

GRADO DE BIOTECNOLOGÍA

Estudio de las propiedades anticancerígenas de complejos metálicos de oro

TRABAJO FIN DE GRADO

Autora:

Raquel Álvarez Urdiola

Directoras:

Elena Cerrada Lamuela

María Jesús Rodríguez-Yoldi

ELENA CERRADA LAMUELA Profesora Titular del departamento de Química Inorgánica de la Universidad de Zaragoza

M^a JESÚS RODRÍGUEZ YOLDI Profesora Titular del departamento de Farmacología y Fisiología de la Universidad de Zaragoza

CERTIFICAN

Que el trabajo que se presenta bajo el título “Estudio de las propiedades anticancerígenas de complejos metálicos de oro” ha sido realizado en el departamento de Química Inorgánica de la Facultad de Ciencias y en el departamento de Farmacología y Fisiología de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza, bajo nuestra dirección, autorizando su presentación.

Zaragoza, 26 Junio 2017



Fdo.: Dra. Elena Cerrada Lamuela



Fdo.: Dra. M^a Jesús Rodríguez Yoldi

ÍNDICE

RESUMEN/ <i>ABSTRACT</i>	1
INTRODUCCIÓN.....	2
OBJETIVOS Y ENSAYOS PLANTEADOS.....	6
MATERIALES Y MÉTODOS	
1. Preparación de las disoluciones madre.....	7
2. Cultivo celular.....	7
3. Ensayos de viabilidad celular:	
3.1. MTT.....	8
3.2. SRB.....	8
4. Estudio de interacción con Albúmina Sérica Bovina (BSA).....	9
5. Estudio de ciclo celular.....	9
6. Estudio de apoptosis.....	10
7. Evaluación del potencial mitocondrial.....	10
8. Determinación de BAX, BCL-2 y Caspasa3 por citometría de flujo.....	10
9. Determinación del citocromo c por citometría de flujo.....	11
10. Determinación del nivel de especies reactivas de oxígeno (ROS).....	12
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
1. Ensayos de viabilidad celular:	
1.1. MTT.....	13
1.2. SRB.....	14
2. Estudio de interacción con Albúmina Sérica Bovina (BSA).....	14
3. Estudio de ciclo celular.....	18
4. Estudio de apoptosis.....	18
5. Evaluación del potencial mitocondrial.....	19
6. Determinación de BAX, BCL-2 y Caspasa3 por citometría de flujo.....	20
7. Determinación del citocromo c por citometría de flujo.....	21
8. Determinación del nivel de especies reactivas de oxígeno (ROS).....	22
CONCLUSIONES/ <i>CONCLUSIONS</i>	23
REFERENCIAS.....	24
ANEXO.....	26

ABREVIATURAS

BSA	Albúmina sérica bovina
DCFH-DA	Diacetato-diclorofluoresceína
DMEM	Medio mínimo esencial de Eagle Dulbecco modificado
DMSO	Dimetilsulfóxido
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
HSA	Albúmina sérica humana
Ibu	Ibuprofeol
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
PBS	Tampón fosfato salino
PhBu	Fenilbutazona
PI	Ioduro de propidio
PS	Fosfatidil serina
PTA	1,3,5-triaza-7-fosfaadamantano
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SFB	Suero fetal bovino
SRB	Sulforrodamina B
TCA	Ácido tricloroacético
UV	Ultravioleta
Vis	Visible
ψ_m	Potencial mitocondrial

RESUMEN

Hoy en día, el cáncer es uno de los trastornos más investigados debido a su alta incidencia y al desconocimiento sobre su aparición y desarrollo. Entre los diferentes tipos de tumores cabe destacar el cáncer de colon, uno de los cuatro más mortales y el tercero de mayor incidencia.

Los efectos secundarios y la falta de efectividad de los principales tratamientos contra el cáncer, radioterapia y quimioterapia, hacen que sea necesario continuar con la investigación para encontrar nuevos fármacos. La mayoría de agentes quimioterápicos empleados actualmente son moléculas orgánicas, pero los compuestos basados en metales son una clase de drogas relativamente nueva y prometedora. Un ejemplo de ellos son los compuestos organometálicos de oro.

Para este trabajo se ha probado la citotoxicidad sobre células de cáncer de colon humano (Caco-2/TC7) de diferentes compuestos, concretamente complejos de oro(I) con PTA (1,3,5-triaza-7-fosfaadamantano) y alquino derivados de flavonas, así como de las correspondientes flavonas precursoras de los mismos. Se buscaba comprobar si la efectividad de los compuestos flavona-complejo es mayor que la de cada componente por separado.

Como la mayoría de los fármacos antitumorales se administran por vía intravenosa, se ha comprobado la posible interacción de algunos de los compuestos con uno de los componentes mayoritarios de la sangre: la albúmina sérica. Los resultados parecen indicar que pueden ser transportados por esta proteína.

Además de conocer la toxicidad de los compuestos, interesa saber cuál es el mecanismo que conduce a la muerte celular, para lo que se han llevado a cabo diversos experimentos. El estudio se ha centrado en el complejo que mejores resultados ha dado en las pruebas de citotoxicidad y de unión a albúmina. Este complejo produce apoptosis por vía intrínseca en las células tumorales.

ABSTRACT

Nowadays, cancer is one of the most investigated disorders due to its high incidence and the ignorance about its occurrence. Colorectal cancer stands out because it is one of the four deadliest kinds of cancer and the third most diagnosed.

The side-effects and the lack of effectivity of the principal treatments against cancer, radiotherapy and chemotherapy, make necessary to continue with the research of new medicines. Most chemotherapeutics currently employed are organic molecules, yet metal-based compounds are a new promising class of drugs. Gold organometallic complexes are a good example.

In the present work, different compounds have been tested on human colon cancer cells (Caco-2/TC7). The tested derivatives include alkynyl gold(I) complexes derived from flavones with the water soluble phosphane PTA (1,3,5-triaza-7-phosphaadamantane) and the corresponding flavones as precursors. The objective was proving whether the efficacy of the flavone-complex compounds is greater than the separate components.

Considering that most anticancer drugs are intravenously administered, it has been studied the possible interaction between the compounds and one of the principal blood components: serum albumin. The results seem to indicate that this protein could act like a carrier for these complexes.

Besides knowing the toxicity of the compounds, it is also interesting to determine the mechanism that leads to cell death. The Complex 4 has been the centre of the research because of its good cytotoxicity and albumin-quenching results. Thanks to this complex, tumour cells undergo apoptosis via intrinsic pathway.

INTRODUCCIÓN

El **cáncer** se define clínicamente como la combinación de dos procesos. Por una parte, el crecimiento celular incontrolado en un tejido sólido, dando lugar a células que van perdiendo poco a poco su morfología normal y formando un tumor o neoplasia. Por otra, la capacidad de dichas células de invadir otros tejidos, es decir, de producir metástasis.

La combinación de ambos procesos caracteriza los tumores *malignos*, mientras que si solo se da el primero, el tumor se considera *benigno* y, generalmente, puede extirparse de forma completa. Así pues, el problema fundamental del cáncer, no es tanto que las células crezcan, sino que abandonen su tejido de origen para invadir otros viajando por los vasos sanguíneos o vasos linfáticos. En estos casos forma tumores secundarios o metástasis en diferentes lugares del cuerpo. Cuanto más se disemina el cáncer, más difícil es de erradicar.

A nivel molecular, el desarrollo de esta enfermedad está relacionado con la activación de los **oncogenes** y la inactivación de los **genes supresores de tumores**. El proceso de formación de un tumor a partir de una célula implica la acumulación sucesiva de modificaciones en los genes durante el periodo de crecimiento hasta que se hace aparente (1). Aunque se desconoce la secuencia concreta de procesos que tiene lugar, *in vitro* se ha determinado que es necesaria la alteración de al menos cuatro rutas diferentes para transformar una célula normal en una tumoral: mutaciones en la telomerasa, inactivación de las proteínas p53 y pRB (control del ciclo celular) y activación del oncogén *ras* (2). Sin embargo, hay muchos factores que pueden causar cáncer además de las alteraciones genéticas, como la edad, el modo de vida, la exposición a carcinógenos e incluso algunos virus.

Entre los múltiples tipos de cáncer, cabe destacar el **carcinoma**, ya que supone cerca del 90% de los casos. Se trata de un tumor maligno originado en células de tipo epitelial o glandular (adenocarcinoma), las más susceptibles de sufrir las transformaciones mencionadas por su mayor tasa de división.

El **cáncer de colon** es un adenocarcinoma y se encuentra entre los cuatro más mortales. Está causado por mutaciones en oncogenes, genes supresores de tumores y genes relacionados con mecanismos de reparación del DNA (3).

Hay varias formas de tratar el cáncer colorrectal, dependiendo de su tipo y etapa. Por una parte están las llamadas *terapias locales*, que tratan el tumor sin afectar al resto del organismo (cirugía, radioterapia y ablación o embolización) y son las más empleadas y eficaces en etapas tempranas. Por otra parte, existen las *terapias sistémicas*, que consisten en la administración oral o intravenosa de medicamentos (quimioterapia y terapia dirigida) (4).

Complejos metálicos en el tratamiento del cáncer

La mayoría de los tratamientos de quimioterapia se basan en derivados orgánicos, pero desde hace años se está investigando en el tratamiento con complejos metálicos diversos.

Los **complejos metálicos** son sustancias químicas formadas por un metal, que se encuentra en el centro del compuesto, enlazado a otras moléculas que pueden ser orgánicas o inorgánicas, denominadas *ligandos*. Se denominan **complejos organometálicos** aquellos en los que el metal está coordinado directamente con un átomo de carbono que forma parte de una molécula orgánica.

La gran ventaja de este tipo de complejos es que los ligandos pueden coordinarse en las tres dimensiones, lo que les permite interactuar de forma altamente específica con las dianas terapéuticas. Esto, junto con su amplio espectro de números de coordinación, diferentes estados de oxidación y sus propiedades cinéticas hacen que los complejos metálicos ofrezcan un mayor abanico de mecanismos de acción que los agentes orgánicos (5).

En los años 60 se descubrió el **cisplatino** ($\text{cis-}[\text{PtCl}_2(\text{NH}_3)_2]$), que era capaz de inhibir la división de *Escherichia coli*, y en los 70 se estableció su eficacia en el tratamiento para pacientes humanos con cáncer. Desde entonces se han sintetizado y probado miles de derivados de platino contra células cancerosas. Sin embargo, son muchos menos los que han llegado a la fase de ensayos clínicos y a emplearse realmente en clínica. Los más relevantes son solo cuatro: cisplatino, carboplatino, oxaliplatino y nedaplatino (6,7).

