mitochondrial membrane depolarisation and cytochrome c release. *Methods* **61**, 138-45 (2013).
54. Selvakumaran, M. et al. Immediate early up-regulation of bax expression by p53 but not TGF beta 1: a paradigm for distinct apoptotic pathways. *Oncogene* **9**, 1791-8 (1994).
55. Ahmed, D. et al. Epigenetic and genetic features of 24 colon cancer cell lines. *Oncogenesis* **2**, e71 (2013).
56. Tu, S. et al. Gold (III) porphyrin complexes induce apoptosis and cell cycle arrest and inhibit tumor growth in colon cancer. *Cancer* **115**, 4459-69 (2009).
57. Daniel, K.G. et al. Clioquinol and pyrrolidine dithiocarbamate complex with copper to form proteasome inhibitors and apoptosis inducers in human breast cancer cells. *Breast Cancer Res* **7**, R897-908 (2005).
58. Dam, J. et al. Synthesis of copper and zinc 2-(pyridin-2-yl)imidazo[1,2-a]pyridine complexes and their potential anticancer activity. *Eur J Med Chem* **126**, 353-368 (2017).
59. Antonarakis, E.S. & Emadi, A. Ruthenium-based chemotherapeutics: are they ready for prime time? *Cancer Chemother Pharmacol* **66**, 1-9 (2010).
60. Altaf, M. et al. Synthesis, characterization and anticancer activity of gold(I) complexes that contain tri-tert-butylphosphine and dialkyl dithiocarbamate ligands. *Eur J Med Chem* **95**, 464-72 (2015).
61. Vermeulen, K., Van Bockstaele, D.R. & Berneman, Z.N. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif* **36**, 131-49 (2003).
62. 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* **8**, 253-67 (2008).
63. 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* **17**, 12-8 (2011).
64. Pagano, M. et al. Role of the ubiquitin-proteasome pathway in regulating abundance of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27. *Science* **269**, 682-5 (1995).