

Elisa Abás Benedí

Complejos de Au(I) y Au(III): una posible alternativa a la quimioterapia actual

Departamento
Química Inorgánica

Director/es
Laguna Castrillo, Mariano
Grasa López, Laura

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

Tesis Doctoral

COMPLEJOS DE AU(I) Y AU(III): UNA POSIBLE
ALTERNATIVA A LA QUIMIOTERAPIA ACTUAL

Autor

Elisa Abás Benedí

Director/es

Laguna Castrillo, Mariano
Grasa López, Laura

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA

Química Inorgánica

2019

Mariano Laguna Castrillo, Profesor de Investigación del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) del Instituto de Síntesis Química y Catálisis Homogénea (ISQCH).

Laura Grasa López, Profesora Titular de la Universidad de Zaragoza del Departamento de Farmacología y Fisiología.

INFORMAN FAVORABLEMENTE sobre la presente Memoria titulada “Complejos de Au(I) y Au(III): una posible alternativa a la quimioterapia actual”, presentada por Dña. Elisa Abás Benedí, y realizada en el Departamento de Química Inorgánica de Universidad de Zaragoza y en el Instituto de Síntesis Química y Catálisis Homogénea (ISQCH), bajo nuestra dirección. Así **AUTORIZAN** su presentación para que sea calificada como Tesis Doctoral.

En Zaragoza a 19 de Noviembre de 2018

Fdo.: Prof. Mariano Laguna Castrillo

Fdo.: Dra. Laura Grasa López

ÍNDICE

I.RESUMEN	
II.ABREVIATURAS	
INTRODUCCIÓN	1
EL APARATO DIGESTIVO Y EL COLON	2
FUNCIONES DEL APARATO DIGESTIVO	2
EL COLON: ANATOMÍA E HISTOLOGÍA	2
EPIDEMIOLOGÍA, ETIOLOGÍA Y DESARROLLO DEL CÁNCER DE COLON	4
EPIDEMIOLOGÍA DEL CÁNCER DE COLON	4
ETIOLOGÍA DEL CÁNCER DE COLON	5
DESARROLLO DEL PROCESO TUMORAL	5
CICLO CELULAR Y PROLIFERACIÓN CELULAR	8
MUERTE CELULAR PROGRAMA: APOPTOSIS	10
EXTERNALIZACIÓN DE FOSFATIDILSERINA	10
CASCADA DE LAS CASPASAS	11
ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (ROS)	13
TIORREDOXINA REDUCTASA (TRXR)	15
TRATAMIENTO DEL CÁNCER DE COLON	16
DESARROLLO DE NUEVOS FÁRMACOS BASADOS EN ORO	18
NUEVOS COMPLEJOS DE Au(I)	19
NUEVOS COMPLEJOS DE Au(III)	21
<i>Complejos ciclometalados de Au(III) con ligandos C,N-dadores.</i>	23
BIBLIOGRAFÍA	25
DISCUSIÓN DE RESULTADOS (I): SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN	33
COMPLEJOS DE Au(III)	33
<i>Productos de partida: [AuCl₃(HL)] y [AuCl₂L]</i>	34
<i>Síntesis de derivados ciclometalados de Au(III)</i>	42
COMPLEJOS DE Au(I)	67
BIBLIOGRAFÍA	72
DISCUSIÓN DE RESULTADOS (II): ESTUDIOS BIOLÓGICOS	77
ESTUDIOS FARMACODINÁMICOS	77
ESTUDIOS DE VIABILIDAD CELULAR Y DETERMINACION DE IC ₅₀	79
<i>Complejos de Au(I)</i>	80
<i>Complejos de Au(III)</i>	83
ESTUDIOS DEL CICLO CELULAR Y APOPTOSIS	87
ESTUDIO DEL CICLO CELULAR Y PROLIFERACIÓN CELULAR	87
ESTUDIO DE LA MUERTE CELULAR PROGRAMADA (APOPTOSIS)	91
<i>Estudio de mecanismos de Apoptosis: Fosfatidilserina</i>	93
<i>Estudio de mecanismos de apoptosis: Caspasas</i>	95
MECANISMOS DE ACCIÓN: ESTRÉS OXIDATIVO	99
EVALUACIÓN DE LA OXIDACIÓN PROTEÍCA	101
EVALUACIÓN DE OXIDACIÓN LIPÍDICA	104
ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD DE LA TIORREDOXINA REDUCTASA (TRXR)	106
ESTUDIOS CON CULTIVOS PRIMARIOS DE TUMORES DE RATÓN	110
BIBLIOGRAFÍA	114

ESTUDIOS FARMACOCINÉTICOS	119
COEFICIENTE DE REPARTO OCTANOL/AGUA: LOGP _{ow}	120
ESTABILIDAD EN CONDICIONES FISIOLÓGICAS	124
INTERACCIÓN CON PROTEÍNAS DE TRANSPORTE: ASB	131
BIBLIOGRAFÍA	143
PARTE EXPERIMENTAL	147
<i>Espectroscopia Infrarroja (IR)</i>	147
<i>Resonancia Magnética Nuclear (RMN)</i>	147
<i>Espectrometría de Masas (MS)</i>	147
<i>Análisis elemental cuantitativo</i>	147
<i>Espectrofluorímetro</i>	147
<i>Espectrofotometría Ultravioleta Visible</i>	147
<i>Difracción de rayos X</i>	148
SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN	148
PRODUCTOS DE PARTIDA DE AU(I) Y AU(III)	148
COMPLEJOS CICLOMETALADOS DE AU(III): [AuCl ₂ L]	148
COMPLEJOS DE AU(III) CON DERIVADOS PIRIMIDÍNICOS	148
COMPLEJOS DE AU(III) CON TIUREA	152
COMPLEJOS DE AU(III) CON ACETATOS	154
COMPLEJOS DE AU(III) CON AMINOÁCIDOS	155
COMPLEJOS DE AU(III) CON RESIDUOS ALQUINILO	157
MATERIALES Y MÉTODOS: ESTUDIOS FARMACOCINÉTICOS	160
COEFICIENTE DE DISTRIBUCIÓN (LOG P _{7.4})	160
ESTABILIDAD TÉRMICA EN DISOLUCIÓN	161
ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN DE LOS COMPLEJOS CON ASB	161
MATERIALES Y MÉTODOS: ESTUDIOS FARMACODINÁMICOS	162
CULTIVO DE LA LÍNEA CELULAR CACO-2/TC7	162
EQUIPOS	162
MEDIO DE CULTIVO	163
CRIOCONSERVACIÓN Y DESCONGELACIÓN DE CÉLULAS CONGELADAS	163
MANTENIMIENTO Y SIEMBRA DE LA LÍNEA CELULAR CACO-2	163
TRATAMIENTO DE LAS CÉLULAS	165
ESTUDIO DE LA CITOTOXICIDAD DE LOS COMPUESTOS MEDIANTE MTT: CÁLCULO DE IC₅₀.	165
ESTUDIOS DE CITOMETRÍA DE FLUJO	167
ESTUDIO DEL CICLO CELULAR	168
ESTUDIO DE APOPTOSIS: DETECCIÓN DE FOSFATIDILSERINA	169
ESTUDIO DE APOPTOSIS: DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA CASPASA 3/7.	170
ESTUDIOS DE ESTRÉS OXIDATIVO	172
PREPARACIÓN DE HOMOGENADOS CELULARES: EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS	172
ESTRÉS OXIDATIVO EN PROTEÍNAS: DETERMINACIÓN DE GRUPOS CARBONILOS	172
ESTRÉS OXIDATIVO EN LÍPIDOS: DETERMINACIÓN DE MDA+4-HDA	173
DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS POR EL MÉTODO DE BRADFORD	174
ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA TIORREDOXINA REDUCTASA	175
ESTUDIOS EN CULTIVOS PRIMARIOS	177
MODELO MURINO DE CÁNCER DE COLON	177
CULTIVOS PRIMARIOS DE COLON DE RATÓN	177
ANÁLISIS DE DATOS Y HERRAMIENTAS INFORMÁTICAS	179
BIBLIOGRAFÍA	180
CONCLUSIONES	181

RESUMEN

Este trabajo ha buscado la síntesis de nuevos complejos de Au(III) y Au(I) capaces de actuar como fármacos antitumorales, y que mejoren las terapias actuales contra el cáncer de colon. Así, en la primera parte de esta investigación se recogen los esfuerzos realizados para desarrollar un procedimiento general para la obtención de complejos ciclometalados de Au(III) viables a nivel industrial y compatibles con el medio ambiente. Aunque este objetivo no se ha conseguido, sí se han mejorado las condiciones de reacción propuestas en la bibliografía. Así, se han sintetizado los complejos ciclometalados, $[AuCl_2L]$ con $L =$ tolilpiridina (tpy), fenilpiridina (ppy) y bencipiridina (bzip) a partir de sus precursores $[AuCl_3HL]$ por calentamiento en estado sólido los dos primeros, y por calentamiento en MeCN/H₂O el derivado con bzip. Una vez obtenidos éstos, se han sustituido los átomos de cloro por grupos S-dadores (grupos tiopirimidínicos y tioureas), grupos O-dadores (unidades acetatos y aminoácidos) y grupos C-dadores (residuos alquínulos aromáticos). Estos complejos han sido caracterizados por las técnicas habituales, incluyendo difracción de rayos X para dos de los complejos sintetizados: $[Au(C\equiv CToliPh)(tpy)]$ y $[AuCl(Spym)(ppy)]$. Además, también se recoge la preparación de complejos de Au(I) con el fosfano soluble en agua, trisdimetilaminofosfano (HMPT), y grupos S-dadores y C-dadores. De algunos de estos derivados, también se ha conseguido resolver la estructura cristalina por difracción de rayos X: $[Au(4-OMe-fenilacetileno)HMPT]$, $[Au(Tolilacetileno)HMPT]$, $[Au(2-Mercapto-4,6-Dimetilpirimidina)HMPT]$ y $[Au(2-Mercaptobenzotiazol)HMPT]$. Una vez caracterizados los derivados de Au(I) y Au(III), se han estudiado sus propiedades anticancerígenas frente a tumores de colon. En primer lugar, se han realizado estudios de viabilidad celular por el método colorimétrico MTT, por el que se ha observado que mientras los derivados de Au(I) son bastante activos frente a las células tumorales de carcinoma de colon humano (línea celular Caco-2/TC7), solo unos pocos derivados de Au(III) tienen un limitado efecto sobre la viabilidad de estas células. Este estudio, en conjunción con otros realizados en células de la misma línea celular que se pueden considerar células epiteliales normales, ha permitido seleccionar aquellos compuestos citotóxicos y selectivos a células tumorales. Los complejos que muestran esta selectividad, son los derivados de Au(I), y por ello, han sido escogido para profundizar sobre su mecanismo de acción. En concreto, se han realizado estudios de ciclo celular, apoptosis y estrés oxidativo en células Caco-2. Los complejos de Au(I) son capaces de producir alteraciones en el ciclo de las células tumorales Caco-2. Los estudios de apoptosis han permitido concluir que los complejos son inductores de apoptosis, puesto que se ha podido detectar fosfatidilserina (PS) en la capa externa de la membrana celular; sin embargo, estos complejos no desencadenan la cascada de las caspasas para la muerte celular programa (MCP). Esta MCP no parece iniciarse por daño oxidativo en proteínas, ya que no se han encontrado proteínas carboniladas; pero sí se ha detectado daño en los lípidos de membrana a través del método de cuantificación de especies hidroxialquénales (HDA) y malondialdehído (MDA). Este estrés oxidativo podría explicarse por la inhibición de la proteína antioxidante tioredoxina reductada (TrxR), ya que se han realizado estudios donde se comprueba como la mayoría de los complejos de Au(I) sintetizados, provocan la inhibición de esta proteína.

Asimismo, y en un esfuerzo por simular de una forma más realista el cáncer de colon, se han realizado estudios en cultivos primarios de tumores de colon de ratones tratados con azoximetano y dextrano sulfato de sodio. Las células provenientes de los tumores resultantes, han sido sembradas y utilizadas para la realización de un nuevo estudio de MCP por externalización de PS, en el que se ha observado como todos los complejos de Au(I) son pro-apoptóticos.

En base a todos estos estudios, se ha podido concluir que los complejos de Au(I) son más citotóxicos que los derivados de Au(III); la mayoría de los derivados de Au(I) han resultado ser selectivos a células tumorales Caco-2, especialmente los complejos con unidades acetileno. De entre los derivados estudiados de Au(I), los complejos con etinil piridina así como con Cl y Br etinil benceno han resultado ser los que tienen efecto en más dianas terapéuticas, siendo por lo tanto, los mejores candidatos para ser una alternativa a la quimioterapia actual.

ABREVIATURAS

2-TU: 2-tiouracilo

4,6-*Spym/S(Me)₂pym*):4,6-dimetil-2-mercapto pirimidina

7-AAD: 7-aminoactinomicina D

aa: aminoácido

AANE: aminoácidos no esenciales

Abs: absorbancia

ADME-tox: Absorción, Distribución, Metabolismo, Excreción y Toxicidad

ADN: ácido desoxirribonucleico

Ala: alanina

AOM: azoximetano

APC: gen adenomatous polyposis coli

Arg: arginina

ARN: ácido ribonucleico.

ASB: albúmina sérica bovina

ASH: albúmina sérica humana

Asp: aspartato

bzp: 2-bencilpiridina

CAT: catalasa

CCR: cáncer colorrectal

CD₃CN: acetonitrilo deuterado

CDCl₃: cloroformo deuterado

Cdk: ciclinas

céls: células

CH₂Cl₂: diclorometano

cis-Pt: Cisplatino o cis-diaminodicloroplatino(II)

Cys: cisteína

dATP/ATP: desoxiadenosina-5'-trifosfato/trifosfato de adenosina

DCTB: 1,1-diciano-4-butilfenil-3-metilbutadieno

DMEM: Medio Esencial Mínimo de Eagle modificado por Dulbecco

DMSO: dimetilsulfóxido

DNPH: 2,4-dinitrofenilhidrazina

drcha.: derecha

DSS: dextrano sulfato de sodio

DTA: análisis térmico diferencial

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

ε: coeficiente de extinción molar

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

EEM: error estándar medio

EtOH: etanol

FITC: isotiocianato de fluoresceína

G: guanina

Glu: Glutamina

Gly: glicina

GPx: glutatión peroxidasa

GR: glutatión reductasa

GSH: glutatión

GSSH: glutatión oxidado

GST: Glutatión transferasa

HDA: hidroxialquenes

HMPT: trisdimetilamino fosfano

IR: espectroscopia infrarroja

izq.: izquierda

K_b: constante de unión

K_q: constante de quenching

K_{SV}: constante de Stern-Volmer

MALDI: desorción/ionización mediante láser asistida por matriz

MCC: medio de cultivo completo

MCP: muerte celular programada

MDA: malondiadehído

MDE: medio de digestión enzimática

Me: metilo

MeCN: acetonitrilo

MeOH: metanol

Met: metionina

MRA: medio de recogida y almacenamiento de tejido

MTT: Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio

NADH: dinucleótido de nicotinamida y adenina

NADPH/NADP⁺: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido/oxidado

Ø: pocillo

OAc: grupo acetato

PBS: tampón fosfato salino

Ph: grupo fenil

Phe: fenilalanina

PI: yoduro de propidio

ppy: 2-fenilpiridina

Prx: peroxidasa

PS: fosfatidilserina

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

py: piridina

RMM: sistema de reparación del ADN

RMN: resonancia magnética nuclear

ROS: especies reactivas de oxígeno

rpm: revoluciones por minuto

SAR: relación estructura-actividad

SFB: suero fetal bovino

SI: sacarosa-isomaltosa

S₂₅: solubilidad a 25°C

SOD: superóxido dismutasa

Spym: 2-mercaptopirimidina

Sw: solubilidad en agua

T: timina

TCA: ácido tricloroacético

TGA: análisis termogravimétrico

tht: tetrahidrotiofeno

TNB: ácido 5-tio-2-nitrobenzoico

TNF: Factor de necrosis tumoral

tpy: 2-tolilpiridina

Trp: triptófano

Trx: tiorredoxina

TrxR: tiorredoxina reductasa

TS: timidilato sintasa

Tyr: tirosilo

UV: ultravioleta

λ: longitud de onda

Capítulo I: Introducción

INTRODUCCIÓN

A lo largo de la historia, desde los primeros homínidos hasta el hombre actual, los seres humanos han demostrado una gran capacidad de adaptación y evolución. Esta propiedad no sólo se manifiesta a nivel individual, sino también a nivel colectivo. Además de estas características, al ser humano se le pueden atribuir muchas otras cualidades como la sociabilización, la curiosidad o/y la empatía. De hecho, puede ser que estos tres últimos rasgos hayan sido los que hayan impulsado al ser humano a evolucionar. El motor que ha potenciado que el hombre tenga necesidad de conocer y comprender aquello que le rodea es la curiosidad; pero el intentar aplicar lo que conoce a mejorar el estilo y calidad de vida propio y del resto de la sociedad se explican por esa empatía y evolución.

Analizar, estudiar e intentar comprender un proceso, una transformación o una forma de vida es, a grandes rasgos, lo que llamamos investigación; y siempre tiene como fuerza impulsora el poder aprovechar ese conocimiento adquirido en aras del desarrollo común. Así, el hombre ha conseguido entender y controlar gran parte de la naturaleza, aunque aún quedan muchas incógnitas, principalmente en lo que a su propio cuerpo se refiere. Así pues, nuestra calidad de vida ha mejorado de forma considerable con el desarrollo de nuevos materiales, energías más eficientes e infraestructuras más resistentes. Sin embargo, en relación con el control de ciertos procesos metabólicos y enfermedades existe aún un gran camino por recorrer.

Si bien es cierto que ya hemos sido capaces de desarrollar medicamentos para muchas enfermedades, todavía hay mucho trabajo no sólo en la lucha contra determinadas enfermedades sino también en el perfeccionamiento de las terapias actuales. Estas mejoras deben centrarse tanto en conseguir medicamentos más eficaces, como en que los pacientes puedan llevar una vida normal y cómoda durante el tratamiento en cuestión, puesto que, como ya se ha mencionado, una investigación necesaria es aquella que beneficia a la calidad de vida de la sociedad.

Este ha sido el motivo de la investigación que aquí se recoge, diseñar nuevos fármacos que combatan el cáncer de colon de la forma más selectiva posible, para minimizar los posibles efectos secundarios. A día de hoy, cada tipo de cáncer se aborda de una forma diferente, aunque se pueden considerar básicamente tres tratamientos: cirugía, quimioterapia y/o radioterapia. Aunque estas terapias son las más extendidas, hay otros tratamientos muy prometedores, como por ejemplo la inmunoterapia. La inmunoterapia se erige como el futuro de la lucha contra el cáncer, de hecho, los investigadores James P. Allison y Tasuku Honjo, recibieron el Premio Nobel de Medicina en 2018 por sus avances en este campo. Esta alternativa busca potenciar el propio sistema inmunitario del paciente para que sea éste y no un agente externo, quien luche contra la enfermedad. Su limitación es precisamente ésta, puesto que no es aplicable a tumores que se esconden a la respuesta inmunitaria, los conocidos como tumores fríos, como el cáncer de mama, algunos de pulmón y ciertos tumores gástricos.

Así pues, mientras se investiga en nuevas formas de tratamiento, la quimioterapia sigue siendo la más aplicada. En lo que se refiere al uso de quimioterápicos antitumorales, lo más habitual es el uso de un cóctel de fármacos entre los que se incluye un complejo metálico: *cis*-platino. No obstante, sus efectos secundarios son bien conocidos y están bien establecidos; por ello, una mejora de este cóctel o el desarrollo de un fármaco capaz por sí sólo de combatir la enfermedad, sigue siendo la asignatura pendiente de la comunidad científica.

EL APARATO DIGESTIVO Y EL COLON

Como ya se ha comentado, el hombre ha conseguido entender y comprender gran parte de los procesos que le rodean, incluso los que tienen lugar en su propio cuerpo. Este hecho ha sido determinante para poder desarrollar fármacos que actúen sobre los distintos procesos del organismo, sin alterar el correcto funcionamiento del mismo. Por ello, en primer lugar, se ha creído necesario realizar una breve explicación sobre el aparato digestivo, y más concretamente sobre el colon, puesto que es el órgano en el que se va a centrar esta tesis doctoral.

FUNCIONES DEL APARATO DIGESTIVO

El aparato digestivo desempeña un papel fundamental en la homeostasis del organismo, ya que va ser él quien traslade agua, electrolitos y nutrientes desde el medio externo al interno. El proceso de digestión consta de cuatro partes bien diferenciadas:¹

- .. Digestión, que consiste en la obtención de unidades absorbibles de los alimentos mediante su degradación química y mecánica.
- .. Absorción, que supone la transferencia de estas unidades desde la luz intestinal al medio extracelular.
- .. Motilidad, proceso por el cual el alimento se mueve a través del tubo digestivo.
- .. Excreción, que consiste en la transferencia de sustancias y electrolitos desde el medio extracelular a la luz intestinal.

Así, el alimento entra al aparato digestivo por la cavidad oral, compuesta por boca y faringe, y llega al estómago a través del esófago. En el estómago, mediante la secreción de ácidos y enzimas, tiene lugar la mayor parte de la digestión química. El resto de los procesos que conforman la digestión, así como la absorción de los productos de digestión, tienen lugar en el intestino delgado. A medida que la materia desciende por el tubo digestivo, órganos como páncreas o el hígado también secretan las enzimas pancreáticas y la bilis, respectivamente, para formar una mezcla en la luz del intestino llamada quimo.

El resto del alimento no absorbido pasa al intestino grueso, donde se absorbe agua y electrolitos, y se forman las heces, para ser finalmente excretadas por el ano, mediante movimientos conocidos como *movimientos en masa* (defecación).

EL COLON: ANATOMÍA E HISTOLOGÍA

El aparato digestivo consta de varias partes: la cavidad oral, el tubo digestivo y los órganos de las glándulas accesorias. El tubo digestivo es un tubo largo que atraviesa el cuerpo y lo conforman el esófago, el estómago y los intestinos delgado y grueso. La pared de estos órganos digestivos es muy similar entre ellos, aunque con pequeñas diferencias en función de las funciones específicas que desempeña cada órgano. Así, la pared del tubo digestivo está compuesta por cuatro capas: la capa más interna es la mucosa, debajo de ésta se encuentra la submucosa, seguida una capa de músculo liso y, finalmente, la capa más externa es la serosa.¹

La investigación que aquí se ha llevado a cabo, se ha centrado en el estudio del tratamiento del cáncer de colon, por lo que esta es la zona en la que se va a profundizar.

El colon forma parte del intestino grueso, el cual presenta la siguiente estructura:

- “ Ciego, con una longitud aproximada de 6 cm, es la zona siguiente al intestino delgado. Aquí continúa el proceso de absorción de agua y nutrientes.
- “ Colon y recto, ambas partes son estructuras musculares tubulares, pero de diferente longitud, pues mientras en la edad adulta el colon mide cerca de 120 cm, el recto tan sólo 16 cm. La función principal del colon, como ya se ha comentado, es la absorción de agua y nutrientes de los alimentos ingeridos, y el resto lo convierte en heces que pasarán al recto para ser excretadas.
- “ Canal anal, la última parte del intestino grueso, con una longitud entre 4-5 cm. Éste se abre al exterior por el ano, punto de salida de la materia fecal.