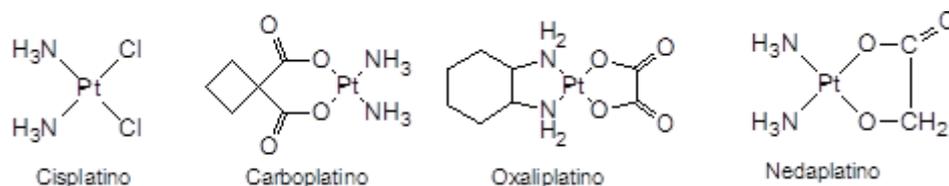


Figura 1. Complejos de platino empleados en quimioterapia.

La eficacia del *cisplatino* contra el cáncer parece estar relacionada con la inhibición de la síntesis y reparación del DNA por modificaciones de su estructura tridimensional. La replicación se ve impedida y se produce la muerte celular por apoptosis, tanto en células cancerosas como en sanas. Por ello, una de las grandes limitaciones de este compuesto es su toxicidad a nivel sistémico y los efectos secundarios del tratamiento, tales como toxicidad renal, hepática y sordera. Además se pueden desarrollar resistencias al tratamiento y el espectro de acción es bastante limitado, ya que solo pequeñas cantidades alcanzan el DNA, mientras que la mayoría queda en el plasma sanguíneo y el citosol, afectando a proteínas y enzimas.

Ciertos derivados similares al *cisplatino* han resuelto algunos de estos problemas, pero no son totalmente efectivos, solo un número limitado de tumores pueden tratarse con este tipo de fármacos basados en platino. Por eso actualmente continúa la investigación en este campo, buscando el desarrollo de fármacos que sean menos tóxicos y más eficientes.

En concreto se han dedicado muchos esfuerzos al diseño racional de agentes antitumorales basados en metales potencialmente útiles en quimioterapia. Algunos son los recogidos en la Figura 1 y otros son complejos de metales tales como titanio, rutenio y oro (5–8).

El uso medicinal del **oro**, conocido como *crisoterapia*, tiene su origen en la medicina tradicional china y árabe, en el 2500 AC. Desde principios del siglo XX se ha empleado como agente bacteriostático en el tratamiento de la tuberculosis y desde hace cerca de 80 años, para tratar la artritis reumatoide. En la Figura 2 se recogen las estructuras de los complejos empleados contra esta última dolencia. Más recientemente se ha considerado su actividad anti-VIH y antitumoral. El interés por el oro como anticancerígeno se ha visto estimulado por observaciones como el hecho de que el oro(III) es isoelectrónico (configuración d^8) con respecto al platino(II) y forma complejos de estructura plano-cuadrada similares. Además se ha observado alta toxicidad frente a numerosas líneas celulares tumorales de compuestos de oro(I), oro(III) y también nanopartículas/nanorods de oro, lo que ha llevado al desarrollo de una cantidad importante de nuevos complejos con variaciones tanto en el estado de oxidación del metal, como en los ligandos (6,7,9).

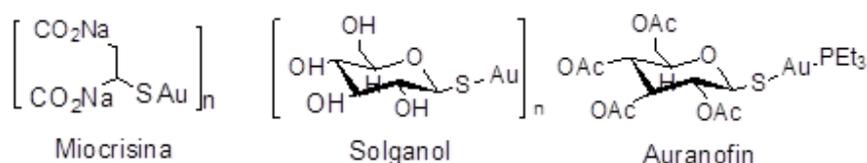


Figura 2. Complejos de oro empleados en crisoterapia.

Las especies más prometedoras son complejos de oro(I y III) con ligandos del tipo ditiocarbamato, complejos de oro(I) con ligandos fosfina, así como complejos organometálicos de oro(I) y oro(III). Estos últimos, en concreto los que incorporan ligando de tipo alquino y moléculas fosfina en la esfera de coordinación del metal, destacan por su estabilidad y solubilidad en disoluciones acuosas, además de por su alta actividad anticancerígena, por lo que en la actualidad están siendo ampliamente estudiados (5,7,10,11).

En cuanto al **mecanismo de acción**, la diana de los derivados de oro aún se está debatiendo. Investigaciones recientes asocian su citotoxicidad con su habilidad para alterar las funciones mitocondriales a través de interacciones con determinadas enzimas (tioredoxina reductasa, TrxR) relacionadas con la defensa frente al daño oxidativo y con mecanismos de señalización de tipo redox (12). Por otro lado, las propiedades antiproliferativas de los aductos de oro(I) y oro(III) podrían relacionarse con interacciones débiles con el DNA (9).

Centrando la atención en los **compuestos de oro(I)**, cabe destacar la citotoxicidad de algunos tiolato fosfina complejos de oro(I) análogos al *auranofin*, los cuales muestran una actividad anticancerígena equiparable a la del *cisplatino* en varios tipos de células cancerosas. Aunque en algunos de estos últimos complejos se han observado efectos tóxicos en el corazón, hígado y riñones de animales como perros Beagle y conejos, que se atribuyen a perturbaciones en el funcionamiento normal de las mitocondrias (6,7,9), los estudios en general han sido lo suficientemente interesantes como para garantizar que continúe la investigación, ya que se han encontrado algunos con mucha menos toxicidad y con actividad antitumoral entre moderada y alta.

Flavonas en el tratamiento del cáncer

Los **flavonoides** son un conjunto de metabolitos secundarios de las plantas sintetizados a partir de una molécula de fenilalanina y tres de malonil-coenzima A, cuyo producto se cicla gracias a una enzima isomerasa.

Son una familia muy diversa de compuestos, aunque todos los productos finales se caracterizan por ser polifenólicos y solubles en agua. Han sido clasificados según su estructura molecular, que consiste en dos anillos de benceno unidos por una cadena lineal de tres carbonos formando un heterociclo oxigenado (Figura 3). Se ingieren de forma normal en la dieta, estando presentes en semillas, verduras y frutas, especialmente en el género Citrus.

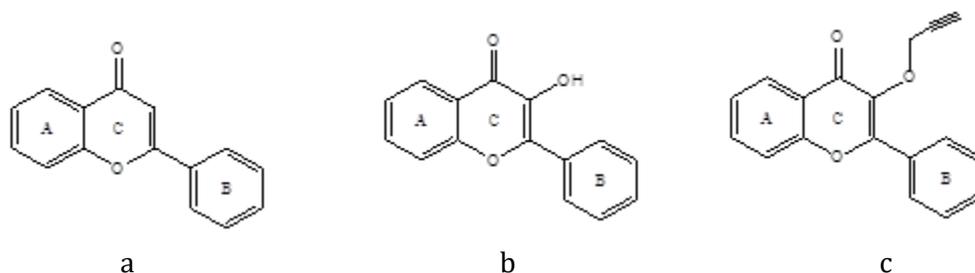


Figura 3. Estructura de las flavonas, 3-hidroxi flavonas y el éter derivado donde A-C son anillos fenilo y piranilo fusionados y B un fenilo unido al anillo C.

Muestran propiedades beneficiosas para la salud humana porque interaccionan con diversas dianas celulares, destacando sus propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, antivirales y anticancerígenas (13). Juegan un papel fundamental en muchos mecanismos moleculares de quimiopreención por su interacción con diferentes tipos de genes y enzimas, siendo igualmente importantes en quimioterapia. Muchos de estos mecanismos se han identificado, por ejemplo la inactivación carcinogénica, efectos anti-proliferativos, detención del ciclo celular, inducción de la apoptosis, inhibición de la angiogénesis, efectos antioxidantes y reversión de multirresistencias, así como una combinación de los citados mecanismos (14,15).

En nuestro grupo de trabajo se ha sintetizado una familia de alquino complejos de oro(I) derivados de flavonas en los que el centro de oro se encuentra coordinado a la fosfina soluble en agua PTA (1,3,5-triaza-7-fosfaadamantano) obtenidos tras la alquilación de 3-hidroxi flavonas (Figura 3b) con bromuro de propargilo, generando el correspondiente éter derivado (Figura 3c). Dada la estabilidad de estos complejos y con los antecedentes comentados en esta introducción, decidimos testear su actividad antitumoral frente a células de cáncer de colon, así como determinar su posible mecanismo de acción.

OBJETIVOS Y ENSAYOS PLANTEADOS

Partiendo entonces de estos antecedentes, los objetivos planteados al principio este trabajo son los siguientes:

- Estudio de las posibles **propiedades antitumorales** de una familia de alquino complejos de oro(I) derivados de 3-hidroxi flavonas.
- Comparación de la actividad de los nuevos complejos de oro con la que presentan los precursores de los mismos, es decir, las flavonas libres, así como el precursor de la unidad Au-PTA ([AuCl(PTA)]).
- Estudio de los posibles **mecanismos de acción** de uno de estos complejos metálicos para comprender su posible efecto anticancerígeno.

Para el desarrollo de estos objetivos, se han utilizado cuatro flavonas (Figura 4a) y los correspondientes alquino complejos de oro(I) derivados de las mismas (Figura 4b). Su actividad se ha testeado en células de carcinoma de colon humano Caco-2/TC7.

Ensayos llevados a cabo:

- Viabilidad celular (MTT y SRB) para definir la actividad y perfil de los productos.
- Estudios de apoptosis, ciclo celular y potencial mitocondrial para determinar la toxicidad *in vitro*.
- Estudios de diferentes proteínas relacionadas con los procesos apoptóticos para concretar la vía de muerte celular (BCL2, BAX y Caspasa 3).
- Estudios de daño oxidativo mediante la determinación de las especies reactivas de oxígeno (ROS).
- Interacción con albúmina sérica bovina (BSA), que podría tener un papel importante en la biodistribución del complejo *in vivo*.

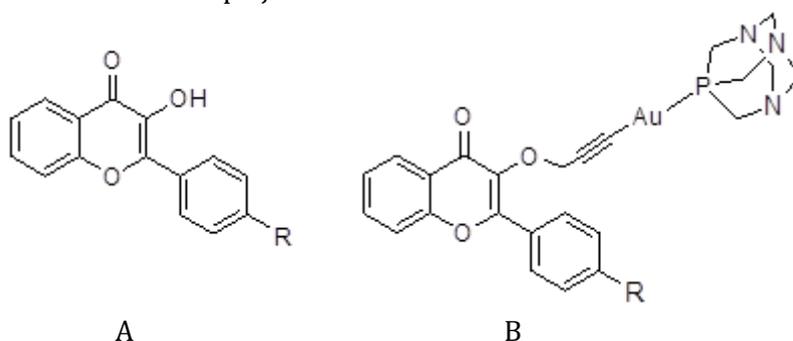


Figura 4. (A) 3-hidroxi flavonas de partida modificadas por alquilación en el grupo hidroxilo para coordinar al centro metálico de oro con la unidad Au-PTA. R = H (*Flavona 1*), Cl (*Flavona 2*), Br (*Flavona 3*), OMe (*Flavona 4*). **(B)** Complejos flavona-Au-PTA. R = H (*Complejo 1*), Cl (*Complejo 2*), Br (*Complejo 3*), OMe (*Complejo 4*).

1. Preparación de las disoluciones madre

Los compuestos empleados en este trabajo son de dos tipos, por un lado, 3-hidroxi flavonas que varían en un sustituyente. Por otro, complejos $[Au(L)(PTA)]$, siendo L los diferentes alquinoderivados de las anteriores 3-hidroxi flavonas (Figura 4 de la *Introducción*) y PTA (1,3,5-tiaza-7-fosfaadamantano), un fosfano soluble en agua.

Para poder realizar los distintos ensayos se han añadido los complejos en forma sólida en disolventes orgánicos, en concreto dimetilsulfóxido (DMSO), obteniendo una **disolución madre** de concentración conocida.

2. Cultivo celular

Se entiende por cultivo celular al conjunto de técnicas que permiten el mantenimiento de células *in vitro* en un entorno controlado, manteniendo al máximo sus propiedades fisiológicas, bioquímicas y genéticas. Permite el estudio de la biología celular, así como de los efectos de productos químicos y procesos de mutagénesis, siendo una de las principales herramientas empleadas en Biotecnología.

En este trabajo se ha empleado la **línea celular Caco-2**, que proviene de células epiteliales de adenocarcinoma colorrectal humano. Cuando se cultiva bajo unas condiciones específicas, las células sufren un proceso de diferenciación espontánea que conduce a la formación de una monocapa con características morfológicas y funcionales de enterocito maduro. Las condiciones de cultivo influyen en la expresión de estas características y, debido a la heterogeneidad del cultivo de partida, a lo largo de los años las características de las células utilizadas en diferentes laboratorios es muy diversa, dificultando la comparación de resultados en la literatura (16). Son útiles para el estudio de posibles fármacos contra el cáncer porque permiten hacer ensayos tanto en células tumorales, como en diferenciadas, lo que aportaría información sobre la citotoxicidad y seguridad de los compuestos testados.

Se han utilizado concretamente células Caco-2/TC7, las cuales alcanzan la confluencia a los 7 días de haber sido sembradas y sufren la diferenciación a enterocitos normales de manera espontánea. Esta cepa procede de pasajes tardíos (entre el 140 y el 150), lo que determina su estabilidad y homogeneidad. En este proyecto se ha trabajado con células indiferenciadas.

Las células se han mantenido y dejado crecer en una estufa de incubación (Haeraeus BB16) a una temperatura de 37°C, con una atmósfera humidificada con un 95% de O₂ y un 5% de CO₂.

Se ha utilizado un medio Dulbecco modificado (DMEM) suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 20%, aminoácidos no esenciales al 1%, estreptomina (1000µg/mL) al 1%, penicilina (1000 U/mL) al 1% y anfotericina (250 U/mL) al 1% para el crecimiento celular. En cambio, para el cultivo de células tratadas con los flavonoides y los complejos se ha utilizado el mismo medio sin el suplemento de SFB ni anfotericina.

Con el objetivo de evitar la confluencia y el agotamiento del cultivo, ha sido necesario **subcultivar** cada 5 o 6 días. Para ello es necesario un tratamiento con una disolución de tripsina tras un lavado con PBS porque las células Caco-2 son adherentes y de esta forma las separamos del sustrato sólido sobre el que crecen.

Después de centrifugar 5 minutos a 3900 rpm, se añade nuevo medio de cultivo al pellet de células y se realiza el conteo en una cámara de Neubauer con un microscopio óptico por tinción con azul Trypan (SIGMA® T8154). La concentración celular del subcultivo debe ser de 300.000 células/botella en las cajas de 25cm² empleadas con esta finalidad. En el caso de las cajas de 75cm², la densidad debe ser de 500.000células/botella. Por último, en las placas de 96 pocillos necesarias para los experimentos, se siembran 4.000 células/pocillo.

Cualquier manipulación que se realice con células eucariotas en cultivo debe llevarse a cabo en **condiciones estériles**, por lo que los experimentos y subcultivos se han hecho en campana de flujo laminar vertical de clase II (Telstar AV-100) y con material estéril.

3. Ensayo de viabilidad celular

3.1. MTT

El ensayo MTT es un ensayo colorimétrico que permite determinar la viabilidad de un cultivo celular basándose en la capacidad de las células viables de reducir el compuesto incoloro MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol) a un compuesto azulado (formazán) por la acción de la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa. Así pues, la cantidad de color medida por absorbancia (espectrofotómetro, SPECTROstar^{Nano}) es directamente proporcional a la cantidad de células vivas.

Por este método se ensayan todos los compuestos.

Primero se siembran placas de 96 pocillos y tras 24 horas se tratan con los complejos y flavonoides de interés a diferentes concentraciones y con una disolución control con medio de cultivo y DMSO. Tras 72 horas, se añade reactivo MTT (5mg/mL) disuelto en PBS en condiciones estériles y se deja incubar durante aproximadamente tres horas. Si los cristales no se han adherido bien se centrifuga a 2.500rpm durante 20 minutos, si están bien adheridos se procede a la eliminación del medio de cultivo por inversión. Por último, se disuelven los cristales de azul de formazán en DMSO para leer la densidad óptica de la placa a 540nm.

3.2. SRB

Esta técnica permite estimar el número de células de forma indirecta mediante la tinción de las proteínas celulares totales con el colorante SRB (sulforrodamina B). Es un método rápido y sensible para medir toxicidad inducida por drogas. En este caso no es necesario trabajar en condiciones estériles.

Solo se realiza este ensayo en las 3-hidroxi flavonas, para comprobar si los resultados coinciden con los del MTT y detectar posibles falsos positivos de viabilidad celular (ver *Resultados*).

Después de retirar el medio de cultivo de la placa de 96 pocillos tras 72 horas de cultivo con las flavonas, se añade tricloroacético (TCA) al 10% y se incuba durante 1 hora a 4°C. Después se retira el TCA, se lava 5 veces con agua miliQ, se añade SRB (0,4%) disuelto en ácido acético al 1% y se incuba entre 10 y 30 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se elimina el colorante y se lava otras 5 veces con ácido acético al 1%. Finalmente, se añade Tris-base 10mM pH 10,5, se agita durante 5 minutos para solubilizar el colorante unido a las proteínas y se realiza la lectura de las placas entre 550 y 570nm (SPECTROstar^{Nano}) (17,18).

4. Estudios de interacción con Albúmina Sérica Bovina (BSA)

Se prepara una disolución con 0,5g de BSA (de Sigma Aldrich) en 100mL de PBS a pH 7,4. La concentración real se confirma mediante espectroscopía visible-ultravioleta (UV-vis) ($\epsilon_{280\text{nm}}=43824 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), siendo de 660 μM . Se utiliza un espectrofotómetro (de Termo Scientific) con lámpara de deuterio ($\lambda < 325$) y lámpara de Wolframio ($\lambda > 325$) y se mide en el rango de 200-500nm. A partir de esta disolución, se prepara otra de 50 μM .

Por otra parte, se prepara una disolución 6mM del complejo que se quiere estudiar. Cada 4 minutos se añaden 2,5 μL de esta disolución a 3mL de una disolución de BSA 50 μM en una cubeta de cuarzo de longitud de paso óptico de 1cm. Tras cada adición las concentraciones finales del complejo estudiado a las que se realizan las distintas medidas van desde 5 hasta 40 μM .

El espectro de fluorescencia de BSA sola y con el complejo se mide con el espectrofotómetro Jobin-Y von-Horiba fluorolog FL-3-11, que excita las muestras a 295nm, recogiendo el espectro de emisión en el rango entre 210-450nm. Las intensidades de fluorescencia de PBS y los complejos de oro son irrelevantes en estas condiciones.

Los datos se analizan según la ecuación de desactivación (*quenching*) de Stern-Volmer: $F_0/F = 1 + K_{sv} \cdot [Q] = 1 + K_q \cdot \tau_0 \cdot [Q]$, siendo F_0 y F las intensidades de fluorescencia de la BSA antes y después de la adición del complejo respectivamente, K_{sv} la constante de desactivación de Stern-Volmer, K_q la constante bimolecular de desactivación, $[Q]$ la concentración del agente desactivador y τ_0 el tiempo de vida de fluorescencia de la especie emisora en ausencia de *quencheo*.

La gráfica de F_0/F frente a $[Q]$ da el valor de K_{sv} , siempre y cuando los valores se ajusten a una recta. Por otro lado, la constante de enlace (K_b) se determina usando la ecuación modificada de Stern-Volmer: $\log \{(F_0/F)/F\} = \log K_b + n \cdot \log [Q]$, donde n es el número de sitios de unión.

Para estudiar el posible **sitio de interacción** de nuestros complejos, se estudia de la misma manera la interacción en presencia de Ibuprofeno y Fenilbutazona (50 μM). Cada uno de estos medicamentos se une en uno de los posibles sitios de enlace de la BSA diferente. De esta manera puede saberse si compiten o no por el mismo.

Por último, con el objetivo de ver si hay **unión estática** de los complejos con la BSA se estudian los espectros de absorción en el rango de 200 a 500nm de BSA 10 μM sola y en presencia de cada uno de los complejos (10 μM) utilizando como blanco PBS solo o con el complejo estudiado.

5. Estudios de ciclo celular

A continuación se describen ensayos para los que se emplea **citometría de flujo**. Todas las muestras analizadas por este método se cultivan durante 24 horas en condiciones normales en caja de 25cm², salvo las que se emplean para la determinación del citocromo c, que se cultivan en caja de 75cm².

Tras el tiempo de incubación se trata con el complejo que se quiere estudiar (concentración IC₅₀) y se dejan en estufa durante otras 24 horas. Después se trasladan todas las células a un tubo Falcon, tanto las vivas adheridas a la caja (tripsinización), como las muertas (suspendidas en el medio de cultivo). Paralelamente se tiene un cultivo control, al que tras las 24 primeras horas de incubación se le cambia el medio por otro con DMSO.

El punto del ciclo celular en el que se produce la muerte de las células puede ayudar a definir la diana sobre la que actúan los compuestos. Con citometría de flujo puede determinarse gracias a la tinción con ioduro de propidio (PI), un colorante fluorescente que se une al DNA y emite a 620nm. Las células en proliferación darán lugar a una señal mayor.

El ensayo se realiza en el Centro de Investigación Biomédica de Aragón (CIBA). El procedimiento consiste en fijar las células en etanol al 70% enfriado con hielo y almacenarlas a 4°C durante 24 horas. Se centrifugan y rehidratan con PBS antes de la tinción con una solución de PI (50µg/mL) que contiene RNasa A (100µg/mL). El contenido de DNA de las células se analiza con un FACSARRAY BD equipado con un láser de iones de argón y el porcentaje de células en cada fase del ciclo celular se determina usando el *software* de verificación MODIFIT 3.0.