La pared del colon tiene las mismas capas que las mencionadas anteriormente, tal y como se puede observar en la Figura 1.1 (mucosa, submucosa, muscular y serosa), aunque presenta algunas diferencias respecto a la pared del resto de zonas del tracto gastrointestinal.

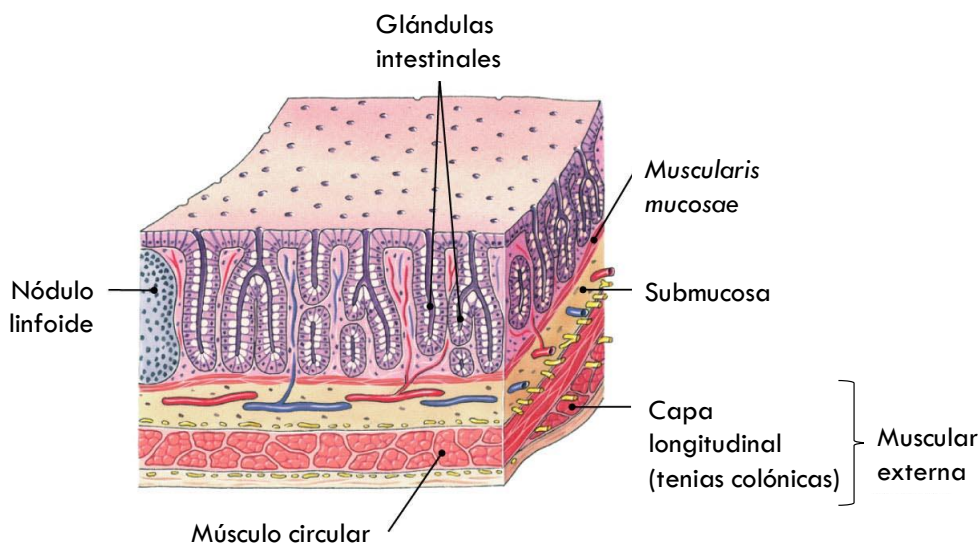


Figura 1.1. Esquema del corte transversal de la pared del colon.¹

- “ La capa mucosa es la capa más interna y la más gruesa. Está formada por tejido epitelial columnar simple y presenta criptas intestinales profundas, sin las vellosidades observadas en el intestino delgado. El epitelio está formado por células caliciformes, que secretan moco; células endocrinas, que secretan hormonas; y células madre basales; así como células absortivas (colonocitos) con un borde apical en cepillo. Por debajo de la capa epitelial, se encuentra la lámina propia, formada por tejido conectivo, que mantiene el epitelio en su lugar, y contiene vasos sanguíneos y linfáticos, a los que entran los nutrientes absorbidos. En la lámina propia aparece también tejido linfático que forma pequeños nódulos linfáticos. Por último, la *muscularis mucosae* o muscular de la mucosa, es una capa delgada de músculo liso, que separa la mucosa de la submucosa. Es de destacar, que es precisamente en esta capa mucosa, y en concreto en las células epiteliales, donde se desarrolla el proceso canceroso, objeto de estudio de esta tesis.

- .. La submucosa es una capa compuesta por tejido conectivo con vasos sanguíneos y linfáticos más grandes y contiene el plexo submucoso o de Meissner, una de las dos redes nerviosas mayores del Sistema Nervioso Entérico, que coordina la función digestiva.
- .. La capa muscular, se encuentra por debajo de la submucosa y contiene dos capas de células musculares lisas que se contraen y permiten la función de motilidad en el intestino grueso.
 - Capa muscular longitudinal: es la capa más externa y se organiza en tres bandas longitudinales llamadas tenias colónicas.
 - Capa muscular circular: es la capa más interna, su engrosamiento produce los pliegues semilunares del colon.
- .. La capa serosa es la capa más externa, compuesta por una fina capa de tejido epitelial escamoso, cuya misión es la secreción del líquido seroso, y otra fina capa de tejido conjuntivo. Este líquido lubrica la superficie del intestino grueso protegiéndolo de la fricción con órganos, músculos y huesos circundantes.

EPIDEMIOLOGÍA, ETIOLOGÍA Y DESARROLLO DEL CÁNCER DE COLON

EPIDEMIOLOGÍA DEL CÁNCER DE COLON

El cáncer colorrectal es el tercer cáncer más común entre los hombres y el segundo más común entre las mujeres en todo el mundo.² En España, el cáncer colorrectal es el más diagnosticado, y es el segundo cáncer que más muertes provoca tanto en hombres como en mujeres (Figura 1.2). Son estos datos los que han promovido que esta tesis doctoral se centre en el estudio de nuevas alternativas para el tratamiento de este tipo de cáncer.

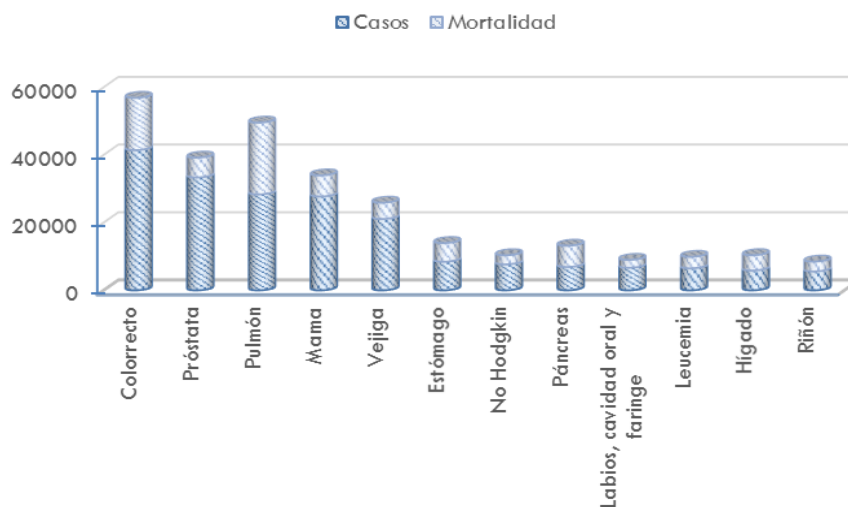


Figura 1.2. Incidencia y mortalidad del cáncer registrada en España, según el tumor.³

ETIOLOGÍA DEL CÁNCER DE COLON

El funcionamiento normal del colon se basa en el equilibrio preciso de la proliferación, diferenciación y muerte de las células epiteliales, donde alrededor de unas 10^{10} células se reemplazan diariamente en un colon humano.⁴ La regulación de estos procesos de proliferación y desprendimiento de células ocurre en las criptas, que se renuevan continuamente por la división de las células madre. Es precisamente esta regeneración celular continua, la que hace que el colon sea una zona vulnerable donde se pueden generar mutaciones malignas que desencadenen tumores.⁵

El inicio del proceso tumoral comienza por el cambio en una única célula. Este cambio puede ser debido a diferentes factores, bien externos o bien de tipo genético heredados; no obstante, la mayor parte de los cánceres diagnosticados están asociados con factores ambientales y/o nutricionales. Estos factores externos inductores de cáncer se denominan sustancias carcinógenas y pueden ser de varios tipos en función de su naturaleza:

- Carcinógenos físicos: como radiación ultravioleta o la radiación ionizante emitida por sustancias radiactivas. De hecho, se calcula que la radiación ultravioleta es la responsable del 90% de los cánceres en labios, del 50% de los melanomas y del 80% de los demás cánceres de la piel.
- Carcinógenos químicos: como cloruro de vinilo, componentes del humo del tabaco, aflatoxinas (un contaminante de los alimentos) o arsénico, entre otros.
- Carcinógenos biológicos: como infecciones de ciertos virus, bacterias o parásitos.

El cáncer colorrectal (CCR) está estrechamente relacionado con ciertas mutaciones genéticas hereditarias, aunque sólo el 3-5% de los cánceres colorrectales diagnosticados se deben exclusivamente a estas mutaciones.⁶ Uno de los factores más influyentes en el desarrollo de CCR, es el estilo de vida, ya que se sabe que el consumo de tabaco, el alto consumo de alcohol, el bajo consumo de vegetales, la obesidad y la inactividad física implican un mayor riesgo de este tipo de cáncer. Asimismo, el uso de hormonas postmenopáusicas, el uso de fármacos antiinflamatorios no esteroideos y la ingesta elevada de calcio se asocian con un riesgo reducido.⁷ De esta forma, se puede concluir que los carcinógenos más relacionados con el CCR, son los de tipo químico a través de la mutación celular.

DESARROLLO DEL PROCESO TUMORAL

Cuando una célula sana realiza el proceso de división celular, su ADN se duplica utilizando el ADN original como base para generar la nueva copia (ADN replicado). En este proceso, los sistemas de reparación tienen un papel crucial, ya que son los responsables de corregir las mutaciones que se producen durante la replicación del ADN, como consecuencia de sustancias carcinógenas.⁸⁻⁹ Sin embargo, cuando se dan varias mutaciones en el ADN, o incluso en los genes responsables del sistema de reparación del ADN (RMM), el daño no se subsana y esa célula, con información genética mutada, es replicada (Figura 1.3). Son estos errores los que derivan en la acumulación de múltiples mutaciones genéticas, que se traducen en una modificación de la mucosa intestinal, empezando por generar primero un pólipo adenomatoso hasta finalmente el adenocarcinoma.

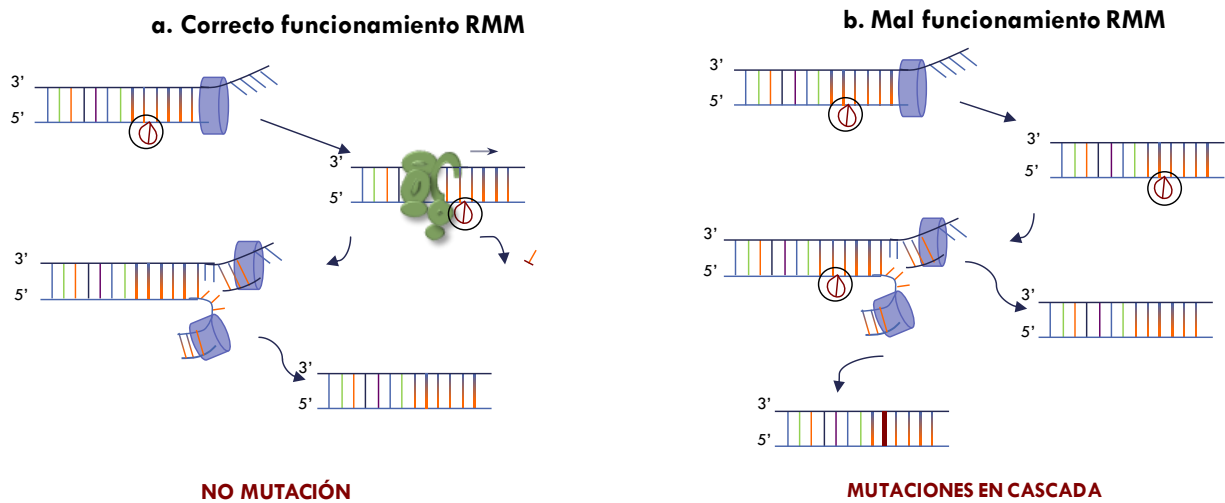


Figura 1.3. Esquema del funcionamiento del sistema RMM.

La progresión del adenocarcinoma está controlada por una cascada de eventos que, en la mayoría de los tumores denominados esporádicos, comienza con la mutación del gen *APC* (adenomatous polyposis coli). De hecho, se asocia con la mayoría de los tumores colorrectales, siendo detectable en el 63% de los adenomas y el 60% de los carcinomas.¹⁰ El gen *APC* es un supresor tumoral que desencadena la degradación por fosforilación de la β -catenina, mediante la coordinación a ella. Así, la mutación en este gen inhibe este proceso, provocando que la concentración de β -catenina aumente; esto hace que se dé una mayor proliferación celular y una disminución de la muerte celular programada (apoptosis). De esta forma, las células mutadas van creciendo en número de forma exponencial, y es entonces cuando se da la transformación de una célula normal del epitelio a un adenoma temprano (Figura 1.4).

Estos adenomas son pólipos que se forman cuando los procesos de renovación epitelial están alterados.¹¹ Al ir creciendo el número de células epiteliales, se producen las ramificaciones características de los adenomas. Éstos desarrollarán características de malignidad e invadirán el tejido, y es en ese punto cuando se considerará un adenocarcinoma o tumor.¹²

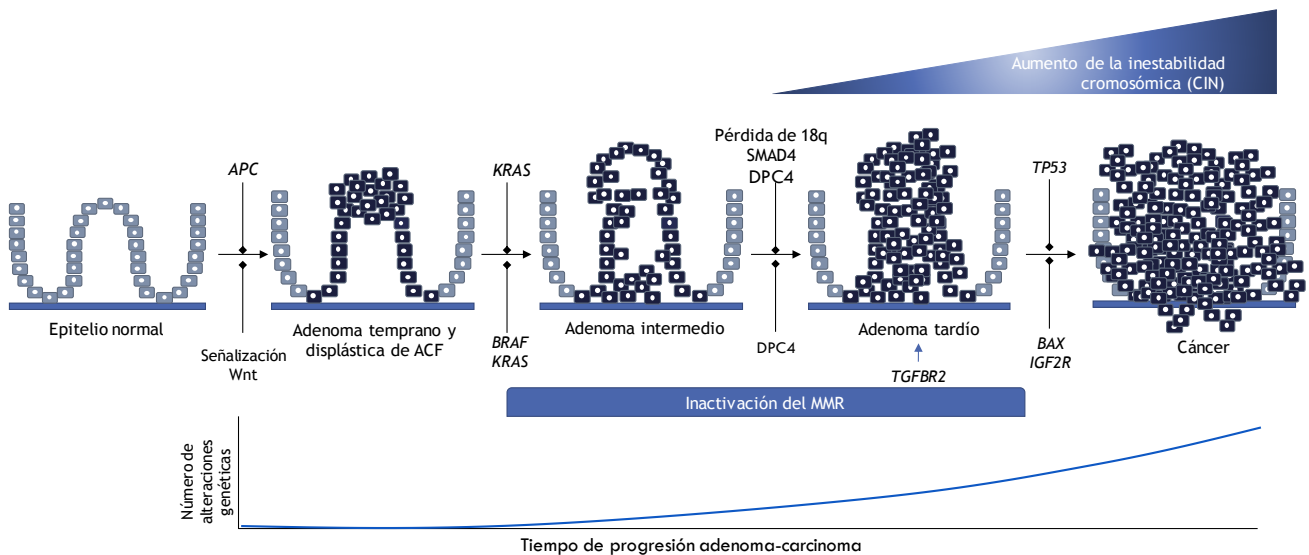


Figura 1.4. Esquema de la evolución del proceso tumoral en el colon.

El paso inicial en la tumorigénesis es el de la formación de adenoma, asociado con la supresión de la expresión del gen *APC*. Los adenomas más grandes y los carcinomas tempranos adquieren mutaciones en la GTPasa *KRAS*, seguida de la pérdida del cromosoma 18q y de los genes supresores de tumores *SMAD4* (también llamado *DPC4*), así como mutaciones en *TP53* en los carcinomas tangibles.

Además del papel del gen *APC*, el gen *TP53* también parece ser determinante, considerado incluso el más importante durante la tumorigénesis colorrectal. Este gen codifica la proteína *P53* que es un factor de transcripción multifactorial, implicado en el control de la progresión del ciclo celular, integridad del ADN y supervivencia de las células expuestas a agentes que dañan al ADN.¹³⁻¹⁴ Cuando el ADN está dañado, *P53* se activa para mantener la integridad de la secuencia del ADN, bien mediante la parada de la proliferación celular mientras que el daño es reparado, o alternativamente, dirigiendo a la célula hacia la apoptosis.¹⁵ Así, el correcto funcionamiento de *P53* disminuye la probabilidad de poblaciones celulares mutadas y con ello, de desarrollar tumores.¹⁶ Debido a su papel fundamental en la protección de las mutaciones en el ADN, *P53* se suele denominar como "guardián del genoma".

La mutación en el gen *TP53* está detrás del 40-50% de los tumores esporádicos, con el agravante de que este tipo de tumores suelen desarrollar una mayor resistencia a los fármacos convencionales.¹⁷ Es por esto, por lo que investigar en el desarrollo de alternativas en el tratamiento de CCR sigue siendo una prioridad.

Estas alternativas no sólo deben de ser efectivas, sino también selectivas; es decir, que desempeñen su actividad citotóxica exclusivamente en células tumorales de forma que se minimicen los efectos secundarios. Para conseguir esta selectividad, se aprovechan las diferencias estructurales y metabólicas que presentan las células tumorales respecto de las células sanas. Estas diferencias son:

- El crecimiento y la división celular están regulados por señales a las que las células tumorales no responden; por lo tanto, la velocidad de proliferación de éstas es mucho mayor que la de las células sanas.
- Mientras que las células normales se especializan en una función determinada, las cancerosas carecen de esta diferenciación (anaplasia).

- .. Las células tumorales, debido a la falta de una estructura superficial, son capaces de separarse de otras células cercanas. Es este hecho el que permite la invasión de otros órganos o tejidos que deriva en la formación de tumores secundarios o procesos de metástasis.
- .. Asimismo, se van a formar nuevos vasos sanguíneos para abastecer de nutrientes a las células tumorales (angiogénesis tumoral).

Estas características indican como las células tumorales son más demandantes de nutrientes y energía que las células normales.

CICLO CELULAR Y PROLIFERACIÓN CELULAR

A lo largo de este capítulo, se puede observar como el concepto de equilibrio entre regeneración (proliferación) y muerte celular es fundamental para el correcto funcionamiento, no sólo del colon sino del organismo en general. Las células que constituyen todo ser vivo, mediante un ciclo perfectamente coordinado y controlado, crecen, se reproducen y mueren de forma continua. Es de esta forma, como existe este cuidado equilibrio entre la proliferación de las células, que permiten la regeneración de los tejidos; y la muerte celular programada (apoptosis), que hace que el número de células sea constante.

El proceso mediante el cual se mantiene este equilibrio se denomina ciclo celular, y consta de una serie de eventos perfectamente orquestados y controlados por numerosos genes, que hacen que la célula prolifere o muera, en caso de que presente algún daño en su información genética. Sin embargo, una célula tumoral presenta mutaciones en algunos de los diferentes genes que controlan este ciclo,¹⁸ lo que les permite alterar su ciclo celular. Las mutaciones en estos genes son variables en función del tipo del cáncer, pero independientemente del daño genético o del tipo de cáncer, todos presentan alteraciones en el ciclo celular.

Este ciclo celular está formado por varias etapas bien diferenciadas durante las cuales la célula original va a aumentar de tamaño, copiar sus orgánulos y componentes moleculares (Fase G1) para la síntesis de una copia completa de su ADN (Fase S), tras la cual reorganiza su contenido y se prepara la mitosis (Fase G2). Será en la mitosis (Fase M), cuando la célula divida el ADN duplicado y su citoplasma, y genere dos nuevas células.

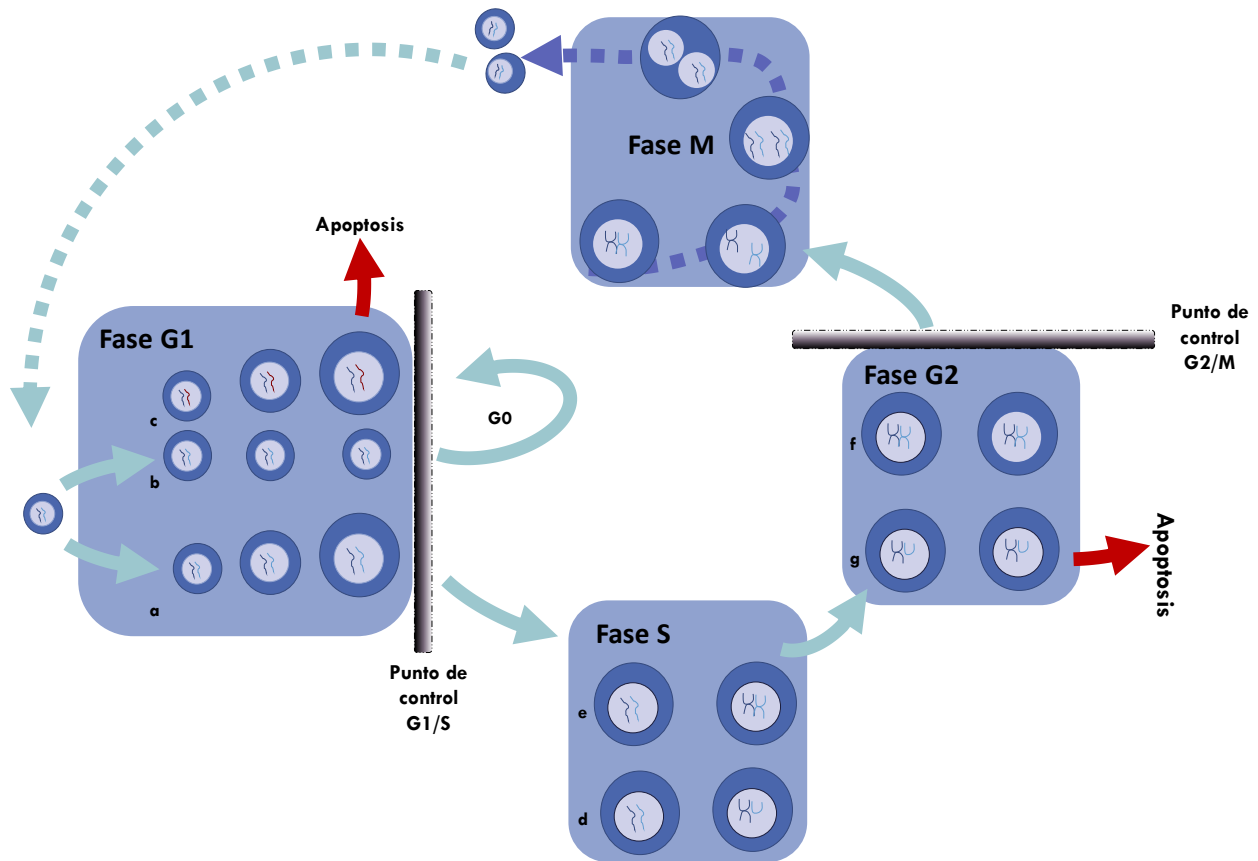


Figura 1.5. Etapas del ciclo celular.

Fase G1: La célula crece y se prepara para sintetizar ADN; Fase S: Se produce la replicación del ADN; Fase G2: La célula se prepara para dividirse; y Fase M: Se produce la división celular. Punto de control G1/S, impide el paso a la Fase S a las células con ADN dañado; G0: Fase de parada temporal para las células con falta de nutrientes o con ADN dañado y susceptible de ser reparado; Punto de control G2/M: control de la copia correcta y total de ADN.

Además de las fases G1, S, G2 y M, existen unos puntos de control, tal y como se muestran en la Figura 1.5. Se trata de etapas cruciales del ciclo celular ya que su función es controlar que la célula que se va a dividir no presenta mutaciones. En caso de que la célula contenga ADN dañado, estos puntos de control van a iniciar procesos de reparación o de muerte celular programa (apoptosis).