6. Estudios de apoptosis

La muerte celular puede producirse por apoptosis o por necrosis. Es posible distinguirlo por citometría de flujo. Para estudiar una posible apoptosis se realiza un marcaje con anexina V conjugada al fluorocromo FITC. La anexina V se une a la fosfatidil serina (PS), un fosfolípido que se encuentra en la cara interna de la membrana plasmática en células normales, pero se externaliza en caso de apoptosis. Paralelamente se utiliza PI, que penetra en aquellas células cuya membrana se encuentre alterada de forma destacable (necrosis), se une a los ácidos nucleicos y proporciona también una señal de fluorescencia detectable.

Los ensayos se realizan en el CIBA. Las células se lavan dos veces con PBS, se resuspenden en tampón de unión a anexina V (10mM Hepes/NaOH, pH 7,4, 140mM NaCl, 2,5mM CaCl₂) y se adiciona anexina V-FITC y PI a cada muestra. Se incuba 15 minutos a temperatura ambiente en oscuridad y se añade tampón de unión a anexina V 1x. Se mide la intensidad de fluorescencia durante una hora con un FACSARIA BD y se analiza usando FACSDIVA.

7. Evaluación del potencial mitocondrial

Las **mitocondrias** son orgánulos dinámicos, capaces de intercambiar su morfología entre redes elongadas e interconectadas y fragmentos desconectados mediante los procesos de fusión y fisión mitocondrial, respectivamente. Estos eventos permiten la transmisión de moléculas de señalización y el intercambio de metabolitos dentro de la célula y participan en numerosos procesos biológicos, incluidos el desarrollo embrionario, el metabolismo, la apoptosis y la autofagia (19,20).

También realizado en el CIBA. Las células se lavan con PBS atemperado dos veces y se resuspenden en PBS a concentración 10⁶ células/mL. Después se añade una sonda catiónica (yoduro de 1,1',3,3,3'-hexametilindodicarbo-cianina, DiI₁, 10µM) y se incuba 15 minutos a 37°C con un 5% de CO₂. A continuación se añade PBS a la muestra y se analiza la fluorescencia por citometría de flujo (FACSARRAY BD) a 633nm (excitación) y 658nm (emisión).

8. Determinación de BAX, BCL-2 y Caspasa 3 por citometría de flujo

La apoptosis se desencadena por señales fisiológicas o patológicas. Se manifiesta principalmente en dos programas de ejecución a partir de la señal de muerte: la ruta de las caspasas y la disfunción de orgánulos, siendo la mejor caracterizada la disfunción mitocondrial (21).

La proporción entre proteínas pro-apoptóticas (BAX) y anti-apoptóticas (BCL-2) es uno de los factores determinantes para que se desencadene la muerte celular. Posteriormente en la cadena de acontecimientos, está la ruta de las caspasas y la disfunción mitocondrial, que incluye un cambio en el potencial de membrana mitocondrial, la producción de especies reactivas de oxígeno, la apertura de poros y la liberación de la proteína del espacio intermembrana citocromo c. Este desencadena otras reacciones, que llevan a la activación de las caspasas, aunque estas también se activan directamente gracias a receptores de señales de muerte. Una vez activadas, escinden otros sustratos y afectan a la actividad mitocondrial, lo que conduce en última instancia a la muerte celular (21,22).

Igual que los otros análisis que requieren citometría de flujo, estas pruebas se llevan a cabo en el CIBA. Después del tratamiento, las células se recuperan en formaldehído al 0,01% durante 5 minutos y se centrifugan a 300g a temperatura ambiente. A continuación el pellet de células se resuspende en una solución de digitonina 0,5% v/v en PBS y se incuba 15 minutos en oscuridad a temperatura ambiente. Tras la incubación las células se lavan con PBS con digitonina al 0,1%. El anticuerpo correspondiente a cada proteína se añade a cada muestra y la mezcla resultante se mezcla e incuba durante 1 hora a temperatura ambiente. Se vuelve a centrifugar, esta vez 5 minutos a 3000 rpm y se lava dos veces con PBS. Por último, las células se resuspenden en PBS.

Los anticuerpos empleados son: anti-Bax (Abcam [T22-A], *Excitación: 493nm, Emisión: 528nm*), anti-Bcl-2 (Abcam, *Excitación: 645nm, Emisión: 660nm, 100 test*) y anti-Caspasa 3 (Novus, Clone C92-605, *Excitación: 494nm, Emisión: 520nm*).

9. Determinación del citocromo c por citometría de flujo

Como se ha mencionado en el apartado anterior, la liberación de citocromo c conduce a la activación de las caspasas y a la muerte celular en lo que se conoce como vía intrínseca de la apoptosis. Para saber si un complejo produce permeabilización mitocondrial y liberación de citocromo c, puede emplearse la citometría de flujo. Lo que se hace es comparar los niveles de citocromo c en células tratadas y no tratadas.

Tras el tratamiento, se determina la liberación de citocromo c como describen Christensen et al. (23). Las células se resuspenden en tampón de permeabilización frío (KCl 100mM, digitonina 50µg/mL en PBS) y se incuban durante 5 minutos en hielo. Después se añade paraformaldehído al 4% (en PBS) para una proporción final 1:1 con el tampón de permeabilización y se centrifuga 5 minutos a 3000 rpm a 4°C. Se retira el sobrenadante y se resuspende el pellet en paraformaldehído al 4%, incubando después 20 minutos a temperatura ambiente. A continuación se lavan las células tres veces con PBS, centrifugando para ello 5 minutos a 3450 rpm a 4°C. Tras los lavados, se resuspenden las células en tampón de permeabilización (saponina 0,05%, BSA 3% en PBS) y se incuba durante una hora a temperatura ambiente. El siguiente paso es la adición del anticuerpo anti-citocromo c (Novus (7H8-2C12)[PE]) y otra incubación de una hora. De nuevo se centrifugan las muestras durante 5 minutos a 3000 rpm, esta vez a temperatura ambiente, y se lavan dos veces con PBS. Finalmente, las células se resuspenden en PBS y se analiza la fluorescencia con un citómetro de flujo (FASCARRAY BD) equipado con un láser de argón (*Excitación: 488nm, Emisión: 575nm*).

10. Determinación del nivel de especies reactivas de oxígeno (ROS)

Como en la mayoría de los tipos de cáncer el equilibrio de ROS parece muy delicado, es importante comprobar si los complejos ensayados en el trabajo afectan a este equilibrio induciendo a la muerte celular por estrés oxidativo. Para ello se determina el nivel de estas especies mediante ensayos de fluorescencia.

Se siembran células en una placa de 96 pocillos y se dejan crecer en estufa durante 24 horas. Posteriormente se incuban con medio de cultivo sin SFB con el complejo que se quiere probar (IC_{50}) durante 1 hora a 37°C. A continuación se retira el medio, se lavan las células con PBS al menos una vez y se añade DCFH-DA (diacetato-diclorofluoresceína) 20mM en medio de cultivo sin SFB o en PBS.

Se deja incubar 20 minutos a temperatura ambiente, tras los cuales se lava de nuevo dos veces con PBS. Después de una última adición de PBS se mide la fluorescencia del reactivo (FLUOstar Omega), que se excita a 485nm y emite a 535nm.

La producción de ROS se expresa en unidades arbitrarias de fluorescencia, en tantos por cien con respecto al control.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Ensayos de viabilidad celular

1.1. MTT

Mediante este ensayo se evalúa la citotoxicidad de los complejos recogidos en la Figura 4 de la introducción, así como del complejo precursor de los mismos [AuCl(PTA)], determinando su IC₅₀. Este se define como la cantidad de una sustancia necesaria para inhibir un proceso al 50%. En este caso consistiría en medir la concentración necesaria para reducir a la mitad la población celular.

Por lo general, para los posibles candidatos con fines terapéuticos se buscan aquellos compuestos que presentan menos efectos secundarios, lo que suele estar relacionado con concentraciones bajas. Por eso, los compuestos más interesantes serán aquellos que presenten un IC₅₀ menor. Cuanto más bajo sea el IC₅₀, menor es la dosis necesaria para reducir a la mitad el número de células cancerígenas.

El ensayo se lleva a cabo en células indiferenciadas, por lo que se está estudiando la eficacia de los compuestos. La incubación de las células con dichos compuestos se ha realizado a 72 horas (Tabla 1).

Tabla 1. Valores de IC₅₀ calculados mediante MTT en células Caco-2/TC7 indiferenciadas tras 72h de incubación con los diferentes compuestos.

Compuesto	IC ₅₀ (μM) 72h
[AuCl(PTA)]	12,7 ± 0,20
Flavona 1	89,1 ± 4,98
Flavona 2	22,0 ± 0,25
Flavona 3	16,3 ± 0,69
Flavona 4	22,3 ± 2,51
Complejo 1	11,5 ± 0,33
Complejo 2	4,19 ± 0,82
Complejo 3	6,42 ± 0,35
Complejo 4	5,22 ± 0,43

Uno de los retos en farmacología es conseguir producir el mismo efecto con menor dosis de tratamiento. En este caso podemos ver que combinando la flavona con una unidad oro-fosfina (Au-PTA), se reduce significativamente la concentración necesaria para reducir a la mitad la población celular.

El valor para la Flavona 1 es sorprendentemente alto en comparación con su complejo equivalente. El error en el cálculo para esta flavona aparentemente es mayor, pero en proporción no hay tanta diferencia respecto a las demás moléculas similares.

En cuanto a las otras tres flavonas, a altas concentraciones forman agujas, siendo diferente el valor límite para cada una (40, 30 y 20 μM respectivamente). Como el IC₅₀ es inferior al valor a partir del que se forman estos agregados, no habría problema en su utilización.

En el caso de la Flavona 4, determinar el IC₅₀ ha resultado difícil por la baja reproducibilidad de los resultados. En repetidas ocasiones no sigue un comportamiento lineal, lo que contrasta con los buenos resultados obtenidos para su complejo correspondiente. Además, como puede verse el error en el cálculo es mayor que para los otros compuestos.

Determinar el IC₅₀ del Complejo 1 también ha sido complicado, ya que la reproducibilidad era de nuevo bastante baja. Además su IC₅₀ es más elevado que el de los demás, por lo que, en principio, sería menos interesante como agente terapéutico.

1.2. SRB

Esta segunda técnica para calcular el IC₅₀ se emplea para asegurar los resultados obtenidos para las flavonas debido a la gran diferencia existente entre la Flavona 1 y las demás.

Tabla 2. Valores de IC₅₀ calculados mediante SRB en células Caco-2/TC7 indiferenciadas tras 72h de incubación con los diferentes compuestos.

Compuesto	IC ₅₀ (µM) 72h
<i>Flavona 1</i>	16,7 ± 8,28
<i>Flavona 2</i>	10,4 ± 0,24
<i>Flavona 3</i>	13,5 ± 0,33
<i>Flavona 4</i>	14,8 ± 2,82

Los valores determinados para las Flavonas 2, 3 y 4 por este método no distan demasiado de los calculados por MTT. Aunque el valor para las Flavonas 2 y 4 difiera un poco entre ambos ensayos, entra dentro del mismo orden de magnitud, por lo que no es significativa. El error en el caso de la Flavona 4 vuelve a ser mayor que para las flavonas 2 y 3, como ocurría con el MTT. De nuevo se debe a una menor reproducibilidad en los experimentos probablemente debida al cambio en la estructura del compuesto (sustituyente OMe).

En cuanto a la Flavona 1, el dato obtenido es mucho menor al calculado previamente con el MTT, lo que sugiere que quizá estemos ante un falso positivo de viabilidad. Algunos productos químicos o fitoquímicos pueden cambiar la actividad de la succinato deshidrogenasa o interaccionar directamente con el MTT (24), este parece ser uno de esos casos. En el MTT se habrían formado cristales de formazán por interacción con la flavona en vez de por la reducción por la enzima mitocondrial, dando lugar a una mayor absorbancia no relacionada con el número de células viables. También hay que destacar que el error para este dato es extremadamente alto en el caso del SRB.

Considerando los resultados de los ensayos de citotoxicidad, los Complejos 2, 3 y 4 son los mejores candidatos para continuar con el estudio. Se elige el **Complejo 4** para un estudio más exhaustivo porque, a pesar de los problemas a la hora de calcular el IC₅₀ de su flavona, los experimentos han sido bastante reproducibles para el complejo y tiene un valor de IC₅₀ y error intermedios.

2. Estudios de interacción con BSA

La mayoría de drogas anticancerígenas se administran por vía intravenosa, por lo que es interesante el estudio de sus posibles interacciones con componentes de la sangre. La interacción con proteínas del suero puede determinar la distribución del compuesto, así como su metabolismo, excreción y diferencias en eficacia, actividad y toxicidad (25). Una de las proteínas más estudiadas es la albúmina sérica bovina (BSA), por sus similitudes estructurales con la albúmina sérica humana (HSA), así como por su accesibilidad y estabilidad.

La albúmina sérica es la proteína más abundante en el plasma sanguíneo e interacciona con múltiples sustancias tanto endógenas como exógenas, por ejemplo, con algunos iones metálicos. Por ello, es de interés estudiar la posible interacción de los complejos de oro con la BSA como se ha descrito en el apartado de *Materiales y Métodos*.

Quencheo de la fluorescencia

La Figura 1 recoge los datos obtenidos tras adiciones sucesivas del Complejo 3 a una disolución de BSA 50 μ M. Las gráficas son similares para todos los compuestos testados, pero no son comparables unas con otras porque las intensidades son variables en cada caso; por eso, para el estudio se emplean intensidades relativas. Las figuras de los otros complejos testados se encuentran en el *Anexo* (Figuras An1-4).

Conforme aumenta la concentración de complejo, disminuye la intensidad de la señal de fluorescencia sin que haya una modificación significativa en el espectro de emisión; solo hay un leve desplazamiento del máximo que no se toma en consideración.

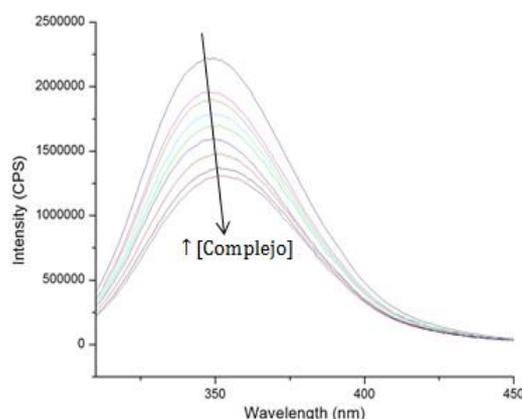


Figura 1. Efecto del Complejo 3 en el espectro de fluorescencia de la BSA ($\lambda_{ex} = 280$). [Complejo 3] = 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 y 40 μ M.

La disminución en la fluorescencia indica que se producen cambios en el entorno del cromóforo de la BSA con los complejos de oro(I), lo que significa que estos interaccionan con la proteína. Esta disminución es más acusada para unos complejos que para otros, lo que está relacionado con la fuerza de unión, que puede estudiarse con la determinación de la constante de enlace, K_b .

Determinación de la constante de enlace y del número de sitios de unión

Una vez que se sabe que interaccionan, hay que comprobar si lo hacen de manera reversible. Para ello se analizan las variaciones en la fluorescencia con las ecuaciones de Stern-Volmer y Stern-Volmer modificada y se calculan las constantes de desactivación de Stern-Volmer (K_{SV}) y de enlace (K_b).

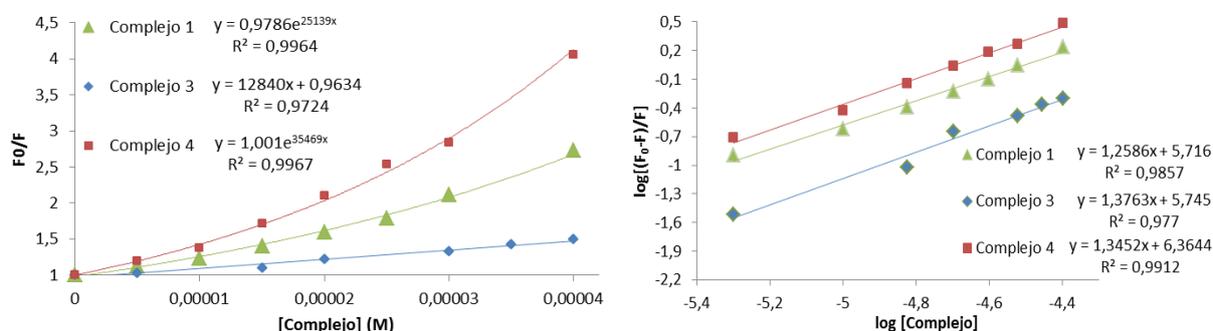


Figura 2. Interacción con BSA. Gráficas de desactivación de Stern-Volmer para los Complejos 1 (verde), 3 (azul) y 4 (rojo) con BSA 50 μ M.

Tabla 3. Valores de la constante de unión y el número de sitios de unión según la ecuación modificada de Stern-Volmer para la interacción de los complejos metálicos con BSA a temperatura ambiente.

	Constante de unión, K_b (M^{-1})	Constante de desactivación de Stern-Volmer, K_{SV} (M^{-1})	Nº sitios de unión (n)
Complejo 1	$5,2 \cdot 10^5$	-	1,258
Complejo 3	$5,5 \cdot 10^5$	$1,3 \cdot 10^4$	1,376
Complejo 4	$2,3 \cdot 10^6$	-	1,345

No es posible calcular la constante K_{SV} para los Complejos 1 y 4 porque la representación de la relación entre las intensidades de fluorescencia y la concentración del complejo no se ajusta a una recta, sino a una curva exponencial. Esto significa que la desactivación de la fluorescencia de la BSA sigue un mecanismo no solo estático o dinámico, sino una combinación de ambos (26). En cambio, parece que el Complejo 3 solo presenta uno de los dos: estático o dinámico. Un quencheo o desactivación estático implica la formación de un complejo proteína-agente desactivador, en cambio uno dinámico está causado por colisiones entre la proteína y la molécula que produce tal desactivación.

En cuanto a los valores de la constante de enlace, entran dentro del rango habitual que se da para otros complejos de oro (10^4 - $10^5 M^{-1}$), siendo algo más alto para el Complejo 4, lo que indicaría que la interacción de la BSA con dicho complejo es más fuerte.

El valor de n se relaciona con las posiciones de posible interacción. Valores próximos a 1 indican que hay aproximadamente un tipo de lugar de unión.

Atendiendo a estos resultados, se puede concluir que la albúmina sérica puede actuar como vehículo transportador de estos complejos por el organismo.

Tipo de interacción con la BSA

Para corroborar la presencia de un mecanismo de **desactivación estática** con la BSA se mide su espectro de absorbancia entre 200 y 500nm (UV-visible) sola y en presencia de cada uno de los complejos organometálicos en condiciones equimoleculares ($10\mu M$).

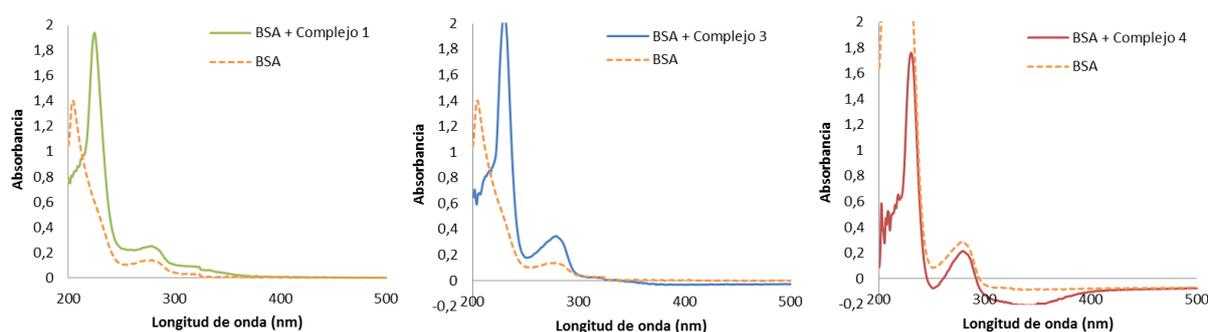


Figura 3. Espectro de absorción UV-vis de la BSA en ausencia (naranja) o presencia de los Complejos 1 (verde), 3 (azul) y 4 (rojo).

Para cada complejo se mide primero la absorbancia de la BSA sola (BSA $10\mu M$ en PBS). En los espectros de BSA se observan dos picos de absorción en torno a 210 y 280nm, correspondiéndose el primero con el contenido en α -hélices de la proteína y el segundo con los aminoácidos aromáticos. Todos los complejos testados modifican el espectro de absorción de la BSA en estas zonas concretas. Una mayor desviación, indica una mayor modificación del entorno aminoacídico, debida probablemente a una mayor cercanía del complejo.

Estos resultados confirman que es muy probable que haya un mecanismo de desactivación estática entre la BSA y los Complejos 1, 3 y 4, es decir, la formación de un complejo proteína-molécula desactivadora, mediante interacciones entre ambos, como se había predicho con la ecuación de Stern-Volmer.

Unión sitio-selectiva del Complejo 4 a la BSA

La BSA tiene dos sitios de unión (Figura 4) a drogas principales: el sitio I, en el que un residuo de triptófano interacciona con fármacos como la fenilbutazona y el sitio II, en el que se localiza una tirosina y donde se unen drogas como el ibuprofeno (27).