De esta forma, en la fase G1 sólo aquellas células que hayan alcanzado el tamaño adecuado avanzarán a la fase S (Figura 1.5a). El resto de las células serán detectadas por el punto de control G1/S, pudiendo darse dos situaciones: las que no tengan el tamaño suficiente avanzarán a la fase G0 para realizar el crecimiento (Figura 1.5b); y aquellas con información genética dañada comenzarán procesos apoptóticos para ser eliminadas (Figura 1.5c).

En la fase S, se produce la síntesis de una copia del ADN; no obstante, y dado que no existe un punto de control entre las fases S y G2, las células con fallos en la replicación de ese ADN (Figura 1.5d) continuarán a la fase G2 junto con las que contienen la información genética completa (Figura 1.5e). En esta fase, se va a producir la reorganización necesaria para la fase mitótica; fase a la que tan sólo entran estas últimas (Figura 1.5f), ya que las células con ADN incompleto son detectadas por el punto de control G2/M, e inducen procesos de muerte celular (Figura 1.5g).

Por ello, se puede concluir que un mal funcionamiento de los puntos de control G1/S, G2/M o del sistema RMM, produce inestabilidad genómica, acumulación de células con ADN dañado y proliferación celular no controlada, características propias de procesos tumorales.¹⁹⁻²⁰ Asimismo, conviene mencionar que cuando estos puntos de control son superados, la célula va a realizar la siguiente fase de forma irreversible;²¹ por lo que si una célula con ADN mutado consigue superar el punto G2/M realizará la división celular produciendo dos nuevas células con esa mutación presente.

Tal y como se puede entrever, las transiciones moleculares se regulan a través de tanto señales externas (p.Ej. señales moleculares), como señales internas (p.Ej. daño en el ADN). De esta forma, una compleja red reguladora controla el orden correcto del ciclo, así como de realización eventos clave como la replicación del ADN o la separación de cromosomas. Los controladores centrales de esta red son complejos de Cdk y moléculas de ciclina. Varios pares de Cdk/ciclina regulan las transiciones críticas del ciclo celular, donde inician la replicación del ADN en la transición de la fase G1 a la S. También desempeñan un papel clave en la inducción de la mitosis. Además, Cdk/ciclina inhibe los últimos pasos del ciclo; es decir, la separación de los cromosomas al final de la mitosis y la división celular.

Los análisis de proliferación celular son cruciales para los estudios de crecimiento y diferenciación celular, y se usan a menudo para evaluar tanto la toxicidad de los compuestos como la inhibición del crecimiento de células tumorales durante el desarrollo de un fármaco.

MUERTE CELULAR PROGRAMA: APOPTOSIS

Como ya se ha comentado, cuando durante el ciclo celular se detecta una célula con ADN dañado, insuficiencia de nutrientes o falta de orgánulos o estructuras a través de estos puntos control, además del arresto de esa célula para que corrija sus defectos, se desencadena un proceso fisiológico que induce su propia muerte. Este proceso se denomina apoptosis y está mediado por la activación de una serie de moléculas (la cascada apoptótica) que produce la muerte celular programada (MCP).²²⁻²³

De esta manera, la apoptosis juega un papel importante en el desarrollo celular mediante el control y la regulación de la respuesta inmunitaria y la homeostasis tisular.²⁴⁻²⁵ La inducción de la apoptosis conduce a la formación de corpúsculos celulares, la exposición de la fosfatidilserina a la superficie celular, la reducción del tamaño celular, la contracción del núcleo celular, la condensación del ADN y la formación de cuerpos apoptóticos; lo que permite que se produzca la fagocitación de éstos sin liberación del contenido celular al medio extracelular.²⁶⁻²⁷ Esto es importante, porque es la razón por la que este tipo de muerte no provoca procesos inflamatorios asociados, en algunos casos, con carcinogénesis.²⁸

EXTERNALIZACIÓN DE FOSFATIDILSERINA

Entre las señales por las que se activan los mecanismos de apoptosis se encuentra la externalización de un fosfolípido de membrana, la fosfatidilserina. La membrana celular tiene una doble función, pues no sólo desempeña un papel estructural, sino también impide la difusión de moléculas esenciales para la célula al espacio extracelular. Esta membrana está compuesta por diferentes tipos de proteínas y lípidos. Las proteínas mantienen las condiciones químicas de la célula y ayudan en la transferencia de moléculas a través de la membrana; mientras que los lípidos, componente mayoritario de las membranas celulares, confieren flexibilidad a la membrana. Tanto en lo referente a lípidos como a las proteínas, se dan diferentes tipos en función del organismo, célula, orgánulo, etc.²⁹

Los lípidos de membrana más abundantes son los fosfolípidos y el colesterol, y su distribución es asimétrica, siendo diferente en la capa externa respecto de la interna. De esta forma, en células normales, la fosfatidilcolina y la esfingomielina están presentes principalmente en la capa externa, mientras que la fosfatidilserina, el fosfatidilinositol y la fosfatidiletanolamina están restringidas a la capa interna.³⁰ Sin embargo, por acción de las enzimas flipasas y flopasas, la localización de los fosfolípidos queda invertida y así, la fosfatidilserina (PS) queda expuesta en la capa externa. Este hecho se observó por primera vez en linfocitos apoptóticos,³¹⁻³² para después apreciarse en un gran número de líneas tumorales; por ello, la presencia de PS en la capa externa de la membrana celular, está aceptada como una característica universal de células apoptóticas. Udugamasooriya *et al.* confirmaron este hecho con estudios inmunocitoquímicos con el anticuerpo bavituximab para PS. Así, mientras las células HCC4017 de cáncer de pulmón, son positivas para la tinción con bavituximab, las células epiteliales normales HBEC30KT no presentaron tinción alguna (Figura 1.6).³³

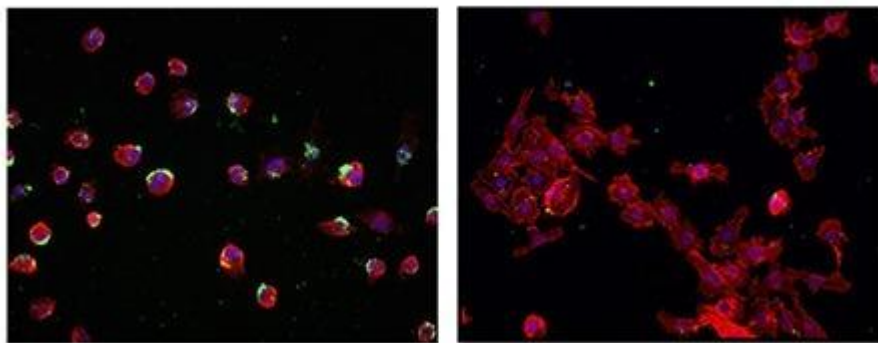


Figura 1.6. Estudio de la externalización de PS en células HCC4017 de cáncer de pulmón (izq.), y células epiteliales normales HBEC30KT (drcha.)

En la presente investigación, la evaluación de este cambio en la disposición de la PS en la membrana se ha realizado a través de estudios de citometría de flujo mediante la utilización de anexina-V, la cual se conjuga con un fluoróforo. Así, la detección de PS constituye un marcador ideal que refleja el estado apoptótico de las células, con independencia del origen del estímulo que indujo este cambio.

CASCADA DE LAS CASPASAS

Además de la presencia de fosfatidilserina en la membrana exterior celular, existen otras vías de señalización que participan en la activación de la apoptosis. De entre las posibles vías apoptóticas, las dos vías principales son:³⁴

- La vía extrínseca: dependiente del receptor de la muerte a través de ligandos de la familia TNF (factor de necrosis tumoral).
- La vía intrínseca o mitocondrial: inducida por factores como radiación UV, quimioterapia, radicales libres o daño del ADN.

Aunque las dos vías mencionadas presentan diferentes mecanismos de activación, parecen estar muy relacionadas. De hecho, se conocen moléculas presentes en una de las vías que afecta a la otra y viceversa. Asimismo, comparten la misma vía de ejecución, la iniciación de la cascada de la familia de las caspasas.³⁵⁻³⁶ Estas proteasas se expresan en la mayoría de las células, aunque en ausencia de las señales anteriores, se encuentran en su forma inactiva (zimógeno). De esta forma, las caspasas deben ser activadas mediante las caspasas iniciadoras, caspasas-8 y -9. Las denominadas caspasas ejecutoras (caspasas-3, -6 y -7) son capaces de escindir varios cientos de sustratos, y son comunes para las dos vías de apoptosis descritas anteriormente. Sin embargo, la movilización de una caspasa iniciadora u otra, sí es dependiente de la vía de MCP. Así mientras la vía extrínseca activa la caspasa-8, la vía intrínseca hace lo propio con la caspasa-9 (Figura 1.7).³⁷

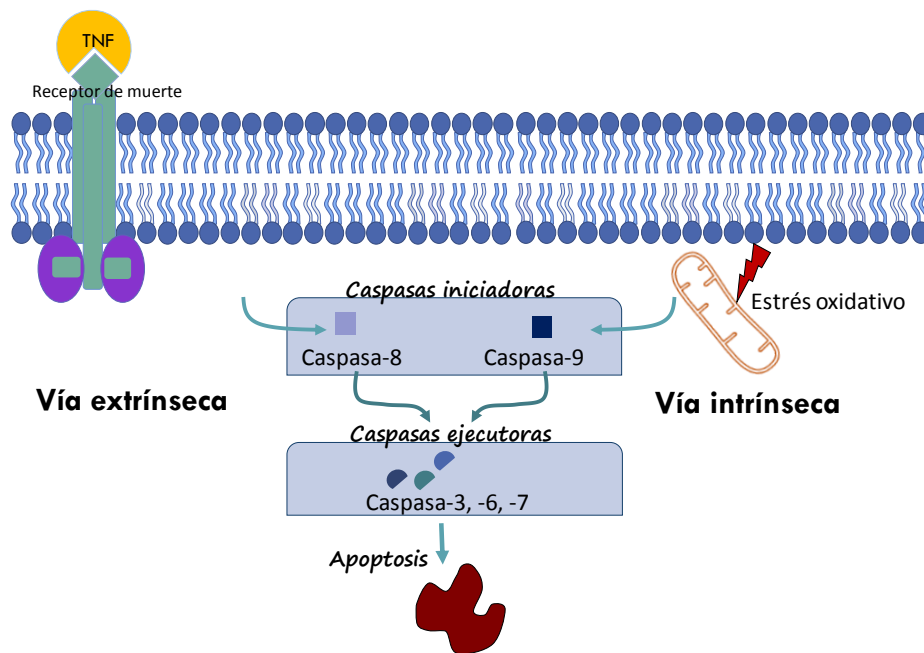


Figura 1.7. Activación de la apoptosis por las vías de señalización extrínseca e intrínseca de las caspasas.

Actualmente se conocen un total de 14 caspasas, que se clasifican en iniciadoras, ejecutoras y mediadoras de procesos inflamatorios, y a pesar de que todas son cisteína-aspartil proteasas específicas, presentan diferencias estructurales que van a definir su función en la cascada apoptótica.

Las caspasas iniciadoras se caracterizan por tener un prodominio N-terminal extendido, compuesto por al menos 90 aminoácidos, que es fundamental para desempeñar su función. Sin embargo, el prodominio de las caspasas ejecutoras contiene aproximadamente una secuencia de unos 20-30 residuos. La activación de estas caspasas ejecutoras, por acción de una caspasa iniciadora, implica la escisión en residuos específicos de Asp internos que separan las subunidades grandes y pequeñas. Las caspasas iniciadoras, sin embargo, son capaces de autoactivarse.

Dado que la activación de una caspasa iniciadora en las células desencadena una cascada de activación de caspasas descendente, está fuertemente regulada y, suele requerir del ensamblaje de un complejo multicomponente en condiciones apoptóticas.³³ Por ejemplo, la activación de la procaspasa-9 se produce por la acción de Apaf-1 y citocromo c, para formar un complejo denominado apoptosoma en presencia de dATP o ATP.³⁸⁻⁴⁰

Además de las caspasas iniciadoras y ejecutoras, existe un tercer tipo que son las mediadoras de procesos infamatorios. Así, las caspasas-1, -4, -5 y -12 comprenden este subconjunto en humanos, mientras que la caspasa-1, -11 y -12 cumplen la misma función en ratones.⁴¹ A nivel protéicos, estas caspasas también se producen en su forma inactiva, y solo después de la estimulación celular mediante receptores de reconocimiento, se activan través de la formación de un complejo citosólico denominado inflamasma.⁴² Cabe mencionar, que además de la función inflamatoria, también se ha observado como la caspasa-1 puede inducir la cascada apoptótica que se requiere para la activación proteolítica de las caspasas ejecutoras.⁴³

En consecuencia, la cascada apoptótica que implica a la familia de las caspasas, también va a desempeñar un papel fundamental en el equilibrio que se viene comentando entre proliferación celular y MCP, y por ello, será objeto de estudio en la presente tesis.

ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (ROS)

Otro de los factores que se asocian con daño en el ADN, y que por tanto pueden ser causantes de procesos tumorales, son las especies oxidantes. De hecho, es bien conocido como factores como la radiación ultravioleta o el tabaco aumentan el riesgo de desarrollar cáncer a través de un aumento de especies oxidantes.⁴⁴

Durante la división y la respiración celular, incluido en células especialmente activas metabólicamente, se producen radicales libres y especies reactivas de oxígeno (ROS) involucradas en procesos tan importantes como:⁴⁵

- .. Metabolismo de oxígeno
- .. Inflamación
- .. Transducción de señales o vías de expresión genéticas
- .. Enfermedades como neurodegeneración, diabetes y, también cáncer.

Estas especies son beneficiosas y necesarias a concentraciones bajas; sin embargo, un aumento de la concentración de especies oxidantes en las células (estrés oxidativo) va a inducir daños que están asociados con procesos tumorales.

Entre las especies oxidantes más abundantes se encuentran las especies reactivas de oxígeno (ROS), producidas durante el metabolismo de oxígeno molecular, y denominadas así porque su química oxidante reside en el átomo de oxígeno.

Está establecido que la presencia de ese oxígeno molecular desencadena diversas reacciones de oxidación a través de las cuales, se forman radicales libres que evolucionan a ROS.⁴⁶ Estas especies pueden dividirse en dos grandes grupos, radicales libres y no radicales. Las moléculas que contienen uno o más electrones no apareados y que, por lo tanto, dan reactividad a la molécula, se denominan radicales libres.⁴⁷ Sin embargo, cuando dos radicales libres comparten sus electrones no apareados, se crean especies no radicalarias. Las tres especies ROS de mayor importancia fisiológica son el anión superóxido (O_2^-), el radical hidroxilo (OH^\bullet) y el peróxido (H_2O_2); aunque existen otras especies además de hidroperóxidos orgánicos (Tabla 1.1).

Tabla 1.1. Principales especies oxidantes y sus procesos.

Especie (fórmula)	Reacciones
Anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$)	$NADPH + 2O_2 \leftrightarrow NADP^+ + 2O_2^{\cdot-} + H^+$ $2O_2^{\cdot-} + H^+ \leftrightarrow O_2 + H_2O_2$
Peróxido de hidrógeno (H_2O_2)	Hipoxantina + $H_2O + O_2 \leftrightarrow$ xantina + H_2O_2 Xantina + $H_2O + O_2 \leftrightarrow$ Ác. úrico + H_2O_2
Radical hidroxilo (OH^\bullet)	$Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH^- + OH^\bullet$
Ácido hipocloroso ($HOCl$)	$H_2O_2 + Cl^- \rightarrow HOCl + H_2O$
Radicales proxilo (ROO^\bullet)	$R^\bullet + O_2 \rightarrow ROO^\bullet$
Radical hidroperoxilo (HOO^\bullet)	$O_2^- + H_2O \leftrightarrow HOO^\bullet + OH^-$

Como se puede observar, la presencia de los iones metálicos propios del medio intracelular (Fe, Cu, Zn, etc), también tienen una importante influencia en el equilibrio redox, al estar implicados en la formación de radicales tan abundantes como el hidroxilo. De esta forma, si se perturban las condiciones redox normales de la célula, se va a inducir un daño oxidativo en biomoléculas tales como el ADN, los lípidos o las proteínas. Sin embargo, las ROS no sólo pueden desencadenar procesos carcinogénicos por este mecanismo, sino también por modificaciones sobre la transducción de señales y los factores de transcripción. El mecanismo a seguir, va a depender de factores tales como el tipo de ROS involucrada y la intensidad del estrés.⁴⁸

En lo que se refiere al primero de los mecanismos, se ha observado como las ROS muestran reactividades variables hacia diferentes objetivos, pero comparten la capacidad de dañar las células al oxidar las proteínas, los lípidos o el ADN. Así, por alteraciones en el ADN, las ROS van a producir las consiguientes mutaciones, algunas de las cuales parecen implicar la modificación de la guanina, causando apareamientos transversales de $G \rightarrow T$ que van a afectar a genes supresores tumorales como el p53.⁴⁹⁻⁵⁰ Sin embargo, también se ha demostrado que las ROS tienen un fuerte impacto en varias vías de señalización por acción sobre proteínas de señalización, conformando la segunda de las vías posibles de acción de estas especies oxidantes.⁵¹

Se observa por lo tanto, que las ROS pueden actuar en varias de las fases que conforman el proceso multietapa de la carcinogénesis y, por ello, las ROS se consideran potenciales especies carcinógenas porque facilitan la mutagénesis, la promoción del tumor y la progresión del cáncer.⁵²

Con base en todo esto, se pone de manifiesto cómo mantener el equilibrio redox de la célula resulta fundamental para evitar daños en el ADN, así como en otras biomoléculas biológicamente relevantes como lípidos de membrana o proteínas. Para ello, existen en el organismo diferentes especies antioxidantes cuya función es contrarrestar los radicales libres y neutralizar los oxidantes.⁵³ El sistema antioxidante endógeno general consiste en antioxidantes enzimáticos como la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPx) o la familia de las tioredoxinas (Trx); estas últimas junto con la familia de proteínas glutarredoxina, juegan un papel importante en el mantenimiento de la homeostasis redox mediante el intercambio ditiol-disulfuro y sus proteínas diana.⁵⁴

Otro tipo de antioxidantes son los de tipo hidrófilo como urato, ascorbato, glutatión y flavonoides; donde destaca el glutatión por ser el antioxidante más abundante de la célula, con una concentración de 0.5-10 mM en las células tumorales.⁵⁵ Además, también se dan antioxidantes lipófilos como el tocoferol, carotenoide y ubiquinol. Estos dos grandes grupos, los antioxidantes hidro- y lipófilos, pueden agruparse en un solo: antioxidantes no enzimáticos. A modo de resumen, se recogen los antioxidantes más relevantes clasificados según esta última diferenciación, enzimáticos y no enzimáticos (Figura 1.8).

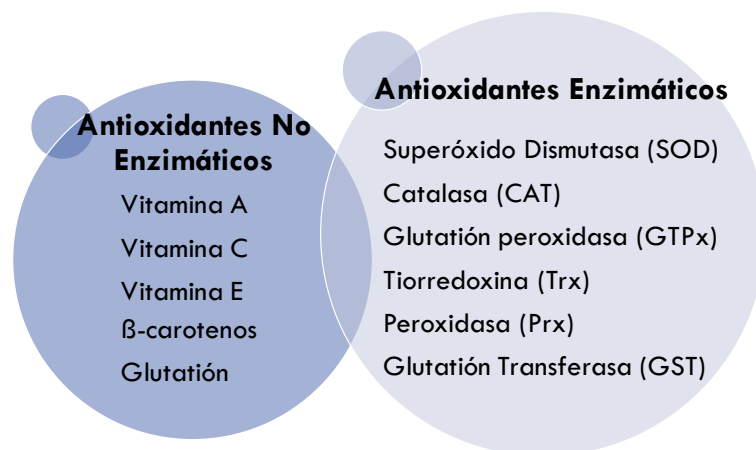


Figura 1.8. Clasificación de las especies antioxidantes más importantes.

Asimismo, los antioxidantes también pueden clasificarse según su fuente, incluida la síntesis endógena como enzimas y moléculas pequeñas, así como dietas exógenas como fenólicos, flavonoides, ácidos fenólicos, carotenoides, vitaminas y minerales.⁵⁶

TIORREDOXINA REDUCTASA (TrxR)

Como se ha comentado anteriormente, en el organismo hay una gran variedad de antioxidantes cuya función es el mantenimiento de la homeostasis redox celular. Pero, además se ha observado como enzimas con unidades tiol como la tiorredoxina reductasa (TrxR), la glutatión reductasa (GR) o la cisteína proteasa son sobreexpresadas en las células tumorales, lo que va a permitir utilizarlas de dianas de fármacos basados en oro. Los grupos tiol de los residuos cisteína presentes en estas proteínas, son los que permiten esta función antioxidante, ya que van a poder realizar procesos de reducción u oxidación que modulan cascadas de transducción de señales específicas que, a su vez, regulan las proteínas secundarias.

El interés de estas enzimas en relación con la química del Au reside en la gran tendencia de este metal por los grupos tiol y selenotiol. Este hecho resulta muy ventajoso para uno de los objetivos del desarrollo de nuevos fármacos, vencer la resistencia observada a los derivados de Pt; puesto que mientras los derivados de Pt actúan mediante su unión al ADN para promover la apoptosis mediada por RMM, los complejos de Au potencian la muerte celular programa por una desestabilización del equilibrio redox.

Por ello, conocer el mecanismo de acción de la TrxR resulta indispensable para ver como los complejos de Au podrían alterarlo. El sistema TrxR actúa como dador de electrones a las peroxidasa dependientes de

tiol (peroxirredoxinas) para eliminar las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno con una velocidad de reacción rápida. Tal y como se puede observar en la Figura 1.9, en la forma inactiva y oxidada de TrxR, los restos tiol reaccionan para formar la especie disulfuro; esta especie evoluciona a la forma activa y reducida de TrxR al recibir electrones de NADPH en presencia de la enzima TrxR.⁵⁷ La TrxR reducida puede transferir equivalentes reductores a muchos sustratos, transformando así las proteínas con enlaces disulfuro de nuevo a su forma tiol original.

Debido a la mayor proliferación celular y a la alta demanda metabólica de las células tumorales, la concentración de ROS es muy superior a la que se da en las células normales, aunque también es necesario el mantenimiento del equilibrio redox. Por ello, para contrarrestar este aumento del nivel de ROS, las células tumorales se ven obligadas a potenciar su sistema antioxidante por lo que proteínas como las mencionadas anteriormente van a verse sobreexpresadas. Por ello, la inactivación de proteínas antioxidantes constituye una nueva diana para la terapia contra el cáncer.⁵⁸

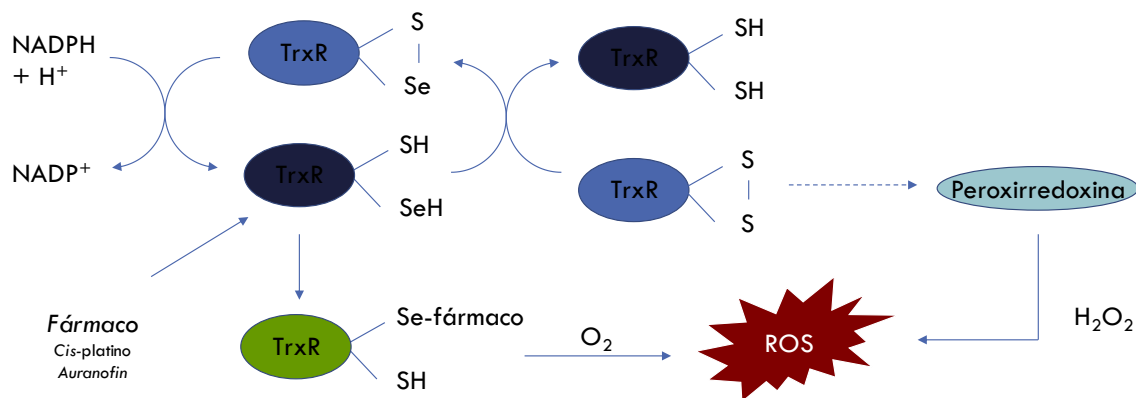


Figura 1.9. Consecuencias de la inhibición de la TrxR.