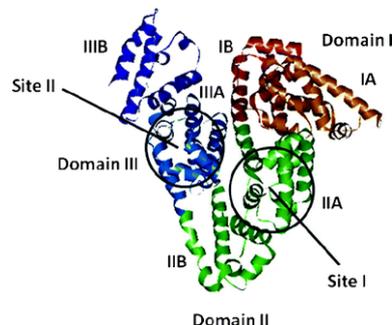


Figura 4. Representación esquemática de la estructura de la BSA.

Para identificar el sitio de unión del Complejo 4 con la BSA, se realizan experimentos de desplazamiento con fenilbutazona e ibuprofeno como marcadores de sitio. Con este procedimiento se comprueba si hay variaciones en la constante de unión en presencia de ibuprofeno o fenilbutazona en proporción 1:1 con la BSA.

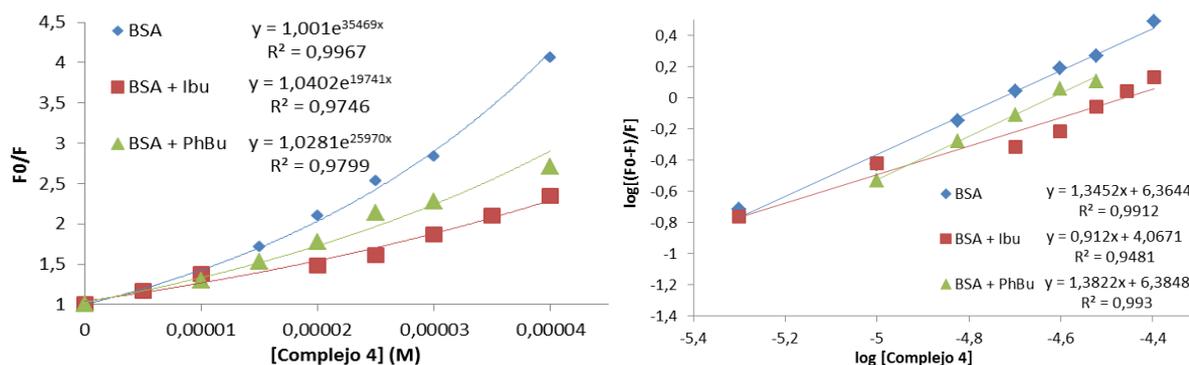


Figura 5. Sitio de unión. Gráficas de desactivación de Stern-Volmer para el Complejo 4 con BSA, BSA + Fenilbutazona (1:1) y BSA + Ibuprofeno (1:1).

Tabla 4. Comparación de los valores de la K_b y el número de sitios de unión a BSA, BSA + Ibuprofeno (Ibu) y BSA + Fenilbutazona (PhBu) según la ecuación modificada de Stern-Volmer.

	$K_b (M^{-1})$			n		
	BSA	BSA+Ibu	BSA+PhBu	BSA	BSA+Ibu	BSA+PhBu
Complejo 4	$2,314 \cdot 10^6$	$1,167 \cdot 10^4$	$2,426 \cdot 10^6$	1,345	0,9120	1,382

Con los datos de las Figuras 3 y 5 se obtiene el resumen de la Tabla 4. En presencia de ibuprofeno, la constante de unión se ve reducida en dos órdenes de magnitud con respecto a la interacción con BSA sola. Además el número de sitios de unión también se ve reducido, siendo ahora menor que 1. Sin embargo, en el caso de la fenilbutazona no se observan cambios. Esto significaría que el ibuprofeno interfiere en la unión del Complejo 4 con la BSA, pero la fenilbutazona no. En consecuencia, podría concluirse que el Complejo 4 interacciona con el sitio II de la proteína.

3. Estudio de ciclo celular

Saber el punto del ciclo celular en el que se produce la muerte de las células puede ser de utilidad para determinar la diana sobre la que actúan los compuestos. Para conocer el punto en el que se encuentran las células se utiliza una tinción con yoduro de propidio, que se une a DNA, y citometría de flujo, tal y como se explica en el apartado de *Materiales y Métodos*.

Para los estudios de citometría las incubaciones con los compuestos se han realizado a 24 horas y no a 72 horas como en los ensayos de citotoxicidad. En el caso de los ensayos de citotoxicidad se trataron las células el máximo tiempo posible y, al determinar un IC₅₀ relativamente bajo, se consideró que era aceptable reducir el tiempo de incubación para las pruebas con el citómetro. De nuestra experiencia anterior se observa que, con incubación a mayores tiempos, se produce una excesiva muerte celular, no pudiéndose calcular el número de células en cada etapa del ciclo.

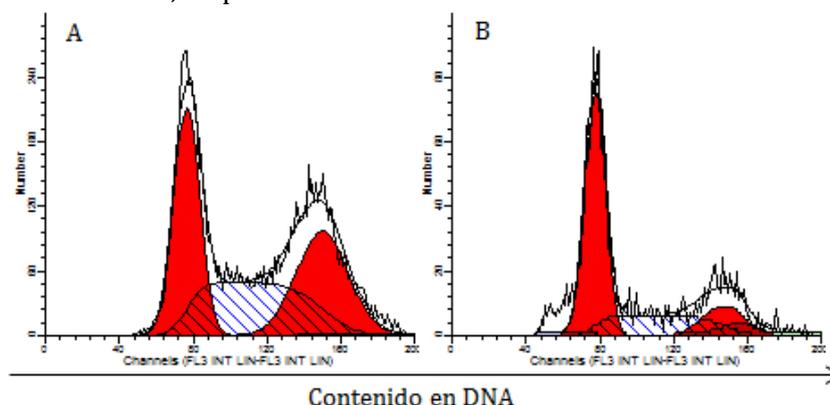


Figura 6. Estudios de ciclo celular sobre células Caco-2/TC7 indiferenciadas. **(A)** Control (DMSO). **(B)** Incubación con complejo 4 durante 24 horas.

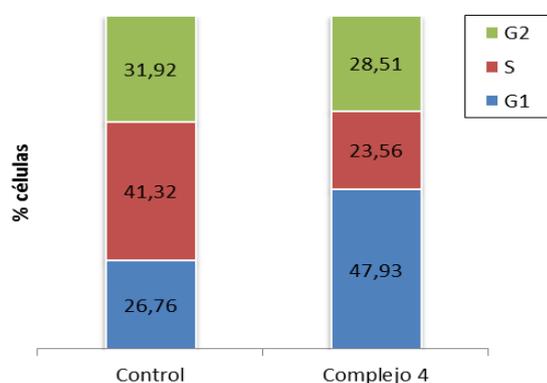


Figura 7. Valor promedio del porcentaje de células en cada fase del ciclo celular tras tratar con el Complejo 4 durante 24h a concentración IC₅₀.

Tabla 5. Valor promedio de los porcentajes en cada una de las fases del ciclo celular tras tratar con el Complejo 4 durante 24h a concentración IC₅₀ (3 repeticiones).

	Control	Complejo 4
G ₁ (%)	26,76 ± 5,69	47,93 ± 9,92
S (%)	41,32 ± 5,58	23,60 ± 0,98
G ₂ (%)	31,92 ± 2,92	28,51 ± 10,5

Según los datos recogidos en la Tabla 5, parece que el tratamiento con el Complejo 4 **detiene el ciclo celular en la fase G₁**, cuyo porcentaje aumenta respecto al control, a diferencia de los porcentajes en la fase S y la G₂, que disminuyen. En general el error es bastante alto, esto se debe a que este tipo de ensayos tiene una gran variabilidad.

4. Estudio de apoptosis

Como se ha indicado en la sección de *Materiales y Métodos*, se recurre a la tinción con anexina V conjugada con FITC para estudiar una posible muerte celular por apoptosis.

Esta técnica permite distinguir las células apoptóticas, que emiten fluorescencia por la unión de la anexina V conjugada, de las muertas, que incorporan PI por los daños en su membrana, y de las sanas, que no presentan ninguna fluorescencia.

El objetivo en este caso es comprobar si la muerte celular se produce por apoptosis o por necrosis. Un tratamiento con compuestos que conduzcan a apoptosis será mejor que uno que produzca necrosis. Lo ideal es encontrar muerte por apoptosis porque esta es una muerte celular controlada y que no deriva en respuesta inflamatoria, menos adecuada si se pretende emplear el compuesto como fármaco.

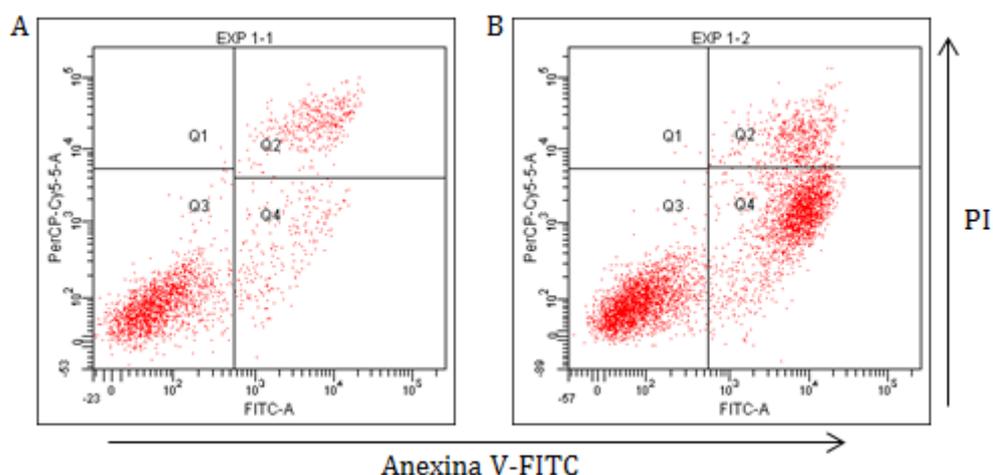


Figura 8. Estudio de muerte celular sobre células Caco-2/TC7 indiferenciadas, análisis por citometría de flujo mediante tinción doble con anexina V y PI. **(A)** Control (DMSO). **(B)** Incubación con el Complejo 4 durante 24 horas. **Q1:** necrosas; **Q2:** apoptóticas tardías; **Q3:** vivas; **Q4:** apoptóticas tempranas.

Tabla 6. Efecto del tratamiento con el Complejo 4 sobre la muerte celular tras incubación 24 horas a concentración IC_{50} (3 repeticiones).

	Nº células (media)	Vivas (%)	Apoptosis temprana (%)	Apoptosis tardía (%)	Necrosis (%)
Control	1.931	77,4 ± 5,01	9,3 ± 1,31	12,9 ± 3,89	0,3 ± 0,22
Complejo 4	2.189	40,0 ± 14,5	33,7 ± 4,94	25,8 ± 19,5	0,4 ± 0,42

En el caso del Complejo 4, según los resultados recogidos en la Tabla 6 puede decirse que produce **apoptosis**. El porcentaje de células vivas disminuye drásticamente y el de células muertas por vía apoptótica se triplica en el caso de la apoptosis temprana y se duplica en el caso de la tardía. Por otra parte, no se observa un cambio significativo en el número de células necróticas.