La inhibición de TrxR da como resultado niveles más altos de TrxR oxidado y una reducción de TrxR reducida. Por lo tanto, la TrxR no puede activar los sustratos enumerados, lo que resulta en la inhibición de las funciones celulares.

TRATAMIENTO DEL CÁNCER DE COLON

Conseguir entender y conocer el progreso del proceso tumoral es el primer paso para poder desarrollar fármacos más eficaces que los utilizados actualmente. Aunque aún quedan muchos eventos por explicar, conociendo que los genes antes mencionados juegan un papel muy importante en procesos oncogénicos y viendo las funciones de las que toman parte, se pretende diseñar complejos que actúen sobre ellos o/y sus funciones para frenar el desarrollo del cáncer de colon.

El cáncer de colon, así como muchos otros cánceres, continúa sin tener un fármaco capaz de combatirlo eficazmente, por lo que se recurre a la combinación de varios quimioterápicos, formando cócteles que resultan muy agresivos. Asimismo, cabe destacar que no se combate la formación del tumor, sino la proliferación de las células tumorales ya formadas.

Tal y como se puede observar en la Figura 1.10, una de las combinaciones más utilizadas para el tratamiento del cáncer de colon en los últimos años es el FOLFOX, un coctel compuesto de 5-Fluoracilo/Leucovorin y oxaliplatino. Éste es precisamente el único compuesto metálico que se sigue utilizando, y que conforma la segunda generación de fármacos basados en este metal, iniciada con el conocido *cis*-platino.

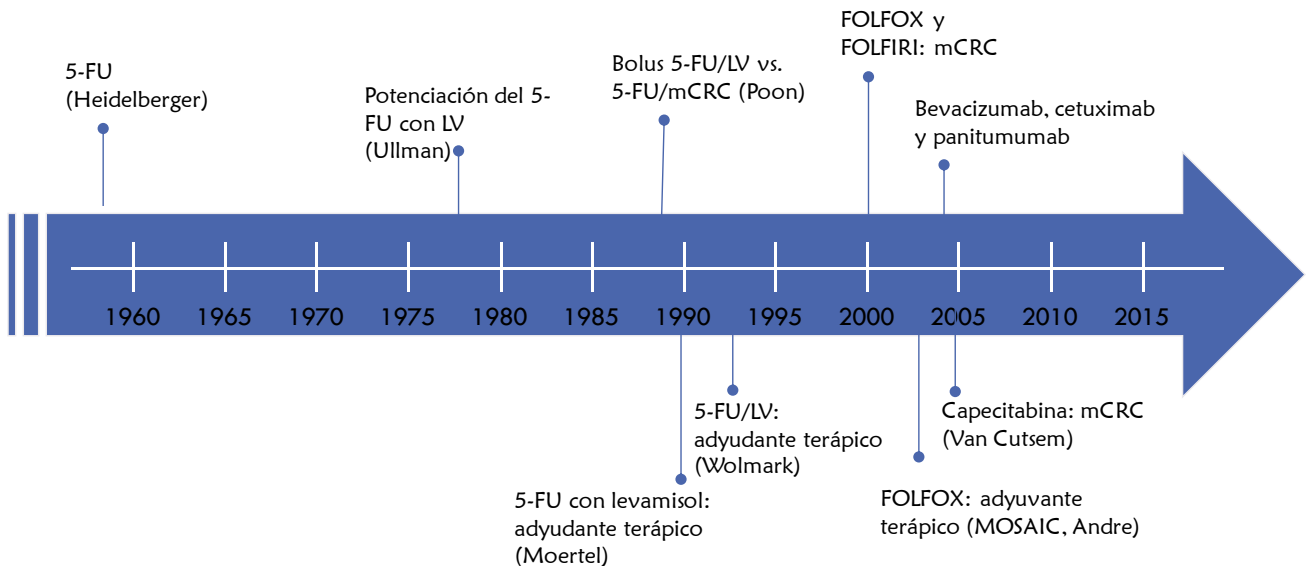


Figura 1.10. Evolución de la quimioterapia moderna.⁵⁹

El hecho de que actualmente sólo se utilice este derivado de Pt no se debe a problemas de efectividad, pues si bien es cierto que algunas líneas tumorales están desarrollando resistencia a este tipo de complejos, el principal inconveniente de este tipo de derivados, son sus graves efectos secundarios. El desarrollo de esta resistencia se atribuye a los siguientes factores:⁶⁰

- .. Reducción de la absorción del fármaco.⁶¹
- .. Una mejor eliminación de los mismos por tfoles.⁶²
- .. Aumento de la capacidad de la reparación del ADN.⁶³
- .. Alteraciones en la vía de señalización celular.⁶⁴

No obstante, el *cis*-Pt y el resto de análogos de Pt conforman un gran ejemplo de cómo una molécula muy pequeña es capaz de interferir en la replicación celular de forma efectiva. Todos ellos son considerados profármacos, es decir, que estas especies evolucionan a la especie realmente activa una vez dentro del organismo. En el caso del *cis*-Platino, evoluciona al correspondiente diaqua complejo, de forma mayoritaria. Estas moléculas de agua se comportan como vacantes coordinativas permitiendo que el platino se enlace a las bases de ADN. Por norma general, se suele enlazar a bases vecinas de una misma cadena, aunque también hay casos de enlace intercatenario. Si bien la unión al ADN es diferente, el resultado es el mismo: iniciación del mecanismo apoptótico (Figura 1.11).

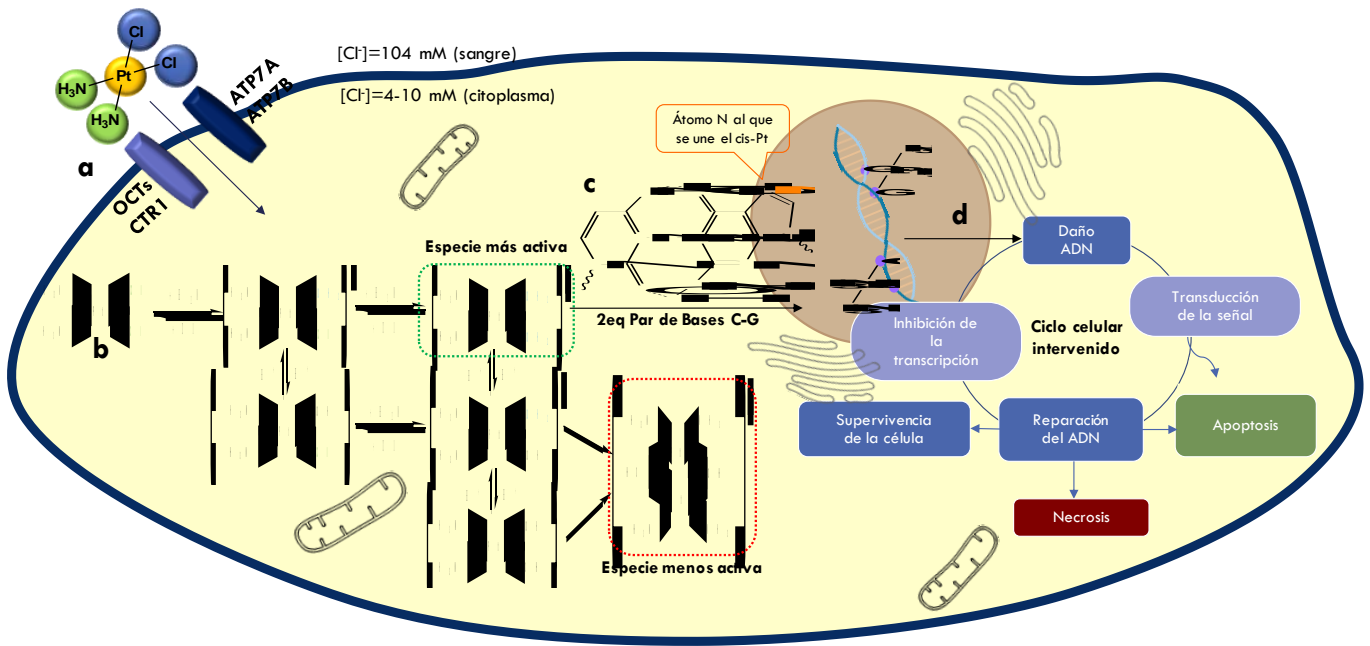


Figura 1.11. Mecanismo de acción del cisplatino.

Este mecanismo comprende (a) captación celular, (b) procesos de activación, (c) coordinación del Pt al ADN y (d) procesamiento celular que conduce a la apoptosis.

Con base en la gran eficacia de los complejos de Pt, la comunidad científica se ha lanzado a la búsqueda de fármacos más selectivos para conseguir minimizar los efectos secundarios que sufren los pacientes que reciben quimioterapia, y que, a su vez, consigan vencer esa resistencia incipiente que algunas líneas tumorales presentan a los derivados de Pt. Entre las diferentes líneas de investigación que se han abordado, se encuentra el desarrollo de nuevos complejos de coordinación u organometálicos. Así, se están sintetizando muchos complejos basados en otros metales diferentes al platino como rutenio, osmio, cobre, paladio y oro, entre otros.⁶⁵⁻⁶⁶ Sustituir el platino por otro metal pretende que el nuevo complejo provoque la muerte celular controlada (apoptosis) por mecanismos distintos a los que realiza en platino (distintas dianas), y así vencer la creciente resistencia a estos derivados.

DESARROLLO DE NUEVOS FÁRMACOS BASADOS EN ORO

El uso del oro en medicina se remonta a la Antigüedad, aunque fue en 1929 a raíz de que Forestier descubriera su aplicabilidad para la artritis reumatoide, cuando experimentó un mayor crecimiento.⁶⁷ A pesar de esto, la preparación de compuestos de oro con actividad citotóxica todavía se puede considerar una rama en crecimiento, y precisamente por tratarse de una vía joven, todavía hay muchas incógnitas. El principal interrogante sigue siendo el mecanismo de acción de este tipo de complejos. Sin embargo, estudios mecanísticos parecen apuntar a que el oro induce la apoptosis por alteración del equilibrio redox de la célula. La ruptura de la homeostasis redox se produce por la coordinación del complejo de Au a la tiorredoxina reductasa (TrxR), quedando esta selenoenzima inhibida por esta unión. Esta inhibición conlleva

a la alteración de las funciones mitocondriales y a un aumento del estrés oxidativo, causando finalmente la muerte celular vía apoptosis.⁶⁸⁻⁶⁹

El oro puede presentarse en un amplio rango de estados de oxidación, desde -1 hasta +5; sin embargo, sólo los estados de oxidación +3 y +1 parecen ser biológicamente relevantes.⁷⁰ Au(I) tiene una configuración electrónica d¹⁰ y genera compuestos con geometría lineal, mientras que Au(III) tiene una configuración electrónica d⁸ y, por lo tanto, es isoelectrónica con Pt(II). Además, también presenta un índice de coordinación 4 con geometría plano-cuadrada que hace que los complejos Au(III) sean candidatos interesantes para su evaluación como anticancerígenos. Cabe destacar que, debido al carácter reductor del medio intracelular, en condiciones fisiológicas la reducción de Au(III) a Au(I) es muy favorable, por lo que la elección de los ligandos es muy determinante para hacer estable a este estado de oxidación.⁷¹ De hecho, una importante cantidad de complejos de Au(III) son considerados profármacos. Que las especies activas contengan centros de Au(I) o Au(III) es determinante para su química, puesto que Au(I) tiene un carácter blando y por tanto tenderá a unirse a enzimas con grupos tiol; en lo que respecta al Au(III) manifiesta un carácter fuerte siendo más susceptible a coordinarse a átomos de nitrógeno, pudiendo interactuar con el ADN.⁷²

NUEVOS COMPLEJOS DE Au(I)

Contrariamente a lo que sucede con los derivados de Au(III), los complejos de Au(I) y su estudio como antitumorales es algo en lo que se lleva trabajando varias décadas. Además, el hecho de que los complejos de Au(I) estén aprobados para su uso como antiartrítico, supone una ventaja para las empresas farmacéuticas ya que, este tipo de derivados, ya han pasado las diferentes fases clínicas previas a la comercialización de un fármaco. En este campo, el ejemplo más notable es el auranofin (Figura 1.12), un agente antiartrítico administrado por vía oral, que a finales de la década de los 70, demostró ser capaz de inhibir la proliferación de células cancerosas, así como la síntesis de ADN, ARN y proteínas *in vitro*.⁷³

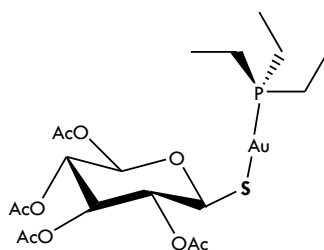


Figura 1.12. Estructura del auranofin.

El mecanismo de acción del auranofin se ha estudiado ampliamente, y contrariamente a lo que sucede con el *cis*-Pt, no actúa por interacción con el ADN. El auranofin se sabe que es un potente y selectivo inhibidor de las seleno-enzimas tiorredoxina reductasas (TrxR).⁷⁴⁻⁷⁵ El hecho de que este tipo de enzimas sea la diana principal del auranofin es algo prometedor en el campo de los antitumorales ya que, la TrxR se sobreexpresa en las células tumorales. La inhibición de los sistemas de tiorredoxina reductasa/tiorredoxina induce la permeabilización de la membrana mitocondrial permitiendo la liberación de citocromo c al citosol, lo que desencadena la apoptosis.⁷⁶ Además, se ha observado como la inhibición de la TrxR por el auranofin permite superar la resistencia creciente a los derivados de Pt(II) en una línea celular de cáncer de ovario *in vitro*.⁵⁸

Viendo los buenos resultados de este complejo, la química del Au(I) con residuos fosfano atrajo la atención de la comunidad científica. Este derivado no contiene enlaces Au-C como ocurría en los derivados de Au(III), ya que no se requiere de ese tipo de unión para conferirle estabilidad. Es más, se ha observado que numerosos compuestos con enlaces Au-P o Au-S tienen una elevada selectividad y citotoxicidad frente a diferentes líneas tumorales. Así pues, este complejo supuso un comienzo del auge de la química de Au(I) con ligandos fosfanos. Ott *et al.* en 2009, con la misma subunidad Au-PR₃ pero usando N-(N',N'-dimetilaminoetil)1,8-naftalimida como ligando, describió un complejo que actuaba como intercalante de ADN.⁷⁷⁻⁷⁸ Asimismo, en nuestro grupo de investigación se ha trabajado exhaustivamente con diferentes ligandos fosfano en unión con Au(I) para el desarrollo de nuevos fármacos.⁷⁹⁻⁸⁵

El uso de fosfanos no es trivial, ya que van a constituir la parte hidrófila del complejo permitiendo optimizar el equilibrio entre la lipo e hidrosolubilidad de nuestros complejos. Entre los fosfanos más utilizados en nuestro grupo destacan la PTA (1,3,5-triaza-7-fosfaadamantano) y HMPT (trisdimetilamino fosfano). Ambos fosfanos fueron seleccionados por su elevada solubilidad en agua: 235 y 1000 g/l respectivamente, así como por su baja demanda estérica (Figura 1.13).

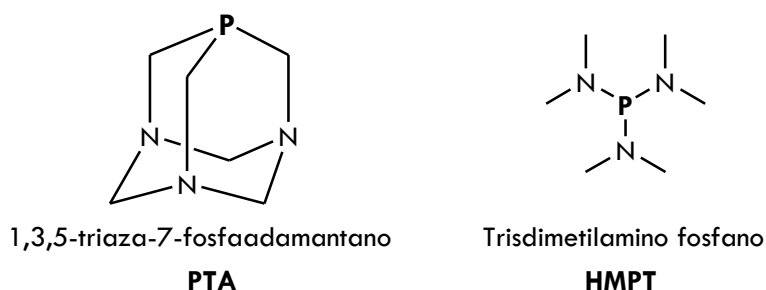


Figura 1.13. Estructura de los fosfanos PTA y HMPT.

Con estos fosfanos se han desarrollado numerosos complejos de Au(I) con distintos residuos acetileno y tioles. Estos complejos han sido estudiados frente a distintas líneas tumorales y, se ha observado que, presentan una mejor actividad citotóxica que el *cis*-Pt, e incluso que el auranofin en algunos casos.^{79, 85}

A pesar de lo extendida y establecida que es la química de Au(I) con ligandos fosfanos, este estado de oxidación permite trabajar con otros ligandos con diferentes átomos dadores que no sea el fósforo. Así se encuentran una gran variedad de ejemplos de compuestos de Au(I) con ligandos alquinilo.

Sin embargo, la propiedad más estudiada de estos derivados es la luminiscencia, y otras propiedades, como las biológicas no se han estudiado tan exhaustivamente.⁸⁶⁻⁸⁷ En nuestro grupo de investigación, cabe destacar que se han preparado derivados alquinilo con Au(I) que contienen el fosfano PTA y el 3,7-diacetil-1,3,7-triaza-5-fosfabiciclo [3.3.1] nonano (DAPTA), con efecto citotóxico en células tumorales (Figura 1.14). Asimismo, y aprovechando la luminiscencia intrínseca de estos complejos, se confirmó su captación mediante microscopía de fluorescencia.⁸⁴

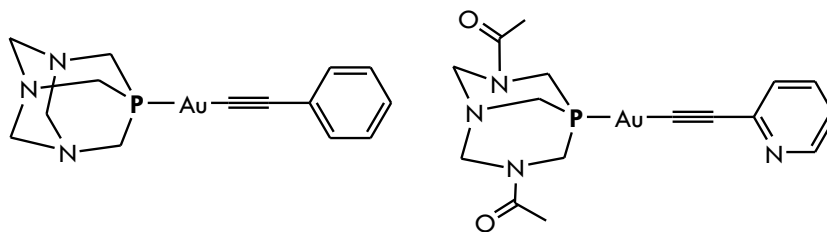


Figura 1.14. Ejemplo de estructuras de complejos de Au(I) con residuos alquinilo.

En los últimos años, la química de carbenos N-heterocíclicos se ha desarrollado y ha experimentado un gran auge, aplicándose también a la obtención de compuestos organometálicos de Au(I). Por ejemplo, en 2006, Berners-Price *et al.* sintetizaron diferentes complejos biscarbena mononucleares de Au(I) como posibles agentes quimioterapéuticos.⁸⁸⁻⁸⁹ En estas estructuras, se han modificado los grupos unidos a los N del heterociclo para ajustar el carácter lipofílico de los complejos, un factor crítico para dirigirse a las células malignas. Estos derivados organometálicos de oro muestran fuertes efectos antimitocondriales, que pueden atribuirse tanto a su carácter catiónico como lipófilo. Más recientemente, también se ha descrito un complejo biscarbena de Au(I) que disminuye el tamaño del tumor en ratones con melanoma sin pérdida de peso durante el tratamiento.⁹⁰

La modificación de los grupos presentes en el heterociclo también juega un papel importante en las propiedades fotofísicas del complejo final, lo que como sucedía con los complejos con unidades alquinilo va a permitir el estudio de asimilación y distribución del complejo por microscopía de fluorescencia.⁹¹ Cabe mencionar que, en los casos estudiados de los aquí recogidos, el mecanismo de acción es por inhibición proteica de los sistemas Trxs.⁹²⁻⁹³

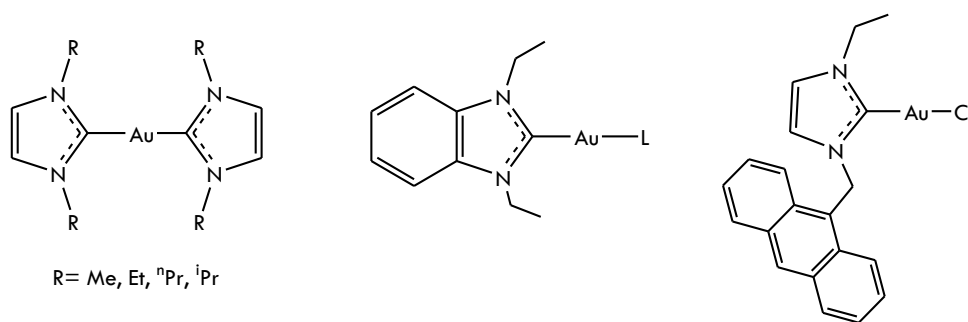


Figura 1.15. Ejemplo de especies Au(I)-carbena N-heterocíclico.

NUEVOS COMPLEJOS DE Au(III)

Como se ha comentado anteriormente, la idoneidad de los complejos de Au(III) para su uso como agente antitumoral reside en su carácter isoelectrónico e isoestructural con el Pt(II), de demostrada actividad citotóxica en una gran variedad de líneas tumorales. Sin embargo, la problemática de evolucionar a especies de Au(I) en el medio intracelular sigue siendo un obstáculo a salvar en la química de este estado

de oxidación. Esta inestabilidad se atribuye a la fácil sustitución de los átomos de cloro habituales en estos complejos, por moléculas de agua a pH superiores a 2.⁹⁴

Para desarrollar complejos de Au(III) estables, es común recurrir a ligandos N-dadores, especialmente a aquellos que puedan coordinarse en forma quelato para conferir mayor estabilidad. En esta línea se han desarrollado complejos con fenantrolina, terpiridina o macrociclos tal y como se recogen en la Figura 1.16.

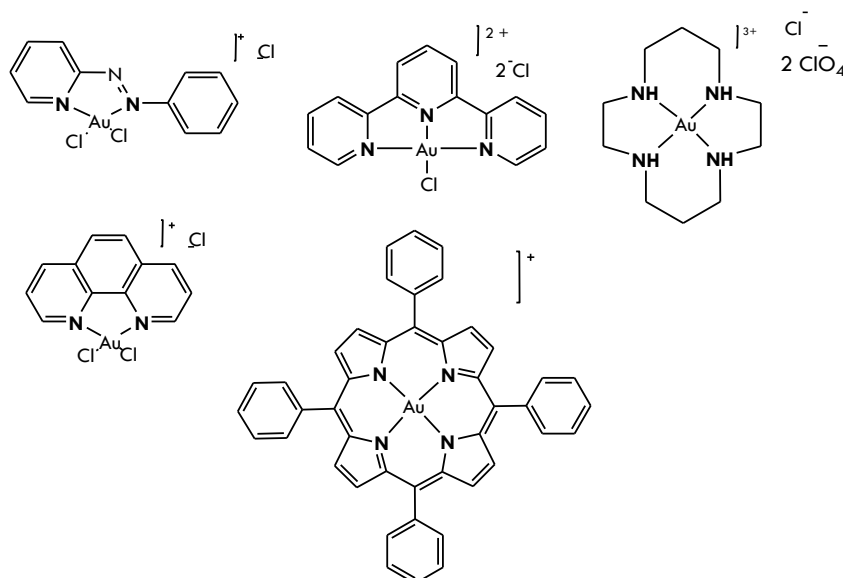


Figura 1.16. Estructuras de algunos complejos de Au(III) con ligandos N-dadores.

La estabilidad de estos complejos se determinó por voltamperometría cíclica y/o espectroscopia UV-vis en presencia de agentes reductores; y se observó como el complejo con poliamina es bastante estable frente a la reducción en medio acuoso.⁹⁵ Cabe mencionar, la síntesis de una familia de complejos de Au(III) con ligandos N-dadores especialmente estables a la reducción, complejos Au(III) basados en porfirinas.^{46, 96}

Debido a las similitudes entre Au(III) y Pt(II), el ADN se concibió como la posible diana implicada en el mecanismo de acción; y aunque se ha demostrado que los compuestos de Au(III) pueden interactuar con los ácidos nucleicos mediante la coordinación a sus átomos N-dadores,⁹⁷ la interacción estudiada con el ADN bovino parece ser débil y reversible, lo que no podría explicar las propiedades citotóxicas de esta clase de compuestos.⁹⁸ Estudios paralelos parecen apuntar a que la vía principal por la que muestran actividad citotóxica sobre células tumorales es la interacción con proteínas. De hecho, se ha demostrado que algunos complejos de Au(III) son potentes inhibidores de la TrxR, aunque en menor grado que el auranofin.⁹⁹ Por otro lado, estudios más recientes señalaron que el Au(III) es un inhibidor muy potente de la enzima poli (ADP-ribosa) polimerasa-1 (PARP-1) en comparación con otros fármacos basados en metales, como son el cisplatino, NAMI-A ([([ImH][trans-RuCl₄(dmsO-S)(Im)] Im = imidazol), o auranofin.¹⁰⁰

Aunque típicamente se ha relacionado el Au(III) con ligandos N-dadores, no son la única alternativa, ya que existen complejos basados en ligandos S-dadores como los sintetizados por Fregona *et al.* en 2005 con ditiocarbamatos. Estos complejos han resultado ser muy estables y activos frente a diversas líneas tumorales como la leucemia, adenocarcinoma de colon, cervical...¹⁰¹

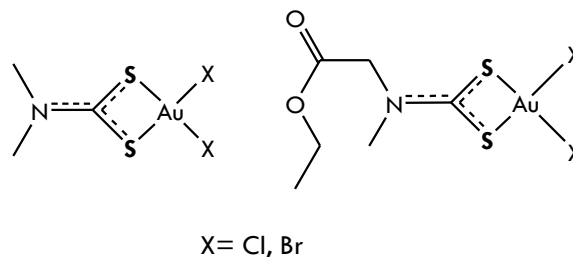


Figura 1.17. Estructura de complejos de Au(III) con ligando ditiocarbamatos.

Algo a destacar de estos complejos es que demostraron también una excelente toxicidad frente a líneas resistentes al *cis*-Pt, lo que confirma que el mecanismo de acción de estos complejos dista del *cis*-Pt.¹⁰¹ De hecho, se ha demostrado que los compuestos con unidades ditiocarbamato actúan a través de la inhibición del proteosoma tanto *in vitro* como *in vivo*.¹⁰²⁻¹⁰³

COMPLEJOS CICLOMETALADOS DE AU(III) CON LIGANDOS C,N-DADORES.

La reacción de ciclometalación es la activación de un enlace C-H, mediado por un metal de transición, de una amplia gama de moléculas orgánicas que llevan átomos dadores (D) como N, O, P, S y Se. Esta reacción supone la formación de un ciclo compuesto por un enlace de coordinación D-M y un enlace covalente M-C, conocido como metalacilo. La existencia de ese nuevo enlace C-Au dota a este tipo de complejos de mayor estabilidad redox y termodinámica, que complejos únicamente con N-dadores.

Por otro lado, este tipo de complejos son muy versátiles ya que, se pueden modular fácilmente sus propiedades estéricas y electrónicas mediante la modificación de los ligandos aniónicos. Este hecho resulta especialmente importante en el campo del desarrollo de nuevos fármacos, pues es vital que dicho compuesto tenga unas características adecuadas para su metabolismo, como por ejemplo un carácter lipofílico mejorado.

El descubrimiento de las propiedades antitumorales de este tipo de complejos experimentó un nuevo auge cuando Parish y colaboradores investigaron sobre complejos $[Au(damp)Cl_2]$ ($damp = 2-[(dimetilamino)metil]fenil$).¹⁰⁴⁻¹⁰⁵ Estos complejos mostraban un gran potencial por su elevada citotoxicidad frente a numerosas líneas tumorales, alcanzando al *cis*-Pt. Además de su buena actividad citotóxica, también mostraban buena selectividad. Con estos prometedores resultados, este campo comenzó a extenderse y así, en 2003, Che *et al.* trabajaron con un ligando quelato C^NC como es la 2,6-difenilpiridina (Figura 1.18a) que resolvía el problema de la falta de inestabilidad de los derivados de Au(III). Este tipo de complejos ciclometalados supuso un gran interés por su elevada citotoxicidad frente a distintas líneas tumorales. Asimismo, complejos como los sintetizados por Messori (Figura 1.18b) utilizando 2-(2-fenilprona-2-il)piridina mostraron además, una inactivación selectiva de la actividad de la TrxR.¹⁰⁶⁻¹⁰⁷

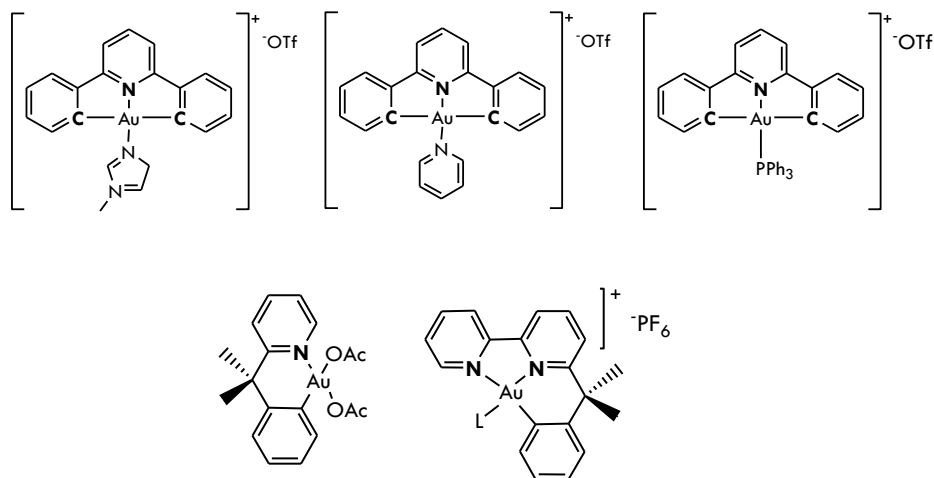


Figura 1.18. Estructuras de complejos de Au(III) con ligandos C^NC y C^N.

Los complejos recogidos en la Figura 1.18, presentan distinto número de enlaces C-Au, lo que se ha visto que modifica el carácter lipofílico del complejo; en general, un mayor número de enlaces C-Au dota de mayor lipofilidad al complejo, lo que facilita su captación intracelular. Sin embargo, también reduce la tendencia de estos complejos a interactuar con grupos tiol o selenol presentes en las proteínas diana.

Así pues, propiedades tan importantes para el desarrollo de un nuevo fármaco como la elevada estabilidad en condiciones fisiológicas, así como su versatilidad de diseño, han sido lo que ha potenciado la síntesis de nuevos complejos ciclotalados de Au(III) a lo largo de esta tesis doctoral.

BIBLIOGRAFÍA

1. Silverthorn, D. U., El aparato digestivo. In *Fisiología Humana, Un enfoque integrado*, 4th ed.; Panamericana, E. M., Ed. 2008; Vol. 1.
2. Bray, F.; Ferlay, J.; Soerjomataram, I.; Siegel, R. L.; Torre, L. A.; Jemal, A., Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA CANCER J CLIN* **2018**, *0*, 30.
3. Galceran, J.; Ameijid, A.; Carulla, A.; Mateos, J. R.; Quirós, D.; Alemán, A.; Rojas, A.; Torrella, M.; Chico, M.; Vicente, J. M.; Díaz, N.; Larrañaga, R.; Marcos-Gragera, M. J.; Sánchez, M. J.; Perucha, J.; Franch, P.; Navarro, C.; Ardanaz, E.; Bigorra, J.; Rodrigo, P.; Peris Bonet, R., Cancer incidence in Spain, 2015. *Clinical and Translational Oncology* **2017**, *19* (7), 26.
4. Potten, C. S.; Booth, C.; Pritchard, D. M., The intestinal epithelial stem cell: the mucosal governor. *Int J Exp Pathol* **1997**, *78* (4), 219-43.
5. Evan, G. I.; Vousden, K. H., Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature* **2001**, *411* (6835), 342-8.
6. Kaz, A. M.; Brentnall, T. A., Genetic testing for colon cancer. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* **2006**, *3* (12), 670-9.
7. Potter, J. D., Colorectal cancer: molecules and populations. *J Natl Cancer Inst* **1999**, *91* (11), 916-32.
8. Li, S. K. H.; Martin, A., Mismatch Repair and Colon Cancer: Mechanisms and Therapies Explored. *Trends Mol Med* **2016**, *22* (4), 274-289.
9. Boland, C. R.; Goel, A., Microsatellite instability in colorectal cancer. *Gastroenterology* **2010**, *138* (6), 2073-2087 e3.
10. Powell, S. M.; Zilz, N.; Beazer-Barclay, Y.; Bryan, T. M.; Hamilton, S. R.; Thibodeau, S. N.; Vogelstein, B.; Kinzler, K. W., APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis. *Nature* **1992**, *359* (6392), 235-7.
11. Carethers, J. M., The cellular and molecular pathogenesis of colorectal cancer. *Gastroenterol Clin North Am* **1996**, *25* (4), 737-54.
12. *ABC of colorectal CANcer*. . 2nd ed.; Wiley-Blackwell: 2011.
13. Gottlieb, T. M.; Oren, M., p53 in growth control and neoplasia. *Biochim Biophys Acta* **1996**, *1287* (2-3).
14. Hollstein, M.; Sidransky, D.; Vogelstein, B.; Harris, C. C., p53 mutations in human cancers. *Science* **1991**, *253* (5015), 49-53.
15. Brown, M. A., Tumor suppressor genes and human cancer. *Adv Genet* **1997**, *36*, 45-135.
16. Li, X. L.; Zhou, J.; Chen, Z. R.; Chng, W. J., P53 mutations in colorectal cancer - molecular pathogenesis and pharmacological reactivation. *World J Gastroenterol* **2015**, *21* (1), 84-93.
17. Hientz, K.; Mohr, A.; Bhakta-Guha, D.; Efferth, T., The role of p53 in cancer drug resistance and targeted chemotherapy. *Oncotarget* **2017**, *8* (5), 8921-8946.
18. Sherr, C. J., Cancer cell cycles. *Science* **1996**, *274* (5293), 1672-7.
19. Elledge, S. J., Cell cycle checkpoints: preventing an identity crisis. *Science* **1996**, *274* (5293), 1664-72.
20. Sherr, C. J., The Pezcoller lecture: cancer cell cycles revisited. *Cancer Res* **2000**, *60* (14), 3689-95.
21. Park, M. T.; Lee, S. J., Cell cycle and cancer. *J Biochem Mol Biol* **2003**, *36* (1), 60-5.
22. Siegel, R. M., Caspases at the crossroads of immune-cell life and death. *Nat Rev Immunol* **2006**, *6* (4), 308-17.
23. Rowinsky, E. K., Targeted induction of apoptosis in cancer management: the emerging role of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptor activating agents. *J Clin Oncol* **2005**, *23* (36), 9394-407.

24. Booy, E. P.; Kadkhoda, K.; Johar, D.; Bay, G. H.; Los, M., The immune system, involvement in neurodegenerative diseases, ageing and cancer. *Curr. Med. Chem-Anti-Inflamm. Anti-Allergy Agents* **2005**, *4*, 4.
25. Okada, H.; Mak, T. W., Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells. *Nat Rev Cancer* **2004**, *4* (8), 592-603.
26. Savill, J.; Fadok, V., Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature* **2000**, *407* (6805), 784-8.
27. Kurosaka, K.; Takahashi, M.; Watanabe, N.; Kobayashi, Y., Silent cleanup of very early apoptotic cells by macrophages. *J Immunol* **2003**, *171* (9), 4672-9.
28. Elmore, S., Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* **2007**, *35* (4), 495-516.
29. Harayama, T.; Riezman, H., Understanding the diversity of membrane lipid composition. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2018**, *19* (5), 281-296.
30. Marino, G.; Kroemer, G., Mechanisms of apoptotic phosphatidylserine exposure. *Cell Res* **2013**, *23* (11), 1247-8.
31. Fadok, V. A.; Voelker, D. R.; Campbell, P. A.; Cohen, J. J.; Bratton, D. L.; Henson, P. M., Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J Immunol* **1992**, *148* (7), 2207-16.
32. Mower, D. A., Jr.; Peckham, D. W.; Illera, V. A.; Fishbaugh, J. K.; Stunz, L. L.; Ashman, R. F., Decreased membrane phospholipid packing and decreased cell size precede DNA cleavage in mature mouse B cell apoptosis. *J Immunol* **1994**, *152* (10), 4832-42.
33. Desai, T. J.; Toombs, J. E.; Minna, J. D.; Brekken, R. A.; Udugamasooriya, D. G., Identification of lipid-phosphatidylserine (PS) as the target of unbiasedly selected cancer specific peptide-peptoid hybrid PPS1. *Oncotarget* **2016**, *7* (21), 30678-90.
34. Maddika, S.; Mendoza, F. J.; Hauff, K.; Zamzow, C. R.; Paranjothy, T.; Los, M., Cancer-selective therapy of the future: apoptin and its mechanism of action. *Cancer Biol Ther* **2006**, *5* (1), 10-9.
35. Shi, Y., Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. *Mol Cell* **2002**, *9* (3), 459-70.
36. Boatright, K. M.; Renatus, M.; Scott, F. L.; Sperandio, S.; Shin, H.; Pedersen, I. M.; Ricci, J. E.; Edris, W. A.; Sutherlin, D. P.; Green, D. R.; Salvesen, G. S., A unified model for apical caspase activation. *Mol Cell* **2003**, *11* (2), 529-41.
37. Adams, J. M., Ways of dying: multiple pathways to apoptosis. *Genes Dev* **2003**, *17* (20), 2481-95.
38. Li, P.; Nijhawan, D.; Budihardjo, I.; Srinivasula, S. M.; Ahmad, M.; Alnemri, E. S.; Wang, X., Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* **1997**, *91* (4), 479-89.
39. Rodriguez, J.; Lazebnik, Y., Caspase-9 and APAF-1 form an active holoenzyme. *Genes Dev* **1999**, *13* (24), 3179-84.
40. Zou, H.; Li, Y.; Liu, X.; Wang, X., An APAF-1-cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *J Biol Chem* **1999**, *274* (17), 11549-56.
41. Mcllwain, D. R.; Berger, T.; Mak, T. W., Caspase functions in cell death and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2013**, *5* (4), a008656.
42. Martinon, F.; Burns, K.; Tschopp, J., The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Mol Cell* **2002**, *10* (2), 417-26.
43. Ke, Y.; Tang, H.; Ye, C.; Lei, C. T.; Wang, Y. M.; Su, H.; Zhang, C.; Jiang, H. J., Role and Association of Inflammatory and Apoptotic Caspases in Renal Tubulointerstitial Fibrosis. *Kidney Blood Press Res* **2016**, *41* (5), 643-653.
44. Noda, N.; Wakasugi, H., Cancer and oxidative stress. *JMAJ* **2001**, *44* (12), 4.
45. Nguyen, P.; Awwad, R. T.; Smart, D. D.; Spitz, D. R.; Gius, D., Thioredoxin reductase as a novel molecular target for cancer therapy. *Cancer Lett* **2006**, *236* (2), 164-74.

46. Sun, H.; Liu, Y.; Bai, X.; Zhou, X.; Zhou, H.; Liu, S.; Yan, B., Induction of oxidative stress and sensitization of cancer cells to paclitaxel by gold nanoparticles with different charge densities and hydrophobicities. *J. Mater. Chem. B* **2018**, *6*, 6.
47. Birben, E.; Sahiner, U. M.; Sackesen, C.; Erzurum, S.; Kalayci, O., Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organ J* **2012**, *5* (1), 9-19.
48. Mates, J. M.; Perez-Gomez, C.; Nunez de Castro, I., Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin Biochem* **1999**, *32* (8), 595-603.
49. Higinbotham, K. G.; Rice, J. M.; Diwan, B. A.; Kasprzak, K. S.; Reed, C. D.; Perantoni, A. O., GGT to GTT transversions in codon 12 of the K-ras oncogene in rat renal sarcomas induced with nickel subsulfide or nickel subsulfide/iron are consistent with oxidative damage to DNA. *Cancer Res* **1992**, *52* (17), 4747-51.
50. Du, M. Q.; Carmichael, P. L.; Phillips, D. H., Induction of activating mutations in the human c-Ha-ras-1 proto-oncogene by oxygen free radicals. *Mol Carcinog* **1994**, *11* (3), 170-5.
51. Zhang, J.; Wang, X.; Vikash, V.; Ye, Q.; Wu, D.; Liu, Y.; Dong, W., ROS and ROS-Mediated Cellular Signaling. *Oxid Med Cell Longev* **2016**, *2016*, 4350965.
52. Moller, P.; Wallin, H., Adduct formation, mutagenesis and nucleotide excision repair of DNA damage produced by reactive oxygen species and lipid peroxidation product. *Mutat Res* **1998**, *410* (3), 271-90.
53. He, L.; He, T.; Farrar, S.; Ji, L.; Liu, T.; Ma, X., Antioxidants Maintain Cellular Redox Homeostasis by Elimination of Reactive Oxygen Species. *Cell Physiol Biochem* **2017**, *44* (2), 532-553.
54. Zhang, J.; Li, X.; Han, X.; Liu, R.; Fang, J., Targeting the Thioredoxin System for Cancer Therapy. *Trends Pharmacol Sci* **2017**, *38* (9), 794-808.
55. Zou, T.; Lum, C. T.; Lok, C. N.; Zhang, J. J.; Che, C. M., Chemical biology of anticancer gold(III) and gold(I) complexes. *Chem Soc Rev* **2015**, *44* (24), 8786-801.
56. Ratnam, D. V.; Ankola, D. D.; Bhardwaj, V.; Sahana, D. K.; Kumar, M. N., Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective. *J Control Release* **2006**, *113* (3), 189-207.
57. Koharyova, M.; Kollarova, M., Thioredoxin system - a novel therapeutic target. *Gen Physiol Biophys* **2015**, *34* (3), 221-33.
58. Polimeni, M.; Gazzano, E., Is redox signaling a feasible target for overcoming multidrug resistance in cancer chemotherapy? *Front Pharmacol*. **2014**, *5*.
59. Gustavsson, B.; Carlsson, G.; Machover, D.; Petrelli, N.; Roth, A.; Schmoll, H. J.; Tveit, K. M.; Gibson, F., A review of the evolution of systemic chemotherapy in the management of colorectal cancer. *Clin Colorectal Cancer* **2015**, *14* (1), 1-10.
60. Ma, P. a.; Xiao, H.; Li, C.; Dai, Y.; Cheng, Z.; Hou, Z.; Lin, J., Inorganic nanocarriers for platinum drug delivery. *Materials Today* **2015**, *18* (10), 554-564.
61. Hall, M. D.; Okabe, M.; Shen, D. W.; Liang, X. J.; Gottesman, M. M., The role of cellular accumulation in determining sensitivity to platinum-based chemotherapy. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **2008**, *48*, 495-535.
62. Knipp, M., Metallothioneins and platinum(II) anti-tumor compounds. *Curr Med Chem* **2009**, *16* (5), 522-37.
63. Martin, L. P.; Hamilton, T. C.; Schilder, R. J., Platinum resistance: the role of DNA repair pathways. *Clin Cancer Res* **2008**, *14* (5), 1291-5.
64. Benedetti, V.; Perego, P.; Luca Beretta, G.; Corna, E.; Tinelli, S.; Righetti, S. C.; Leone, R.; Apostoli, P.; Lanzi, C.; Zunino, F., Modulation of survival pathways in ovarian carcinoma cell lines resistant to platinum compounds. *Mol Cancer Ther* **2008**, *7* (3), 679-87.
65. Johnstone, T. C.; Suntharalingam, K.; Lippard, S. J., Third row transition metals for the treatment of cancer. *Philos Trans A Math Phys Eng Sci* **2015**, *373* (2037).
66. Warad, I.; Eftaiha, A. F.; Al-Nuri, M. A.; Husein, A. I.; Assal, M.; Abu-Obaid, A.; Al-Zaqri, N.; Ben Hadda, T. B.; Hammouti, B., Metal ions as Antitumor Complexes. *Journal of Materials and Environmental Science* **2013**, *4* (4).