De nuevo el error es bastante alto, especialmente en el caso de las células muertas por necrosis. En los dos primeros experimentos el porcentaje de células necróticas fue el 0,1%, sin embargo, en la tercera repetición aumentó prácticamente al 1%. Probablemente las células fueron sometidas a algún tipo de estrés durante el proceso.

5. Evaluación del potencial mitocondrial

Durante la apoptosis, la producción de radicales de oxígeno y la descompensación en el ratio entre proteínas pro y anti-apoptóticas estimula la liberación de Ca^{2+} de la mitocondria (28,29).

Por otra parte, los compuestos de oro tienden a acumularse en la mitocondria debido a sus propiedades lipofílicas. Así pues, si el complejo es capaz de entrar en las mitocondrias, debería observarse un cambio en el potencial mitocondrial (ψ_m).

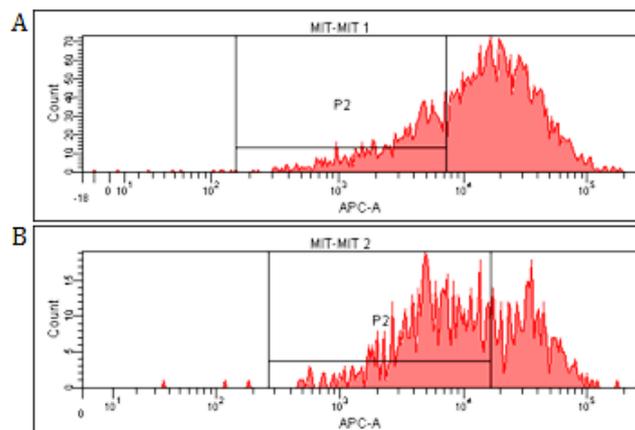


Figura 9. Estudio de potencial mitocondrial en células Caco-2/TC7 indiferenciadas, análisis por citometría de flujo. **(A)** Control (DMSO). **(B)** Incubación con el Complejo 4 durante 24 horas.

En la Figura 9 puede verse claramente que hay un aumento significativo del número de células incluidas en la región P2, que es la correspondiente a aquellas con potencial mitocondrial positivo.

Tabla 7. Resumen de resultados del estudio del potencial mitocondrial por citometría de flujo.

Células con ψ_m positivo (%)	
Control	28,2 ± 6,33
Complejo 4	47,0 ± 11,81

A pesar de la diferencia en los valores obtenidos en las tres repeticiones del experimento, la conclusión siempre es la misma: el Complejo 4 altera el potencial de membrana de las mitocondrias, lo que podría sugerir apoptosis.

6. Determinación de BAX, BCL-2 y Caspasa 3 por citometría de flujo

Como se está proponiendo la apoptosis como tipo de muerte celular por la acción del Complejo 4, el siguiente paso es estudiar algunas proteínas pro y anti-apoptóticas. Interesa saber si se trata de apoptosis vía intrínseca o extrínseca. Una alteración en el nivel de ROS puede desencadenar un proceso apoptótico mediado por un desequilibrio en la relación de proteínas pro- y anti-apoptóticas, lo que conduciría a la liberación de citocromo c por parte de las mitocondrias (vía intrínseca), o por caspasas citosólicas (vía extrínseca). En cualquier caso, al final de la ruta se observa una activación de la caspasa 3, lo que desemboca en la muerte celular.

Por un lado, las proteínas anti-apoptóticas como BCL-2 (B-Cell Lymphoma 2) protegen a las células de la translocación del citocromo c, mientras que BAX y otras proteínas pro-apoptóticas promueven la permeabilización de la membrana mitocondrial externa, potenciando el flujo de citocromo c. En el citoplasma, este citocromo se asocia con APAF-1 (factor de apoptosis activador de proteasas 1) e induce la activación de la pro-caspasa 9, que activará la caspasa 3.

Se analizan los niveles de BAX, BCL-2 y caspasa 3 por citometría de flujo después de tratar las células Caco-2/TC7 indiferenciadas durante 24 horas con el Complejo 4.

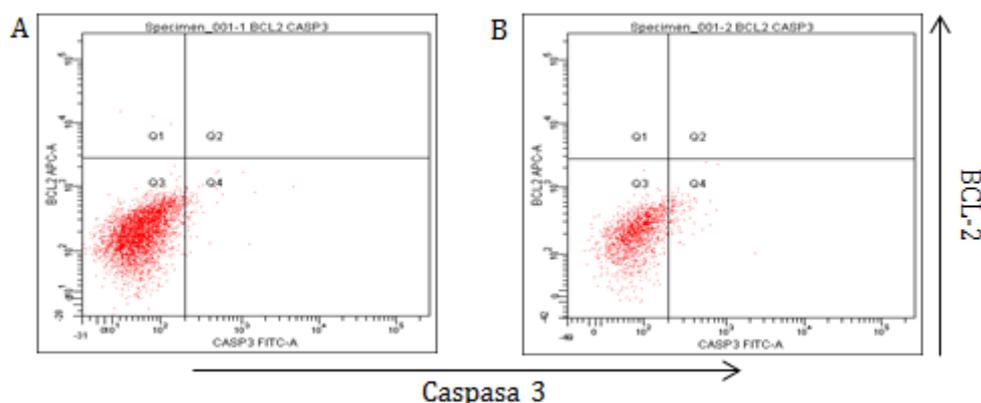


Figura 10. Estudio de los niveles de BCL-2 y caspasa 3 en células Caco-2/TC7 indiferenciadas, análisis por citometría de flujo. **(A)** Control (DMSO). **(B)** Incubación con el Complejo 4 durante 24 horas.

Tabla 8. Resumen de resultados del estudio de expresión de BAX, BCL-2 y caspasa 3 por citometría de flujo (2 repeticiones).

	BAX (%)	BCL-2 (%)	% células que expresan caspasa 3
<i>Control</i>	91,9 ± 1,4	0,1*	1,4*
<i>Complejo 4</i>	71,7 ± 4,2	0,0 ± 0,0	6,3 ± 0,5

*Solo una repetición.

En el caso de BAX, al tratarse de una proteína proapoptótica cabía esperar que los niveles aumentaran al tratar con el Complejo 4, pero parece que hay una disminución. Esta línea celular, al igual que muchos tumores de colon, presenta mutaciones en TP53, una proteína encargada de la up-regulación de la expresión de BAX. La capacidad de unión de la proteína al DNA para inducir la expresión de BAX puede verse mermada por la mutación E204X (30,31). Además, medidas por encima de un 65-70% de expresión no son demasiado fiables, por lo que se puede considerar que no hay una diferencia significativa en los niveles de BAX entre las células control y las tratadas.

En cuanto a BCL-2, el cambio de expresión es mínimo, aunque podría considerarse que esa pequeña disminución es suficiente como para alterar el ratio de proteínas pro/antiapoptóticas.

Por último, el aumento en el nivel de expresión de la caspasa 3 es significativo, pero como es el punto de confluencia de las vías intrínseca y extrínseca, no sirve para discernir entre una y otra. Como la variación en la expresión de BCL-2 es tan pequeña, para poder confirmar o descartar la vía intrínseca como mecanismo de apoptosis para las células tratadas con el Complejo 4, es necesario estudiar también los niveles de citocromo c.

7. Determinación del citocromo c por citometría de flujo

Un cambio en el potencial mitocondrial conduce a modificaciones estructurales en la mitocondria como la condensación de la matriz y el despliegue de las crestas, lo que resulta en la redistribución del citocromo c del interior mitocondrial al espacio intermembrana, haciendo que sea más susceptible a la liberación. También interviene en la liberación de esta proteína un desequilibrio en el ratio de proteínas pro y anti-apoptóticas.

Como el Complejo 4 altera el potencial mitocondrial y además parece provocar una disminución en la cantidad de BCL-2, cabría esperar que se produjera la liberación del citocromo c.

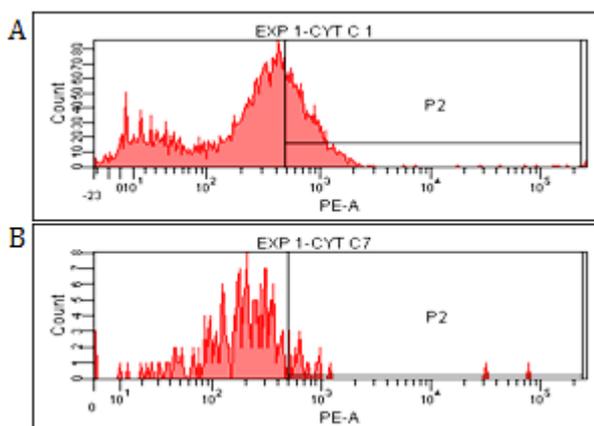


Figura 11. Determinación del citocromo c en células Caco-2/TC7 indiferenciadas, análisis por citometría de flujo. **(A)** Control (DMSO). **(B)** Incubación con el Complejo 4 durante 24 horas.

Los resultados del experimento muestran que las células tratadas con el Complejo 4 contienen aproximadamente un 60% menos de citocromo c en comparación con las células control. Una disminución en el citocromo c mitocondrial implica la liberación de esta proteína al citoplasma. Por lo que se puede concluir que la apoptosis se produce por vía intrínseca.

8. Determinación del nivel de ROS

Una alteración en los niveles de especies reactivas de oxígeno en las células cancerígenas, ya sea un aumento o una disminución, conduce al desencadenamiento de la apoptosis.

Los compuestos de oro, en general, actúan como prooxidantes, produciendo un aumento en el nivel de ROS en las células. Previamente hemos podido comprobar que alquino complejos de oro con la fosfina PTA, similares en estructura a los complejos del presente trabajo, tales como $[\text{Au}(\text{C}\equiv\text{CPh})(\text{PTA})]$ (32) y $[\text{Au}(\text{C}\equiv\text{C}-2-\text{NC}_5\text{H}_4)(\text{PTA})]$ tienen actividad prooxidante. Sin embargo, las flavonas son sustancias con efecto antioxidante (15). Los complejos testados son una combinación de ambos tipos de moléculas, por lo que conviene saber qué efecto prevalece.

Siguiendo el protocolo descrito en *Materiales y Métodos* se obtienen los siguientes resultados para los Complejos 3 y 4. Por un lado se busca determinar las características del Complejo 4 y por otro, ver si presenta diferencias con otro de los complejos con los que se comenzó el estudio.

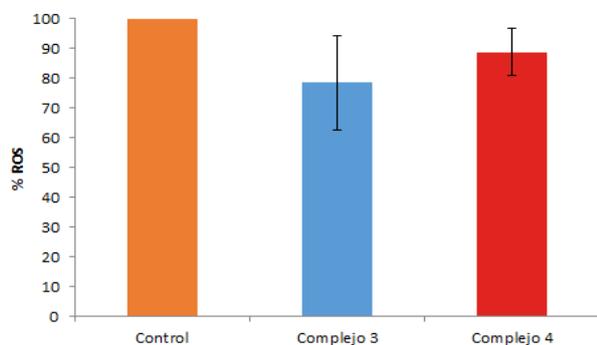


Figura 11. Porcentaje de ROS producidas al tratar células Caco-2/TC7 indiferenciadas con los Complejos 3 y 4 a concentración IC_{50} .

Parece que en los Complejos 3 y 4 prevalece la capacidad **antioxidante** de la flavona frente a la prooxidante del complejo de oro. Sin embargo, en este experimento la variabilidad es bastante alta.

Tabla 9. Resultados del estudio de expresión de citocromo c por citometría de flujo (1 repetición).

	Células con citocromo c en la mitocondria (%)
<i>Control</i>	28,1
<i>Complejo 4</i>	11,2

Tabla 9. Porcentaje de ROS producidas al tratar con los Complejos 3 y 4 a concentración IC_{50} (3 repeticiones).

	% ROS
<i>Control</i>	100
<i>Complejo 3</i>	78,6 ± 15,8
<i>Complejo 4</i>	88,9 ± 8,04

CONCLUSIONES

1. Tanto los alquinocomplejos de oro(I), como las 3-hidroxi flavonas y el complejo precursor de la unidad Au-PTA ensayados disminuyen la viabilidad de las células de carcinoma de colon humano Caco-2/TC7, siendo mayor el efecto citotóxico de los alquinocomplejos con respecto a sus precursores.
2. El ensayo de citotoxicidad basado en sulforrodamina B permite hacer determinaciones en casos para los que el método de MTT falla, como ocurre con una de las flavonas.
3. Los Complejos 1, 3 y 4 interactúan con la BSA con una constante de enlace tal, que permitiría a esta proteína actuar como transportador de dichos complejos por el organismo.
4. La desactivación de la luminiscencia de la BSA por los Complejos 1 y 4 combina mecanismos estáticos y dinámicos, mientras que la del Complejo 3 parece solo de tipo estático.
5. La unión del Complejo 4 a la BSA es sitio-selectiva, en concreto es probable que el enlace se establezca con el sitio II de la proteína.
6. El tratamiento con el Complejo 4 provoca la alteración del ciclo celular, con un aumento en la población de células Caco-2/TC7 indiferenciadas en fase G₁.
7. El Complejo 4 produce muerte celular por apoptosis, como se ha podido ver por citometría de flujo y corroborar por el aumento en la expresión de la caspasa 3. Además, la disminución en la cantidad de citocromo c mitocondrial indicaría apoptosis por vía intrínseca.
8. El Complejo 4 altera el potencial de membrana de las mitocondrias de forma significativa, lo que podría estar relacionado con el proceso apoptótico.
9. Tanto el Complejo 4, como el Complejo 3 tienen cierta actividad antioxidante, lo que provocaría una alteración en el nivel de ROS en las células, desencadenando la muerte celular por apoptosis.

CONCLUSIONS

1. The alkyne gold(I) complexes, as well as the 3-hydroxyflavones and the Au-PTA precursor tested reduce human colorectal carcinoma cells Caco-2/TC7 viability. The alkyne gold(I) complexes have the greatest cytotoxic effect in comparison with their precursors.
2. The cytotoxicity test based in sulforhodamine B allows to obtain results when the MTT method fail, as occurred in the case of one of the flavones.
3. Complexes 1, 3 and 4 interact with BSA with a binding constant which would allow this protein to act as a carrier for those complexes through the organism.
4. Both, static and dynamic quenching mechanism in BSA is observed with Complexes 1 and 4, whereas Complex 3 provides a single quenching mode that seems to be static.
5. Complex 4 binding to BSA is site-selective, probably the union is established with the site II of the protein.
6. The treatment with Complex 4 causes the alteration of cell cycle giving rise to G₁-phase arrest.

7. Complex 4 induces cell death by apoptosis, as it has been shown by flux cytometry and confirmed by an increase of caspase 3 expression levels on treated cells. Besides, the decrease in mitochondrial cytochrome c suggests apoptosis via intrinsic pathway.
8. Complex 4 modifies mitochondrial membrane potential significantly, which could be related with the apoptotic process.
9. Complexes 3 and 4 have a slight antioxidant activity. This induces a decrease of the reactive oxygen species levels in tumor cells, triggering apoptotic cell death.

REFERENCIAS

1. Muñoz A. *Cáncer: genes y nuevas terapias*. 1ª ed. Madrid: Hélice; 1997.
2. Weitzman JB, Yaniv M. Rebuilding the road to cancer. *Nature*. 1999;400(6743):401–2.
3. Labianca R, Beretta GD, Kildani B, Milesi L, Merlin F, Mosconi S, et al. Colon cancer. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2010;74(2):106–33.
4. American Cancer Society. Information and Resources about/for Cancer: Breast, Colon, Lung, Prostate, Skin [Internet]. [cited 2017 Apr 17]. Available from: <http://www.cancer.org>
5. Liu W, Gust R. Metal N-heterocyclic carbene complexes as potential antitumor metallodrugs. *Chem Soc Rev*. 2013;42(2):755–73.
6. Desoize B. Metals and metal compounds in cancer treatment. *Anticancer Res*. 2004;24(3A):1529–44.
7. Medici S, Peana M, Nurchi VM, Lachowicz JI, Crisponi G, Zoroddu MA. Noble metals in medicine: Latest advances. *Coord Chem Rev*. 2015;284:329–50.
8. Nardon C, Boscutti G, Fregona D. Beyond Platinums: Gold Complexes as Anticancer Agents. *Anticancer Res*. 2014;34:487–92.
9. De Nisi A, Bergamini C, Leonzio M, Sartor G, Fato R, Naldi M, et al. Synthesis, cytotoxicity and anti-cancer activity of new alkynyl-gold(I) complexes. *Dalt Trans*. 2016;45:1546–53.
10. Bertrand B, Casini A. A golden future in medicinal inorganic chemistry: the promise of anticancer gold organometallic compounds. *Dalt Trans*. 2014;43(11):4209–19.
11. Oehninger L, Rubbiani R, Ott I. N-Heterocyclic carbene metal complexes in medicinal chemistry. *Dalt Trans*. 2013;42(10):3269–84.
12. Serebryanskaya T V, Lyakhov AS, Ivashkevich LS, Schur J, Frias C, Prokop A, et al. Gold(I) thiotetrazolates as thioredoxin reductase inhibitors and antiproliferative agents. *Dalt Trans*. 2015;44(3):1161–9.
13. Middleton E, Kandaswami C, Theoharides T. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: Implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol Rev*. 2000;52(4):673–751.
14. Mirzadeh N, Privér SH, Abraham A, Shukla R, Bansal V, Bhargava SK. Linking Flavonoids to Gold – A New Family of Gold Compounds for Potential Therapeutic Applications. *Eur J Inorg Chem*. 2015;2015(25):4275–9.
15. Sharma N, Dobhal M, Joshi Y, Chahar M. Flavonoids: A versatile source of anticancer drugs. *Pharmacogn Rev*. 2011;5(9):1.
16. Sambuy Y, De Angelis I, Ranaldi G, Scarino ML, Stamatii A, Zucco F. The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics. *Cell Biol Toxicol*. 2005;21(1):1–26.

17. Skehan P, Storeng R, Scudiero D, Monks A, McMahon J, Vistica D, et al. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J Natl Cancer Inst.* 1990;82(13):1107–12.
18. Vichai V, Kirtikara K. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nat Protoc.* 2006;1(3):1112–6.
19. Scheffler IE. A century of mitochondrial research: Achievements and perspectives. *Mitochondrion.* 2001;1(1):3–31.
20. Kuzmicic J, Del Campo A, López-Crisosto C, Morales PE, Pennanen C, Bravo-Sagua R, et al. Dinámica mitocondrial: un potencial nuevo blanco terapéutico para la insuficiencia cardiaca. *Rev Esp Cardiol.* 2011;64(10):916–23.
21. Gross A, McDonnell JM, Korsmeyer SJ. BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev.* 1999;13:1899–911.
22. Martinou JC, Youle RJ. Mitochondria in Apoptosis: Bcl-2 Family Members and Mitochondrial Dynamics. *Dev Cell.* 2011;21(1):92–101.
23. Christensen ME, Jansen ES, Sanchez W, Waterhouse NJ. Flow cytometry based assays for the measurement of apoptosis-associated mitochondrial membrane depolarisation and cytochrome c release. *Methods.* 2013;61(2):138–45.
24. Wang P, Henning SM, Heber D. Limitations of MTT and MTS-Based Assays for Measurement of Antiproliferative Activity of Green Tea Polyphenols. *PLoS One.* 2010;5(4).
25. Kragh-Hansen U. Effects of aliphatic fatty acids on the binding of Phenol Red to human serum albumin. *Biochem J.* 1981;195(3):603–13.
26. Lakowicz JR. Principles of fluorescence Spectroscopy. Springer: Baltimore, Maryland, USA; 2006. 277-330 p.
27. Asadi M, Asadi Z, Zarei L, Sadi SB, Amirghofran Z. Affinity to bovine serum albumin and anticancer activity of some new water-soluble metal Schiff base complexes. *Spectrochim Acta - Part A Mol Biomol Spectrosc.* 2014;133(3):697–706.
28. Orrenius S, Zhivotovsky B, Nicotera P. Calcium: Regulation of cell death: the calcium–apoptosis link. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2003;4(7):552–65.
29. Pinton P, Giorgi C, Siviero R, Zecchini E, Rizzuto R. Calcium and apoptosis: ER-mitochondria Ca²⁺ transfer in the control of apoptosis. *Oncogene.* 2008;27(50):6407–18.
30. Ahmed D, Eide PW, Eilertsen IA, Danielsen SA, Eknæs M, Hektoen M, et al. Epigenetic and genetic features of 24 colon cancer cell lines. *Oncogenesis.* 2013;2(9):e71.
31. Selvakumaran M, Lin HK, Miyashita T, Wang HG, Krajewski S, Reed JC, et al. Immediate early up-regulation of bax expression by p53 but not TGF beta 1: a paradigm for distinct apoptotic pathways. *Oncogene.* 1994;9(6):1791–8.
32. Sánchez-de-Diego C, Mármol I, Pérez R, Gascón S, Rodríguez-Yoldi MJ, Cerrada E. The anticancer effect related to disturbances in redox balance on Caco-2 cells caused by an alkynyl gold(I) complex. *J Inorg Biochem.* 2017;166:108–21.