67. Serebryanskaya, T. V.; Lyakhov, A. S.; Ivashkevich, L. S.; Schur, J.; Frias, C.; Prokop, A.; Ott, I., Gold(I) thiotetrazolates as thioredoxin reductase inhibitors and antiproliferative agents. *Dalton Trans* **2015**, 44 (3), 1161-9.
68. Bindoli, A.; Rigobello, M. P.; Scutari, G.; Gabbiani, C.; Casini, A.; Messori, L., Thioredoxin reductase: A target for gold compounds acting as potential anticancer drugs. *Coord. Chem. Rev.* **2009**, 253 (11-12), 15.
69. Gromer, S.; Arcsott, L. D.; Williams, C. H., Jr.; Schirmer, R. H.; Becker, K., Human placenta thioredoxin reductase. Isolation of the selenoenzyme, steady state kinetics, and inhibition by therapeutic gold compounds. *J Biol Chem* **1998**, 273 (32), 20096-101.
70. Sadler, P. J.; Sue, R. E., The chemistry of gold drugs. *Met Based Drugs* **1994**, 1 (2-3), 107-44.
71. Messori, L.; Marcon, G., Gold complexes as antitumor agents. *Met Ions Biol Syst* **2004**, 42, 385-424.
72. Gratteri, P.; Massai, L.; Michelucci, E.; Rigo, R.; Messori, L.; Cinellu, M. A.; Musetti, C.; Sissi, C.; Bazzicalupi, C., Interactions of selected gold(III) complexes with DNA G quadruplexes. *Dalton Trans* **2015**, 44 (8), 3633-9.
73. Simon, T. M.; Kunishima, D. H.; Vibert, G. J.; Lorber, A., Inhibitory effects of a new oral gold compound on HeLa cells. *Cancer* **1979**, 44 (6), 1965.
74. Fan, C.; Zheng, W.; Fu, X.; Li, X.; Wong, Y. S.; Chen, T., Enhancement of auranofin-induced lung cancer cell apoptosis by selenocystine, a natural inhibitor of TrxR1 in vitro and in vivo. *Cell Death Dis* **2014**, 5, e1191.
75. Ott, I., On the medicinal chemistry of gold complexes as anticancer drugs. *Coordination Chemistry Reviews* **2009**, 253 (11-12), 11.
76. Rigobello, M. P.; Scutari, G.; Boscolo, R.; Bindoli, A., Induction of mitochondrial permeability transition by auranofin, a gold(I)-phosphine derivative. *Br J Pharmacol* **2002**, 136 (8), 1162-8.
77. Ott, I.; Qian, X.; Xu, Y.; Vlecken, D. H.; Marques, I. J.; Kubutat, D.; Will, J.; Sheldrick, W. S.; Jesse, P.; Prokop, A.; Bagowski, C. P., A gold(I) phosphine complex containing a naphthalimide ligand functions as a TrxR inhibiting antiproliferative agent and angiogenesis inhibitor. *J Med Chem* **2009**, 52 (3), 763-70.
78. Bagowski, C. P.; You, Y.; Scheffler, H.; Vlecken, D. H.; Schmitz, D. J.; Ott, I., Naphthalimide gold(I) phosphine complexes as anticancer metallodrugs. *Dalton Trans* **2009**, (48), 10799-805.
79. Atrian-Blasco, E.; Gascon, S.; Rodri Guez-Yoldi, M. J.; Laguna, M.; Cerrada, E., Novel Gold(I) Thiolate Derivatives Synergistic with 5-Fluorouracil as Potential Selective Anticancer Agents in Colon Cancer. *Inorg Chem* **2017**, 56 (14), 8562-8579.
80. Garcia-Moreno, E.; Gascon, S.; Atrian-Blasco, E.; Rodriguez-Yoldi, M. J.; Cerrada, E.; Laguna, M., Gold(I) complexes with alkylated PTA (1,3,5-triaza-7-phosphaadamantane) phosphanes as anticancer metallodrugs. *Eur J Med Chem* **2014**, 79, 164-72.
81. Garcia-Moreno, E.; Gascon, S.; Garcia de Jalon, J. A.; Romanos, E.; Rodriguez-Yoldi, M. J.; Cerrada, E.; Laguna, M., In Vivo Anticancer Activity, Toxicology and Histopathological Studies of the Thiolate Gold(I) Complex [Au(Spyrimidine)(PTA-CH₂Ph)]Br. *Anticancer Agents Med Chem* **2015**, 15 (6), 773-82.
82. Garcia-Moreno, E.; Tomas, A.; Atrian-Blasco, E.; Gascon, S.; Romanos, E.; Rodriguez-Yoldi, M. J.; Cerrada, E.; Laguna, M., In vitro and in vivo evaluation of organometallic gold(I) derivatives as anticancer agents. *Dalton Trans* **2016**, 45 (6), 2462-75.
83. Vergara, E.; Casini, A.; Sorrentino, F.; Zava, O.; Cerrada, E.; Rigobello, M. P.; Bindoli, A.; Laguna, M.; Dyson, P. J., Anticancer therapeutics that target selenoenzymes: synthesis, characterization, in vitro cytotoxicity, and thioredoxin reductase inhibition of a series of gold(I) complexes containing hydrophilic phosphine ligands. *ChemMedChem* **2010**, 5 (1), 96-102.
84. Vergara, E.; Cerrada, E.; Casini, A.; Zava, O.; Laguna, M.; Dyson, P. J., Antiproliferative Activity of Gold(I) Alkyne Complexes Containing Water-Soluble Phosphane Ligands. *Organometallics* **2010**, 29 (11), 2596-2603.
85. Vergara, E.; Cerrada, E.; Clavel, C.; Casini, A.; Laguna, M., Thiolato gold(I) complexes containing water-soluble phosphane ligands: a characterization of their chemical and biological properties. *Dalton Trans* **2011**, 40 (41), 10927-35.

86. Schuh, E.; Valiahdi, S. M.; Jakupec, M. A.; Keppler, B. K.; Chiba, P.; Mohr, F., Synthesis and biological studies of some gold(I) complexes containing functionalised alkynes. *Dalton Trans* **2009**, (48), 10841-5.
87. Meyer, A.; Bagowski, C. P.; Kokoschka, M.; Stefanopoulou, M.; Alborzinia, H.; Can, S.; Vlecken, D. H.; Sheldrick, W. S.; Wolf, S.; Ott, I., On the biological properties of alkynyl phosphine gold(I) complexes. *Angew Chem Int Ed Engl* **2012**, 51 (35), 8895-9.
88. Baker, M. V.; Barnard, P. J.; Berners-Price, S. J.; Brayshaw, S. K.; Hickey, J. L.; Skelton, B. W.; White, A. H., Cationic, linear Au(I) N-heterocyclic carbene complexes: synthesis, structure and anti-mitochondrial activity. *Dalton T* **2006**, (30), 3708-3715.
89. Hickey, J. L.; Ruhayel, R. A.; Barnard, P. J.; Baker, M. V.; Berners-Price, S. J.; Filipovska, A., Mitochondria-targeted chemotherapeutics: The rational design of gold(I) N-heterocyclic carbene complexes that are selectively toxic to cancer cells and target protein selenols in preference to thiols. *J Am Chem Soc* **2008**, 130 (38), 12570-+.
90. Nandy, A.; Dey, S. K.; Das, S.; Munda, R. N.; Dinda, J.; Saha, K. D., Gold (I) N-heterocyclic carbene complex inhibits mouse melanoma growth by p53 upregulation. *Mol Cancer* **2014**, 13, 57.
91. Ibrahim, H.; Gibard, C.; Hesling, C.; Guillot, R.; Morel, L.; Gautier, A.; Cisnetti, F., 'Auto-click' functionalization for diversified copper(I) and gold(I) NHCs. *Dalton Trans* **2014**, 43 (19), 6981-9.
92. Citta, A.; Schuh, E.; Mohr, F.; Folda, A.; Massimino, M. L.; Bindoli, A.; Casini, A.; Rigobello, M. P., Fluorescent silver(I) and gold(I)-N-heterocyclic carbene complexes with cytotoxic properties: mechanistic insights. *Metallomics* **2013**, 5 (8), 1006-15.
93. Schuh, E.; Pfluger, C.; Citta, A.; Folda, A.; Rigobello, M. P.; Bindoli, A.; Casini, A.; Mohr, F., Gold(I) carbene complexes causing thioredoxin 1 and thioredoxin 2 oxidation as potential anticancer agents. *J Med Chem* **2012**, 55 (11), 5518-28.
94. Calamai, P.; Carotti, S.; Guerri, A.; Messori, L.; Mini, E.; Orioli, P.; Speroni, G. P., Biological properties of two gold(III) complexes: AuCl₃(Hpm) and AuCl₂(pm). *J Inorg Biochem* **1997**, 66 (2), 103-9.
95. Messori, L.; Abbate, F.; Marcon, G.; Orioli, P.; Fontani, M.; Mini, E.; Mazzei, T.; Carotti, S.; O'Connell, T.; Zanello, P., Gold(III) complexes as potential antitumor agents: solution chemistry and cytotoxic properties of some selected gold(III) compounds. *J Med Chem* **2000**, 43 (19), 3541-8.
96. Che, C. M.; Sun, R. W., Therapeutic applications of gold complexes: lipophilic gold(III) cations and gold(I) complexes for anti-cancer treatment. *Chem Commun (Camb)* **2011**, 47 (34), 9554-60.
97. Djekovic, A.; Petrovic, B.; Bugarcic, Z. D.; Puchta, R.; van Eldik, R., Kinetics and mechanism of the reactions of Au(III) complexes with some biologically relevant molecules. *Dalton Trans* **2012**, 41 (13), 3633-41.
98. Messori, L.; Orioli, P.; Tempi, C.; Marcon, G., Interactions of selected gold(III) complexes with calf thymus DNA. *Biochem Biophys Res Commun* **2001**, 281 (2), 352-60.
99. Rigobello, M. P.; Messori, L.; Marcon, G.; Agostina Cinellu, M.; Bragadin, M.; Folda, A.; Scutari, G.; Bindoli, A., Gold complexes inhibit mitochondrial thioredoxin reductase: consequences on mitochondrial functions. *J Inorg Biochem* **2004**, 98 (10), 1634-41.
100. Mendes, F.; Groessl, M.; Nazarov, A. A.; Tsybin, Y. O.; Sava, G.; Santos, I.; Dyson, P. J.; Casini, A., Metal-based inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase--the guardian angel of DNA. *J Med Chem* **2011**, 54 (7), 2196-206.
101. Ronconi, L.; Giovagnini, L.; Marzano, C.; Bettio, F.; Graziani, R.; Piloni, G.; Fregona, D., Gold dithiocarbamate derivatives as potential antineoplastic agents: design, spectroscopic properties, and in vitro antitumor activity. *Inorg Chem* **2005**, 44 (6), 1867-81.
102. Milacic, V.; Chen, D.; Ronconi, L.; Landis-Piwowar, K. R.; Fregona, D.; Dou, Q. P., A novel anticancer gold(III) dithiocarbamate compound inhibits the activity of a purified 20S proteasome and 26S proteasome in human breast cancer cell cultures and xenografts. *Cancer Res* **2006**, 66 (21), 10478-86.
103. Quero, J.; Cabello, S.; Fuertes, T.; Marmol, I.; Laplaza, R.; Polo, V.; Gimeno, M. C.; Rodriguez-Yoldi, M. J.; Cerrada, E., Proteasome versus Thioredoxin Reductase Competition as Possible Biological Targets in Antitumor Mixed Thiolate-Dithiocarbamate Gold(III) Complexes. *Inorg Chem* **2018**, 57 (17), 10832-10845.

104. Parish, R. V.; Howe, B. P.; Wright, J. P.; Mack, J.; Pritchard, R. G.; Buckley, R. G.; Elsome, A. M.; Fricker, S. P., Chemical and Biological Studies of Dichloro(2-((dimethylamino)methyl)phenyl)gold(III). *Inorg Chem* **1996**, *35* (6), 1659-1666.
105. Buckley, R. G.; Elsome, A. M.; Fricker, S. P.; Henderson, G. R.; Theobald, B. R.; Parish, R. V.; Howe, B. P.; Kelland, L. R., Antitumor properties of some 2-[(dimethylamino)methyl]phenylgold(III) complexes. *J Med Chem* **1996**, *39* (26), 5208-14.
106. Chiara Gabbiani, C.; Mastrobuoni, G.; Sorrentino, F.; Dani, B.; Rigobello, M. P.; Bindoli, A.; Cinellu, M. A.; Pieraccini, G.; Messori, L.; Casini, A., Thioredoxin reductase, an emerging target for anticancer metallodrugs. Enzyme inhibition by cytotoxic gold(III) compounds studied with combined mass spectrometry and biochemical assays. *Med. Chem. Commun* **2011**, *2*, 4.
107. Messori, L.; Marcon, G.; Cinellu, M. A.; Coronello, M.; Mini, E.; Gabbiani, C.; Orioli, P., Solution chemistry and cytotoxic properties of novel organogold(III) compounds. *Bioorg Med Chem* **2004**, *12* (23), 6039-43.

Capítulo II: Discusión de resultados

PARTE I: SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN

DISCUSIÓN DE RESULTADOS (I): SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN

La síntesis de nuevos complejos con aplicabilidad en medicina es una tarea que requiere de un diseño previo muy concreto ya que, estos nuevos compuestos, van a tener que cumplir una serie de propiedades y requisitos. Los parámetros a estudiar para que un complejo sea descartado o elegido como fármaco son su absorción, distribución, metabolismo, excreción y toxicidad; o lo que es lo mismo, sus características ADME-tox.¹ Quizás, el más complejo de elucidar sea el metabolismo, por la infinidad de procesos involucrados a los que va a estar sometido el fármaco. Sin embargo, el metabolismo de un fármaco no difiere en gran medida de la digestión diaria de alimentos; por lo que conocer el sistema digestivo humano, así como su funcionamiento resulta muy útil para este tipo de investigaciones.

El sistema digestivo, como se ha mencionada en el capítulo I, lleva a cabo una gran variedad de reacciones químicas distribuidas en etapas establecidas en distintos órganos. Cada órgano tiene su propio pH, que va a ser crítico para la desnaturalización o activación de las enzimas y coenzimas que llevan a cabo el proceso de transformación de los alimento, a moléculas que el organismo es capaz de asimilar. Estas condiciones van a ser las mismas a las que el fármaco va a estar expuesto: agitación mecánica a 37°C, mismo pH y mismas enzimas.

Conviene recordar que la mayoría de los medicamentos se administran en forma sólida por lo que el primer paso crítico va a ser su solubilidad. A continuación, la absorción del fármaco requiere que pueda atravesar la membrana lipídica celular, y así sucesivamente hasta que pueda realizar su acción.

Como se puede observar, el diseño de la estructura de un complejo con pretensión de fármaco, no es algo trivial. A lo largo de esta investigación se han sintetizado una serie de nuevos complejos de Au con ligandos específicamente seleccionados para mejorar propiedades tales como solubilidad, citotoxicidad, biocompatibilidad, etc.

Una de las herramientas que ha de demostrado ser muy útil para el diseño de nuevos fármacos es la conocida como Regla de Lipinski, capaz de evaluar cualitativamente la adecuación de un compuesto para ser administrado por vía oral, y llevar a cabo su función farmacológica. Se conoce con este nombre a las siguientes reglas que determinan la viabilidad de un compuesto para su utilización como fármaco:

- .. El compuesto no debe contener más de 5 átomos dadores de enlace de H (expresado como la suma de OHs y NHs).²
- .. Tampoco debe contener más de 10 átomos aceptores de enlaces de hidrógeno (la suma de Ns, Os y Flúor).
- .. Debe tener un peso molecular inferior a 500 g/mol.
- .. Y un coeficiente de reparto octanol-agua (logP) inferior a 5.

COMPLEJOS DE Au(III)

Como se ha comentado en la introducción, el metal escogido para la síntesis de nuevos complejos capaces de actuar como fármaco, es el oro. De entre los estados de oxidación con relevancia biológica Au(I) y Au(III), a continuación se recoge la preparación y caracterización de los complejos de Au(III) con ligandos N-dadores. Asimismo, y dado que el Au(III) suele ser fácilmente reducible a Au(I)/Au(0) en el medio fisiológico, el primer objetivo de este trabajo ha sido estabilizar el estado de oxidación III. Para ello se ha decidido trabajar con ligandos N-dadores capaces de generar, no sólo un enlace Au-N si no también un enlace Au-C. Es precisamente este enlace el que aumenta la resistencia de estos complejos a la reducción, debido a la coordinación tipo quelato.

Para la síntesis de los derivados ciclometalados de Au(III) que aquí se pretende, hay ya recogidos varios protocolos sintéticos:

- Por reacciones de transmetalación con derivados organometálicos, como organomercuriales o complejos organoestánnicos.³⁻⁴
- Por calentamiento del correspondiente precursor $[\text{AuCl}_3(\text{HL})]$.⁵⁻⁶
- Por reacciones de abstracción del átomo de Cl de los derivados $[\text{AuCl}_3(\text{HL})]$ con sales inorgánicas como NaBF_4 , KPF_6 , AgBF_4 ...⁶⁻⁷

La gran variedad de procedimientos válidos para la obtención de complejos cicloauratos refleja la falta de un método general que permita obtener el derivado ciclometalado sin importar el ligando HNC utilizado con buenos rendimientos. Así, este ha sido uno de los objetivos establecidos en esta investigación.

De entre los protocolos anteriormente mencionados, el uso de derivados organometálicos de mercurio y de estaño, fue rápidamente descartado como punto de partida por cuestiones medioambientales. Además, el uso de estos metales para obtener complejos cuya finalidad última es su aplicación en medicina, supone también una evidente problemática. Por otro lado, los otros dos métodos parecían sencillos y accesibles a nivel industrial, punto a tener en cuenta ya que el procedimiento sintético debe cumplir estas propiedades para que un posible fármaco sea viable.

De esta forma, se sintetizaron varios complejos de Au(III) de fórmula $[\text{AuCl}_3(\text{HL})]$ ya que se trata del producto de partida de ambos procedimientos.

Productos de partida: $[\text{AuCl}_3(\text{HL})]$ y $[\text{AuCl}_2\text{L}]$

SÍNTESIS DE LOS PRECURSORES $[\text{AuCl}_3(\text{HL})]$

La preparación de este tipo de derivados se puede realizar en diferentes disolventes, aunque la mezcla de disolventes más extendida es acetonitrilo/agua. Como fuente de Au(III) se puede utilizar $\text{Na/K}[\text{AuCl}_4]$ o HAuCl_4 ,^{6, 8} sin embargo, se ha observado que el uso de la sal sódica genera resultados más reproducibles que con el ácido, lo que se puede explicar por un exceso de HNO_3 en el ácido HAuCl_4 . Así, se ha seguido el esquema sintético que se muestra en la siguiente Figura:⁹⁻¹⁰

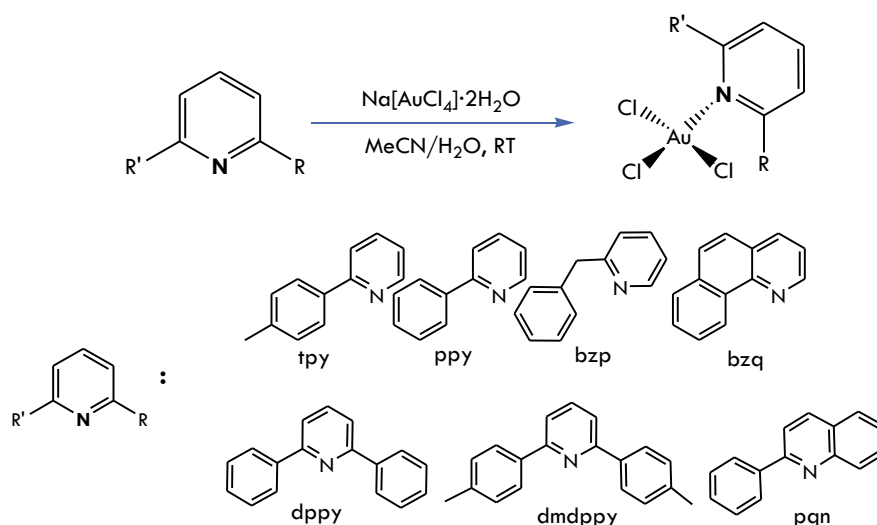


Figura 2.1.1. Esquema de reacción para los derivados $[\text{AuCl}_3\text{HL}]$.

La caracterización de estos complejos se ha realizado por las técnicas habituales siendo especialmente útil la espectroscopía infrarroja (IR) así como RMN. La primera de ellas permite conocer rápidamente la coordinación del ligando sobre el átomo de Au por la aparición de la banda Au-Cl.

Los complejos $[AuX_3HL]$ tienen varios modos de vibración activos en IR: $4a_1+3b_1+2b_2$, de los cuales 3 son debidos a los enlaces Au-X ($2a_1+b_1$), y se registran en el rango $\nu=356-366\text{ cm}^{-1}$, aproximadamente. Los modos de vibración a_1 se corresponden con $\nu_{(Au-X)}$ *trans* L y con $\nu_{(Au-X)}$ simétrica, y suelen ser bastante débiles. Sin embargo, la banda b_1 $\nu_{(Au-X)}$ asimétrica es la banda más significativa para este tipo de complejos por su elevada intensidad, siendo ésta la banda que actúa como frecuencia de grupo.¹¹

De esta forma, es coherente que en los derivados de Au(III) sintetizados, se observe una señal intensa en torno a 350 cm^{-1} con varios hombros, como en el caso de la Figura 2.2. Así esta señal es la correspondiente con el modo b_1 y los hombros las bandas de menor intensidad a_1 .

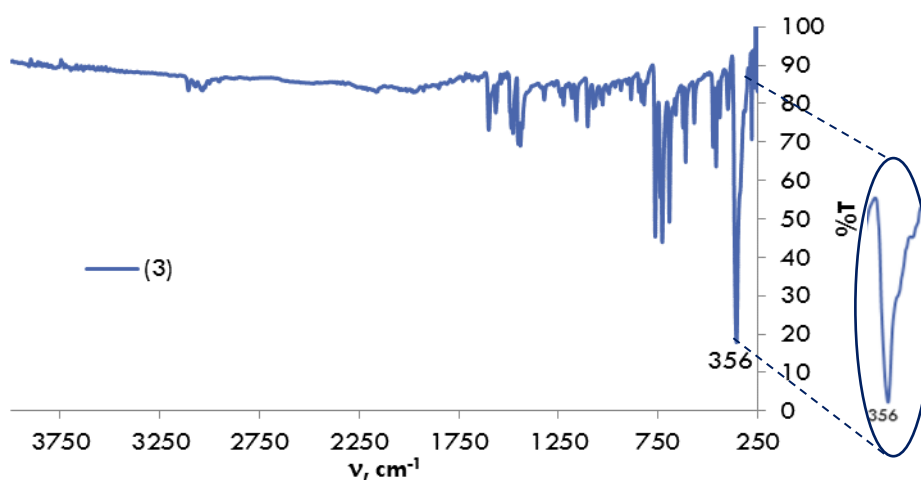


Figura 2.1.2. Espectro de IR del complejo $[AuCl_3(Hbzp)]$ (**P3**). Inset: ampliación de la banda a 356 cm^{-1} .

En lo que se refiere a RMN, la realización de experimentos ^1H -RMN confirma la coordinación al centro de Au por el cambio en el desplazamiento de las señales, especialmente notable en el caso del H adyacente al átomo de N-py (Figura 2.3).

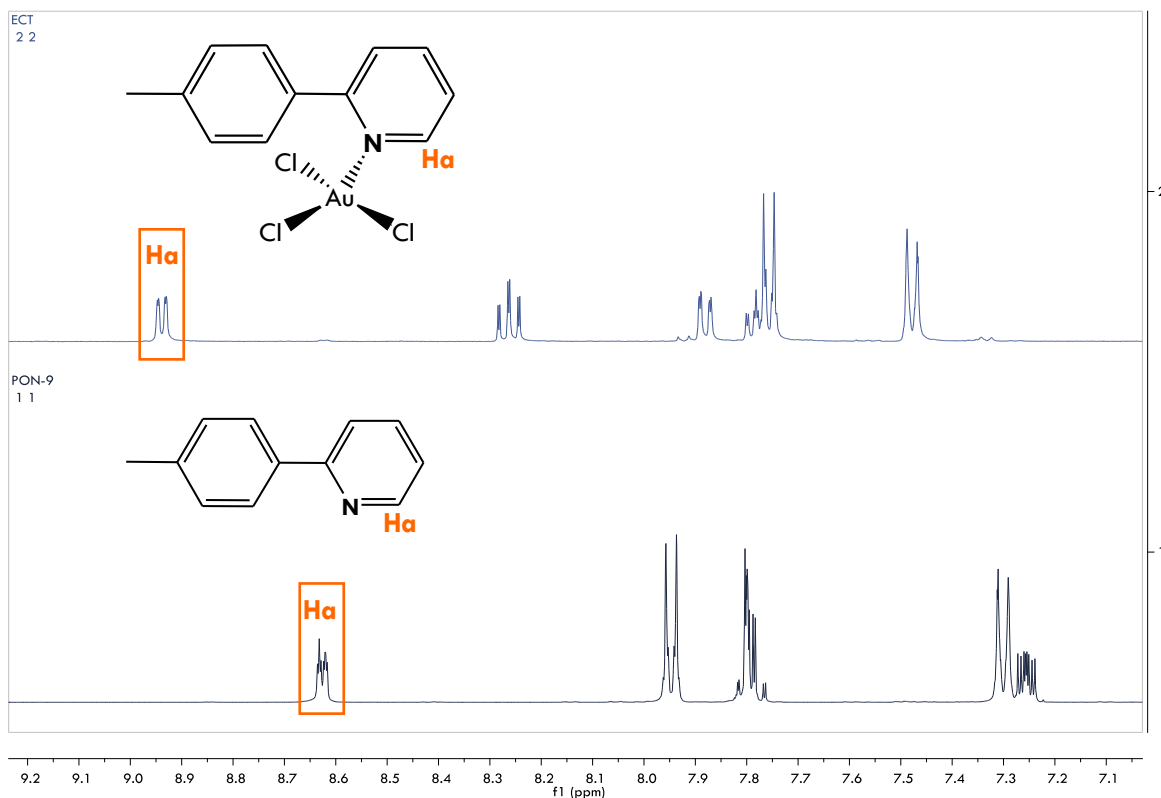


Figura 2.1.3. Espectro de ¹H-RMN del complejo [AuCl₃(Htpy)] (P1) (arriba) y Htpy (abajo).

Una vez caracterizados estos complejos se procedió a su utilización para la síntesis de sus correspondientes ciclometalados.

SÍNTESIS DE COMPLEJOS CICLOMETALADOS DE Au(III): [AuLCl₂]

Como se ha comentado anteriormente, la preparación de estos derivados se ha abordado desde varios procedimientos sintéticos, como son:

- Utilización de una base como captador de cloro: el uso de una base se contempló con una doble función, no sólo ayudar a captar un átomo de cloro para formar la sal correspondiente; si no también neutralizar el HCl que se forma durante la reacción. Entre las bases utilizadas destacan el NaOAc y AgBF₄.

La elección de utilizar NaOAc se justifica por su papel en la síntesis de ciclopaladatos. Ryabov *et al.* propusieron un mecanismo electrofílico para la ciclometalación del derivado de Pd con dimetil-bencil amina (DMBA-H).¹²⁻¹⁴ Este mecanismo implica la formación de un intermedio donde se da la transferencia de un protón al residuo acetato (Figura 2.4). De esta forma, el acetato desempeña dos funciones importantes, la activación electrofílica del areno, y la desprotonación del mismo.

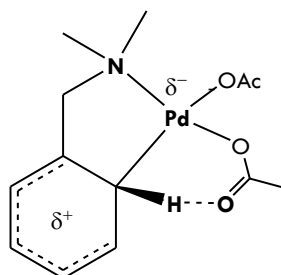


Figura 2.1.4. Estado de transición propuesto para la ciclometalación de $[Pd(OAc)_2(DMBA-H)]$.

- .. Reacciones a reflujo en mezcla de MeCN/H₂O: la relación de disolventes a utilizar, aunque se ha visto que resulta en muchos casos crítica,¹⁵ aún no está bien definida.
- .. Reacciones en estado sólido basadas en estudios de TGA: D.E. Janzen *et al.* han desarrollado un método válido para diferentes ligandos N-dadores aromáticos,¹⁶ en el que se consigue el derivado cicloaurato por calentamiento del precursor $[AuCl_3(HNC)]$. La temperatura a utilizar se determina previamente por estudios de TGA.

USO DE BASES PARA LA ABSTRACCIÓN DE CLORO

Para favorecer la reacción de ciclometalación se han utilizado diferentes bases capaces de captar uno de los átomos de Cl unidos al centro metálico, de esta forma el Au(III) dispone de una vacante coordinativa que, por proximidad y estabilidad, tenderá a ocupar mediante la formación de un enlace Au-C.

Las bases testadas, así como las diferentes condiciones utilizadas en la reacción de ciclometalación de $[AuCl_3(Htpy)]$ se recogen en la Tabla 2.1. Se puede observar como, salvo en el caso de la utilización de NaBF₄ (entradas 3 y 4), no se consiguió obtener el derivado ciclometalado.

Tabla 2.1.1. Resumen de las condiciones testadas para la ciclometalación $[AuCl_3(Htpy)]$.

	Base	Disolvente	Temperatura	Tiempo (h)	Resultado
1	NaOAc	MeCN/ H ₂ O	RT	6,5	No reacción
2	NaOAc	CH ₂ Cl ₂	RT	24	No reacción
3	NaBF ₄	H ₂ O	Reflujo	6,5	50% (+impurezas)
4	NaBF ₄	MeCN	Reflujo	5	30%
5	KPF ₆	MeCN/ H ₂ O	RT	96	No reacción
6	AgBF ₄	Acetona	RT	15	Descomposición
7	Tl(acac)	Acetonitrilo	RT	0.5	Descomposición
8	Tl(acac)	Acetonitrilo	RT (Atmósfera Ar)	3	Descomposición

El producto aislado de las reacciones 3 y 4, se caracterizó por ¹H-RMN, donde se pueden ver que además de la especie ciclometalada, se dan impurezas correspondientes con la especie precursora cuando se utilizó H₂O (Figura 2.5 centro). Sin embargo, viendo estos resultados se modificaron las condiciones de reacción a MeCN, dando como resultado una mejora en la pureza de la especie ciclometalada aunque todavía son apreciables resto de la especie tricloro (Figura 2.5 abajo)

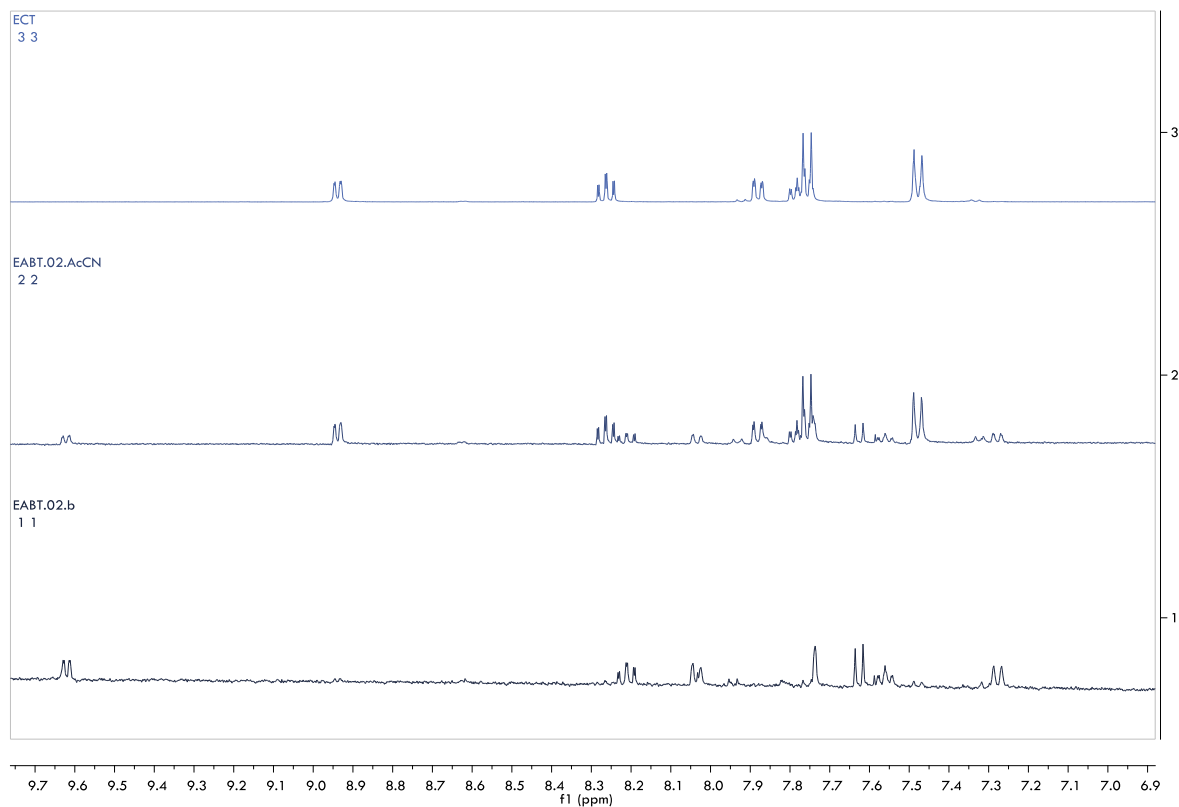


Figura 2.5. Espectro de ¹H-RMN de [AuCl₃(Htpy)] (**P1**) (arriba), producto de síntesis de la entrada 4 (centro) y el producto de la entrada 3 (abajo).

Viendo que esta estrategia sintética no conseguía mejorar los resultados publicados de rendimiento para la obtención de especies ciclometaladas a través del calentamiento a reflujo en MeCN/H₂O; se decidió abandonar esta vía en favor del segundo de los procedimientos arriba mencionados.

REACCIONES A REFLUJO EN MEZCLA DE MeCN/H₂O

La obtención de cicloauratos por calentamiento en disolución MeCN/H₂O ha sido descrita con anterioridad; sin embargo, todavía existe cierta controversia en la relación de disolventes a utilizar. Por ello, y en aras de obtener un procedimiento general se realizó un estudio con diferentes disolventes y estequiometrías.

Tabla 2.1.2. Condiciones ensayadas para la obtención de $[\text{AuCl}_2(\text{tpy})]$ (1).

	Disolvente	Tiempo (h)	Rto (%)
1	Acetona	3	0
2	CH_2Cl_2	48	0
3	H_2O	24	0
	Relación MeCN/ H_2O	Tiempo (h)	Rto (%)
4	1:1	6	85
5	1:2	6	4
6	1:4	6	5

Con base en los resultados recogidos en la Tabla 2.2, se observa que sólo utilizando la mezcla MeCN/ H_2O se consigue la especie ciclometalada. Además, viendo que utilizando únicamente agua no tiene lugar la reacción, parece que la presencia de acetonitrilo es imprescindible; este hecho se explica por la baja solubilidad de los complejos $[\text{AuCl}_3(\text{Htpy})]$ (P1) en agua, mientras que en acetonitrilo es excelente.

En algunos de los procedimientos descritos, se recoge que la relación de disolventes utilizada no parece influir en el rendimiento final;^{6, 17} sin embargo, esto contradice los resultados observados a lo largo de esta investigación. En la Tabla 2.3, se puede comprobar como un cambio en la estequiometría de los disolventes tiene importantes consecuencias sobre el rendimiento del producto final.

El rendimiento obtenido para la síntesis de $[\text{AuCl}_2(\text{tpy})]$ (1) es muy superior a los recogidos en la bibliografía,¹⁸ lo que hizo pensar que estas condiciones eran las adecuadas para establecer el método general que se busca con esta investigación. Sin embargo, cuando estas condiciones se aplicaron al complejo $[\text{AuCl}_3(\text{Hbzp})]$, los resultados no fueron tan positivos. Por ello, se realizó un nuevo estudio para la optimización de la relación de la mezcla de MeCN/ H_2O (Tabla 2.3).

Tabla 2.1.3. Estudio de la influencia de mezcla de disolvente sobre el rendimiento de $[\text{AuCl}_2(\text{bzp})]$ (3).

Reactivo	Relación MeCN/agua	Tiempo	Rendimiento
$[\text{AuCl}_2(\text{bzp})]$	1:1	6h	38
$[\text{AuCl}_2(\text{bzp})]$	1:2	6h	45
$[\text{AuCl}_2(\text{bzp})]$	1:4	6h	78

De esta forma, se concluyó que la estequiometría utilizada de MeCN/ H_2O es dependiente del ligando involucrado, haciendo que esta estrategia sintética tampoco alcance el objetivo propuesto.

REACCIONES EN ESTADO SÓLIDO BASADAS EN ESTUDIOS DE TGA

Este procedimiento establecido por D.E. Jansen *et al.* supone una revolución para la preparación de este tipo de derivados de Au(III). Este método se basa, como ya se ha anticipado, en estudios de TGA para determinar la temperatura necesaria para que se dé la eliminación de la molécula de HCl resultante en la ciclometalación. Los estudios de TGA llevados a cabo ponen de manifiesto la diferente energía necesaria para la activación del enlace C-H del anillo bencénico sobre el que tiene lugar la coordinación de Au, lo que encaja con las diferencias observadas en los estudios anteriores.

Así, para determinar las condiciones de temperatura necesarias para cada complejo $[AuCl_3(HL)]$, se ha registrado el correspondiente termograma para cada uno de los complejos sintetizados. Sin embargo, y a pesar de lo esperanzador del procedimiento, la mayoría de los complejos muestran una caída progresiva pero ininterrumpida consistente con la descomposición de los mismos; haciendo imposible el establecimiento de una temperatura.

A modo de ejemplo se recoge el termograma obtenido para el complejo $[AuCl_3(Htpy)]$ (**P1**), donde se puede establecer que la ciclometalación tiene lugar a una temperatura $T=175\text{ }^\circ\text{C}$, (Figura 2.6.). Sin embargo, esto no es posible con los complejos $[AuCl_3(HL)]$ con $HL= bzp, bzq, dppy, dmdppy$.

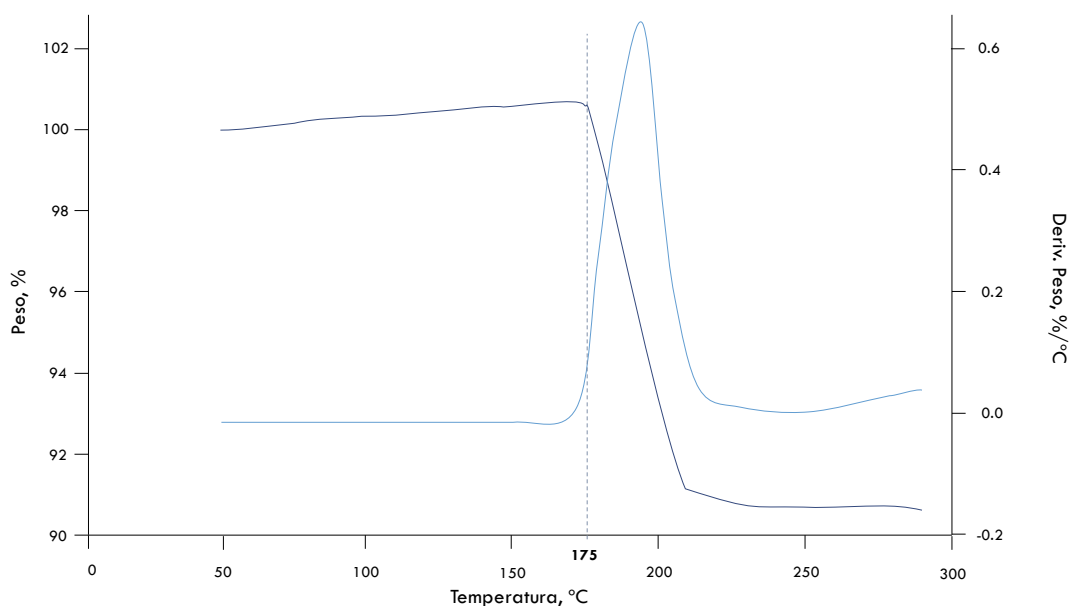


Figura 2.1.6. Espectro de TGA-DTA del complejo $[AuCl_3(Htpy)]$, **P1**.

En el espectro de TGA-DTA para $[AuCl_3(Hbzp)]$ (**P3**) se puede observar que la pérdida de peso del 7.7% correspondiente a la molécula de HCl que se forma como subproducto de la reacción de ciclometalación, se produce a una temperatura correspondiente con $162\text{ }^\circ\text{C}$ (Figura 2.7). Sin embargo, experimentalmente se ha comprobado que a esa temperatura no se produce la ciclometalación. Asimismo, se intentó con la misma temperatura que los análogos anteriores para determinar lo general de este método, y con temperaturas iguales o superiores $175\text{ }^\circ\text{C}$ se produce la descomposición total del complejo.

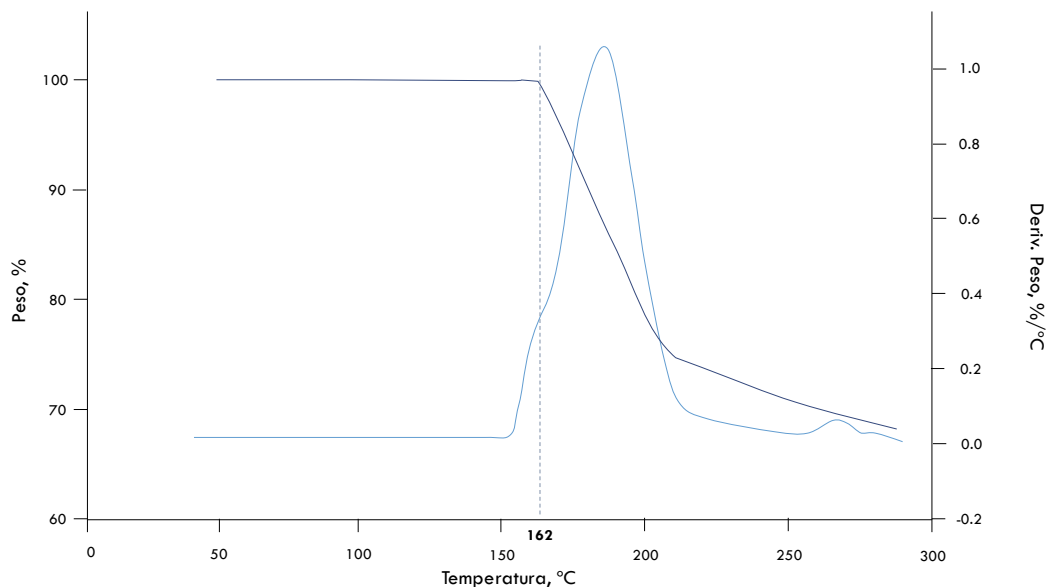


Figura 2.1.7. Espectro de TGA-DTA del complejo $[\text{AuCl}_3(\text{Hbzp})]$ (P3).

Debido a estos resultados, el complejo con L=2-bencilpiridina se ha sintetizado en disolución de MeCN/agua, según las condiciones descritas anteriormente; modificando el protocolo inicial descrito por E.C. Constable,¹⁸ donde se utiliza una relación 1:1. El cambio viene justificado por el mayor rendimiento obtenido, se ha conseguido duplicar el rendimiento final de la reacción.

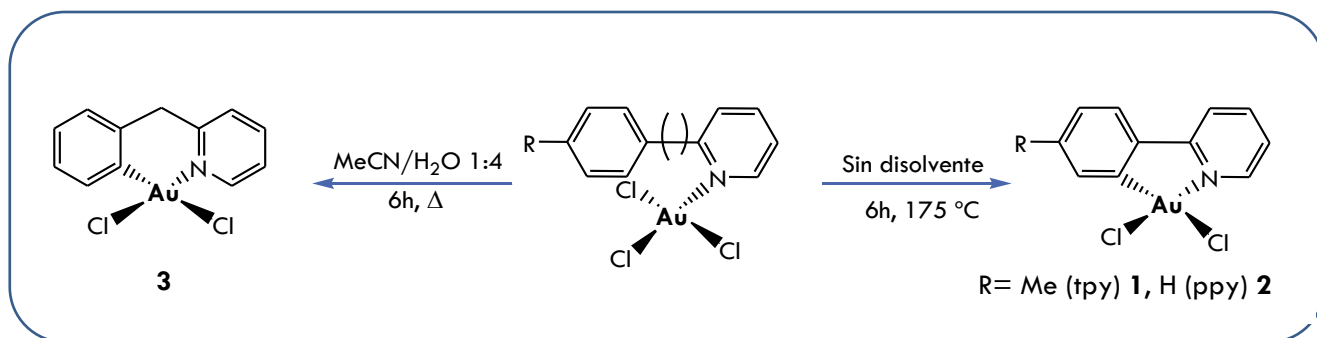


Figura 2.1.8. Esquema de los procedimientos sintéticos seguidos para la preparación de los productos de partida $[\text{AuCl}_2\text{L}]$.

Así, los complejos $[\text{AuCl}_2(\text{tpy})]$ (1), $[\text{AuCl}_2(\text{ppy})]$ (2) y $[\text{AuCl}_2(\text{bzp})]$ (3) son los tres productos de partida utilizados en esta investigación. El éxito de la reacción se ha comprobado mediante las técnicas habituales de análisis, aunque el color del complejo ya es indicativo; puesto que mientras los derivados $[\text{AuCl}_3(\text{HL})]$ son de colores amarillo intenso, al producirse la coordinación Au-C, el color se atenúa drásticamente hasta un color casi blanco.

La ciclometalación es también apreciable por ^1H -RMN, ya que el H adyacente al Npy experimenta un gran desplazamiento a campo bajo. Asimismo, se produce una pérdida en la simetría del anillo benzénico generando un mayor número de señales que las observadas en el complejo $[\text{AuCl}_3(\text{Htpy})]$, tal y como se puede observar en la Figura 2.9. Otro cambio notable resultado de la ciclometalación es el cambio en la multiplicidad del Hg, la que mientras en el complejo $[\text{AuCl}_3(\text{Htpy})]$ hay un sistema para que genera dos dobletes; en la especie ciclometalada, Hg es un singlete como consecuencia de la desaparición del H adyacente en el producto final.

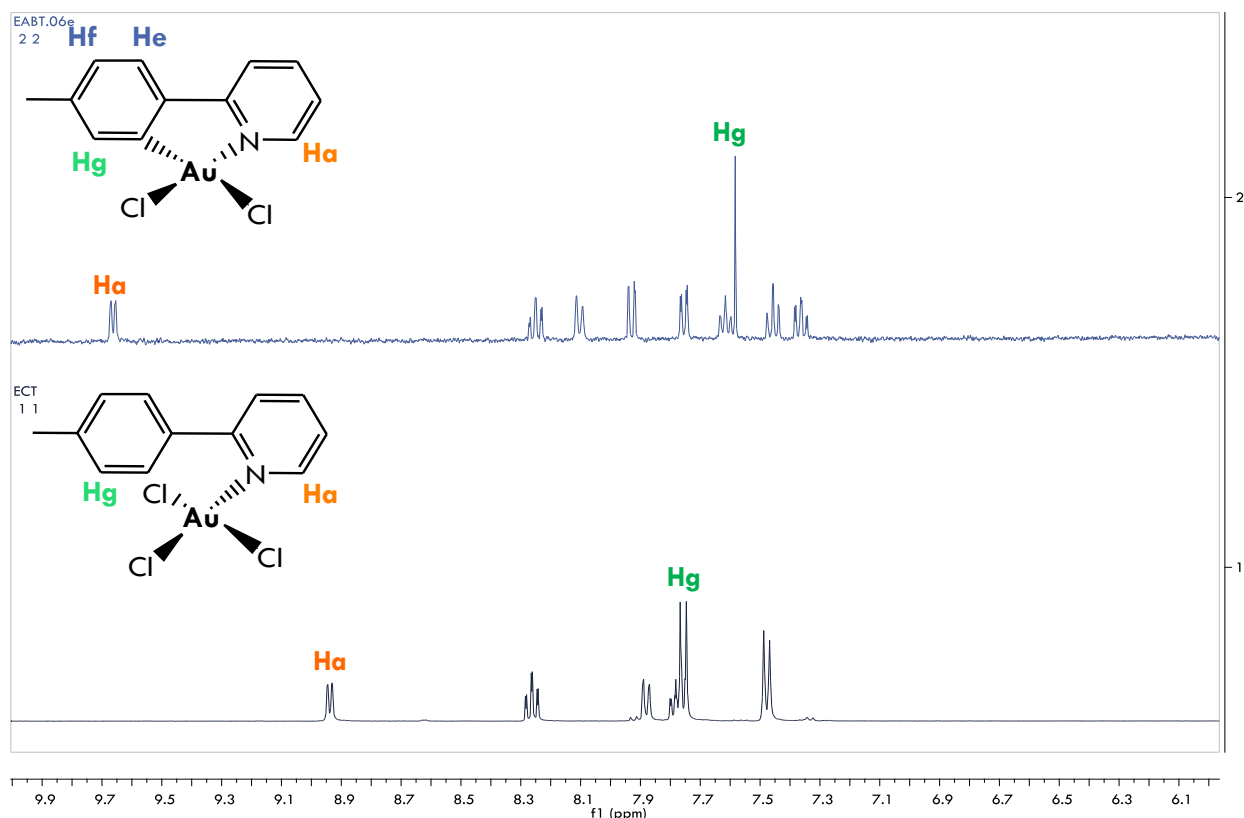


Figura 2.1.9. Zona aromática del espectro de ^1H -RMN de los complejos $[\text{AuCl}_2(\text{tpy})]$ **1** (arriba) y $[\text{AuCl}_3(\text{Htpy})]$ **P1** (abajo).

SÍNTESIS DE DERIVADOS CICLOMETALADOS DE Au(III)

Además de la estandarización de un método para la obtención de estos complejos, la sustitución de los átomos de cloro por otras unidades de diferente naturaleza va a ser uno de los objetivos sintéticos de este trabajo. Como ya se ha comentado al inicio de este capítulo, el producto final tiene que reunir una serie de propiedades que le permitan acceder al organismo, actuar y eliminarse sin producir efectos adversos en el cuerpo humano. De esta forma, los ligandos que se han utilizado para sustituir, de forma parcial o total, los átomos de Cl presentes en el complejo ciclometalado de Au(III), han sido cuidadosamente seleccionados

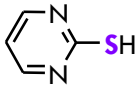
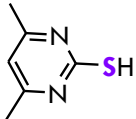
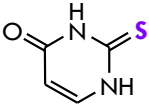
teniendo en cuenta los valores de cada factor de Lipinski, así como por los antecedentes recogidos en la literatura.

COMPLEJOS DE Au(III) CON DERIVADOS TIO-PIRIMIDÍNICOS

La síntesis de complejos de Au con unidades tiol es algo bastante explotado, especialmente en la química del Au(I) con aplicación en el campo de la bioquímica, ya que este tipo de compuestos han demostrado buenos valores de actividad antitumoral. De hecho, el compuesto de oro más utilizado como fármaco antitumoral, el auranofin, incluye una tioglucosa.

De entre los posibles ligandos tiol, se han seleccionado aquellos que han demostrado buena actividad citotóxica en complejos de Au(I) sintetizados en nuestro grupo de investigación. Asimismo, se ha realizado un estudio de los factores de Lipinski para cada uno de ellos, que también justifica su elección; puesto que sus pesos moleculares son pequeños ($P_m < 500$), $\text{Log } P_{7.4}$ próximos a la unidad ($\text{Log } P_{7.4} < 5$), y un número aceptable de H aceptores ($N^\circ \text{ Haceptores} < 10$).

Tabla 2.1.4. Valores de Lipinski para los diferentes derivados tiopirimidínicos seleccionados.

Compuesto	Log P	H Aceptores	H Dadores	Peso Molecular
 2-mercaptopyrimidina	0.98 ± 0.19	2	0	112.15
 (4,6-)dimetil-2-mercaptopyrimidina	1.57 ± 0.20	2	0	140.21
 2-tiouracilo	-0.28 ± 0.31	3	2	128.15

Además del factor de Lipinski, se ha tenido en cuenta otro criterio para la elección del residuo tiol: la posible biocompatibilidad del tiol por sí mismo. Este hecho es un factor a tener en consideración, ya que se han dado casos en los que derivados de Au(III) se reducen a Au(I) en el organismo liberando un ligando para realizar la actividad citotóxica. Por ello, que el ligando libre no suponga un riesgo para el organismo es también un factor a tener en cuenta para la elección del ligando entrante. Así, se ha trabajado con mercapto pirimidinas ya que en el organismo ya se dan este tipo de estructuras: la citosina, la timina (sólo en el ADN) y el uracilo (sólo en el ARN).

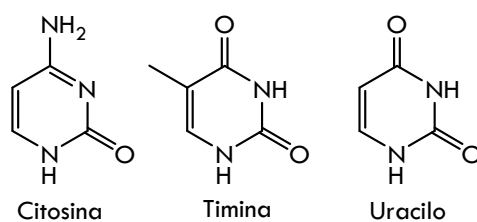


Figura 2.1.10. Bases pirimidínicas presentes en los ácidos nucleicos.

El procedimiento sintético para la obtención de los compuestos de Au(III) tanto con pirimidinas, como con el resto de residuos ensayados en esta tesis, se ha diseñado para que sea sencillo y económicamente viable para un posible escalado industrial. De esta forma, el esquema sintético para la obtención de los complejos de Au(III) con 2-mercapto pirimidina es el siguiente:

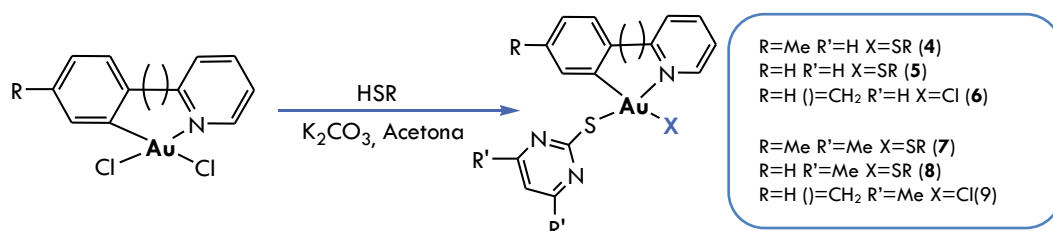


Figura 2.1.11. Esquema de reacción para la formación de los complejos [AuX(SR)L].

Todos los complejos que se recogen en este trabajo de investigación han sido caracterizados por las técnicas habituales de caracterización: IR, RMN, MS y análisis elemental. Sin embargo, conviene mencionar la gran información que aporta la espectroscopia infrarroja en lo que a la química de oro se refiere. La vibración correspondiente al enlace Au(III)-Cl aparece, aproximadamente a 350 cm^{-1} y con una transmitancia bastante intensa, haciendo esta señal fácilmente visible y reconocible; en el caso de compuesto con dos enlaces inequivalentes, se va a apreciar una segunda banda sobre 340 cm^{-1} (Figura 2.12). Puesto que la mayor parte de la química que se ha desarrollado es la sustitución de los átomos de Cl presentes en los productos de partida anteriormente descritos, la presencia o no de esta banda en el espectro de IR indica de forma inequívoca el éxito de la reacción. A continuación, se recogen los espectros de IR para los complejos **1**, **4** y **7**, para ejemplificar este asunto.

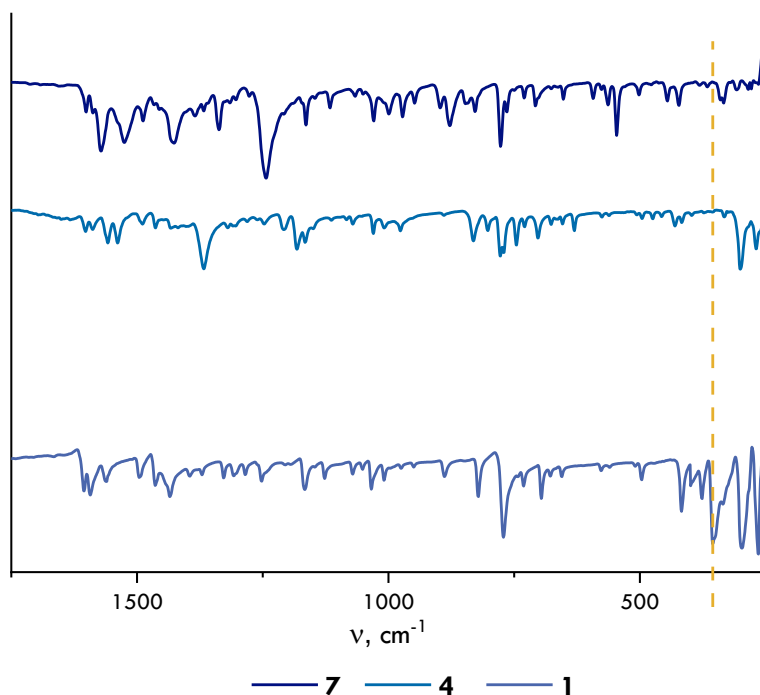


Figura 2.1.12. Zona de 1750-250 cm^{-1} del espectro de IR para los complejos **1**, **4** y **7**. Inset: Bandas correspondientes a los enlaces Au-Cl inequivalentes.

En la Figura 2.12 se puede observar como la banda del enlace Au-Cl presente en el producto de partida, no se encuentra en los espectros de IR correspondientes complejos **4** y **7**; lo que parece indicar que la sustitución de los átomos de cloro es total, dándose la introducción de dos ligandos pirimidínicos.

Por otro lado, el uso de RMN ha sido también determinante para poder establecer la introducción de una o dos unidades pirimidínicas. Así, en la figura 2.13, se recogen los espectros de ^1H -RMN en CDCl_3 de los complejos **1** y **4**:

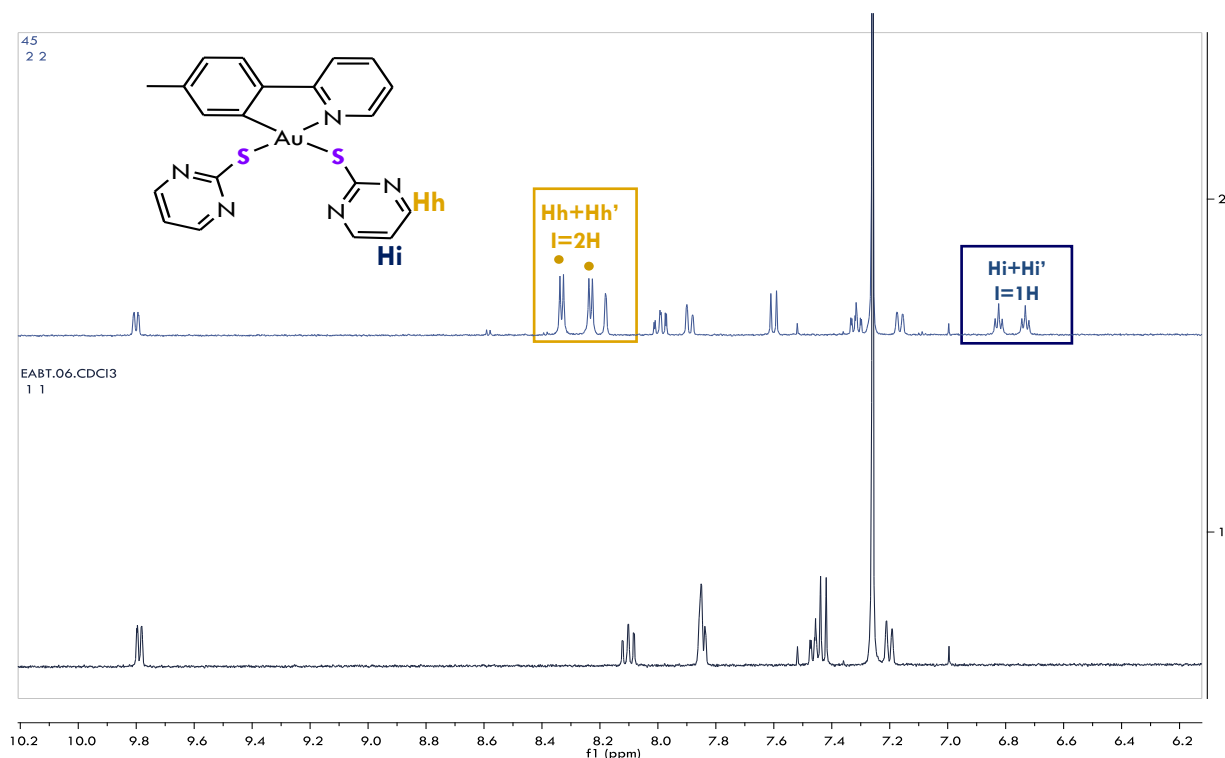


Figura 2.1.13. Espectro ^1H -RMN para el complejo **4** (arriba) y **1** (abajo).

Siguiendo con lo observado por IR, el espectro de ^1H -RMN apunta a la sustitución total de los átomos de Cl puesto que se dan dos dobletes y dos triplete correspondientes a los Hh y Hi. La existencia de dos señales Hh y dos triplete Hi se explica por su carácter inequivalente, ya que un sustituyente se encuentra en posición *trans* relativa al átomo de N del anillo piridínico del ligando tpy, mientras que otro grupo mercapto está *trans* a C-bencénico.

Sin embargo, cuando el complejo ciclometalado de partida es $[\text{AuCl}_2(\text{bzip})]$ (**3**), se ha encontrado que la entrada de dos unidades tiol está desfavorecida, al contrario de lo que se ha observado con los otros dos derivados ciclometalados. El efecto del ligando entrante no parece ser determinante ya que se ha encontrado que, tanto con 2-mercapto pirimidina como con 4,6-dimetil-2-mercapto pirimidina, sólo se produce la sustitución de uno de los átomos de Cl. Por ello, se cree que el cambio de reactividad reside en el tamaño del anillo ciclometalado formado, mientras que en el complejo $[\text{AuCl}_2(\text{bzip})]$ el ciclo formado es de seis miembros, en los análogos con $\text{L}=\text{tpy}$ o ppy , el anillo es de cinco miembros.

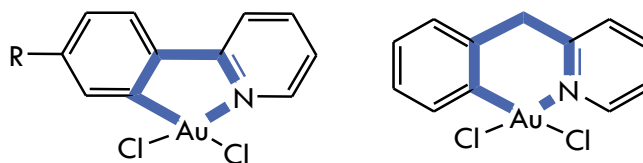


Figura 2.1.14. Estructura de los complejos ciclometalados, destacando el tamaño del anillo cicloaurato.

Los complejos ciclometalados presentan una fuerte tendencia a formar anillos de cinco miembros, ya que presentan una mayor estabilidad que los de cualquier otro tamaño.¹⁹ A pesar de que se espera una mayor estabilidad para los anillos de seis, se ha comprobado cómo, a medida que aumenta el tamaño del ciclo, el carbono que se une al metal se encuentra más lejos, lo que dificulta la interacción metal-C.

Asimismo, cabe mencionar que como resultado de su no planaridad, el ligando bzp tiene capacidad de σ -dador, pero menor carácter π -aceptor que el ligando ppy.²⁰ Por ello, el centro metálico con el anillo de seis miembros es más rico en electrones que cuando forma parte de un anillo de cinco miembros; lo que disminuye su reactividad de cara a la sustitución del átomo de cloro por el grupo tiol (π -dador por su par de electrones libres). De esta forma, sólo se produce la sustitución parcial con este tipo de ligandos.

La sustitución parcial en los complejos **6** y **9** se confirma de nuevo por ^1H -RMN; donde la señal del anillo pirimidínico (Hi), fácilmente reconocible por ser la única señal cuya multiplicidad es un singlete en el complejo **9**, sólo integra por 1H como puede observarse en la Figura 2.15.

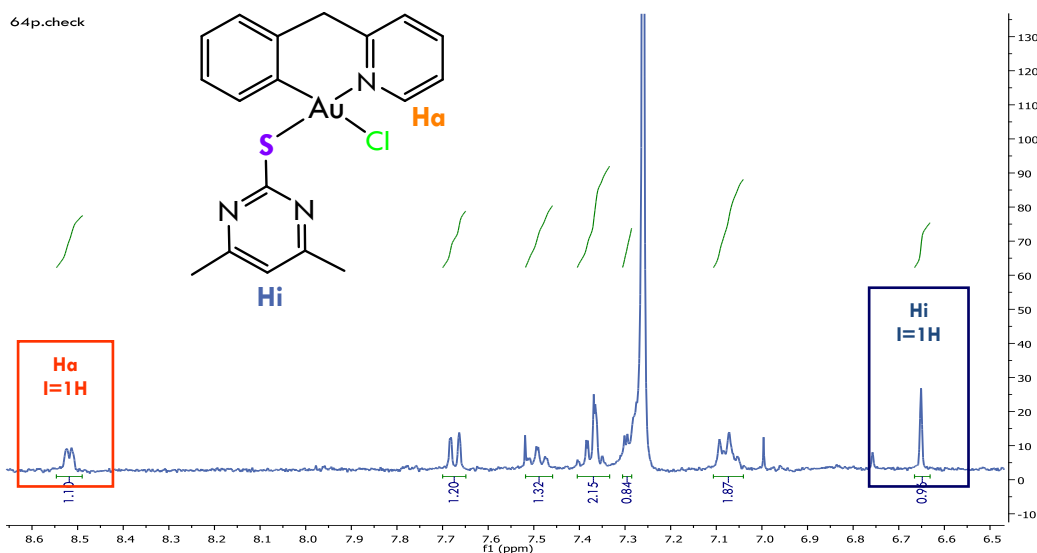


Figura 2.1.15. Espectro de ^1H -RMN del complejo $[\text{AuCl}(4,6\text{-Spym})\text{bpz}]$ (**9**).

La diferente sustitución de los átomos de cloro en los complejos, también se puede observar por espectrometría de masas, donde la presencia del pico $[\text{M}+\text{K}]^+$ confirma la sustitución total en los complejos **7** y **8** (Figura 2.16). Este pico también se puede observar en los complejos **4** y **5**, pero no en ninguno de los complejos con el ligando bzp. En estos casos, siempre se observa el pico $[\text{M}-\text{Cl}]^+$.

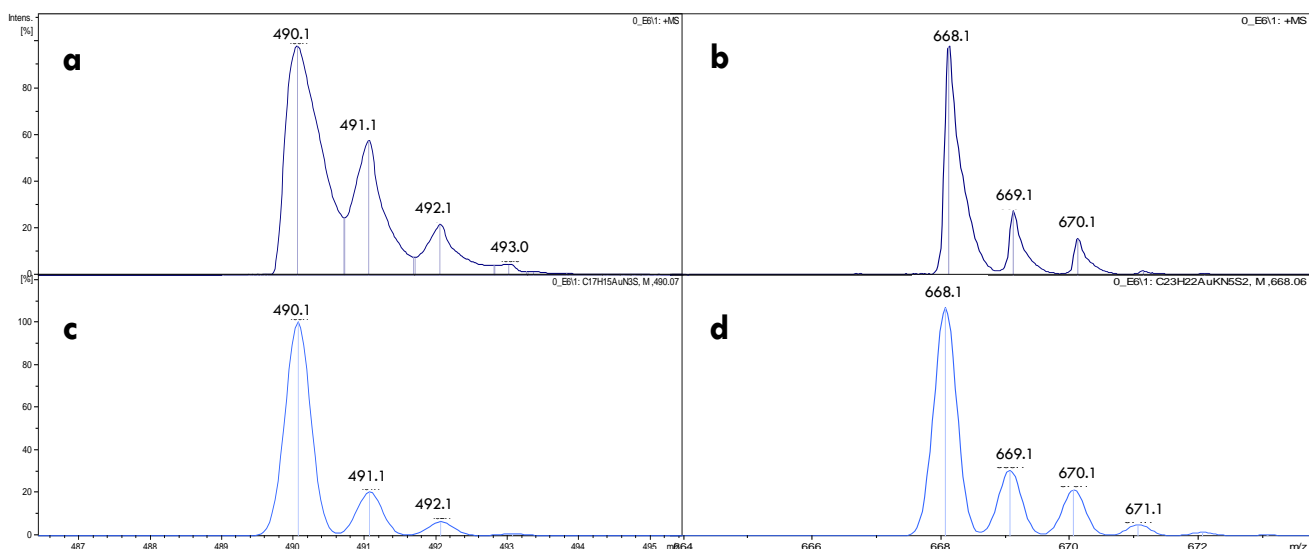


Figura 2.1.16. Picos obtenidos por MALDI⁺ (DCTB) del complejo **5**.

a. [M-4,6-Spym]⁺ experimental; **b.** [M+K]⁺ experimental; **c.** [M-4,6-Spym]⁺ simulado; **d.** [M+K]⁺ simulado.

De esta forma, los complejos obtenidos por sustitución de los átomos de cloro con unidades pirimidínicas son los siguientes:

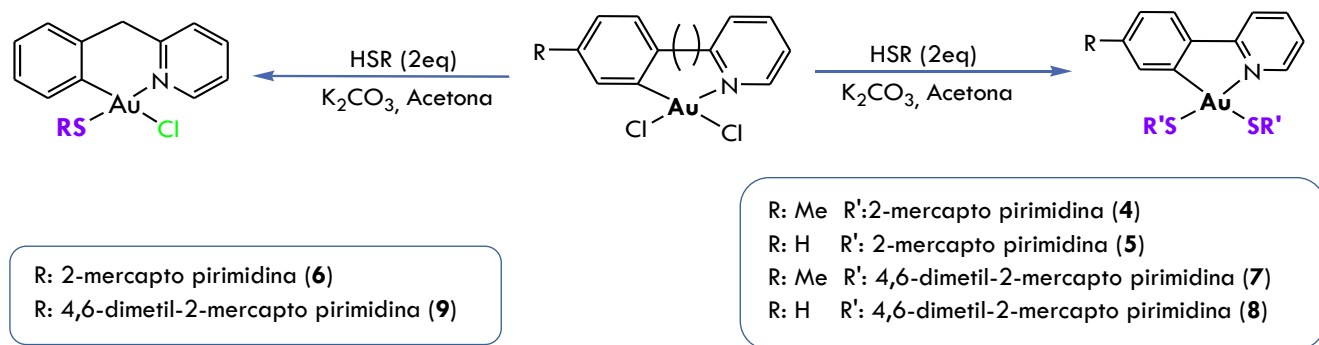


Figura 2.1.17. Esquema sintético seguido para la obtención de derivados ciclometalados con unidades pirimidínicas.

Dado que en los complejos con el ligando bzp se da la sustitución parcial de los átomos de cloro, se requiere un estudio más profundo para conocer la posición relativa del ligando mercapto entrante. De esta forma, para poder conocer cuál de los dos posibles isómeros geométricos se ha formado en esta reacción, *trans*-S-Au-N o *trans*-S-Au-C, se evaluó el efecto *trans* del anillo piridínico y del C-bencénico mediante la síntesis del complejo [AuCl(HMPT)tpy] (HMPT: trisdimetilamino fosfano).

La síntesis de este complejo se justifica porque al incorporar un sustituyente fosfano, los protones más cercanos al átomo de fósforo van a presentar un desdoblamiento que no van a exhibir el resto de los protones.

Así, una vez obtenido el complejo, se realizó un estudio mediante técnicas de $^1\text{H}\{^{31}\text{P}\}$ -RMN y ^1H -RMN. Como se puede ver en el espectro de la Figura 2.18, las señales de Ha y Hg experimentan un apantallamiento respecto del complejo $[\text{AuCl}_2\text{tpy}]$, y como consecuencia la señal se desplaza a campo alto. Este hecho se explica por la sustitución del átomo de Cl por el ligando HMPT, de marcado carácter dador. Asimismo, estas señales también experimentan, junto con Hb, un desdoblamiento que parece indicar que son los H en posiciones más próximas al ligando fosfano.

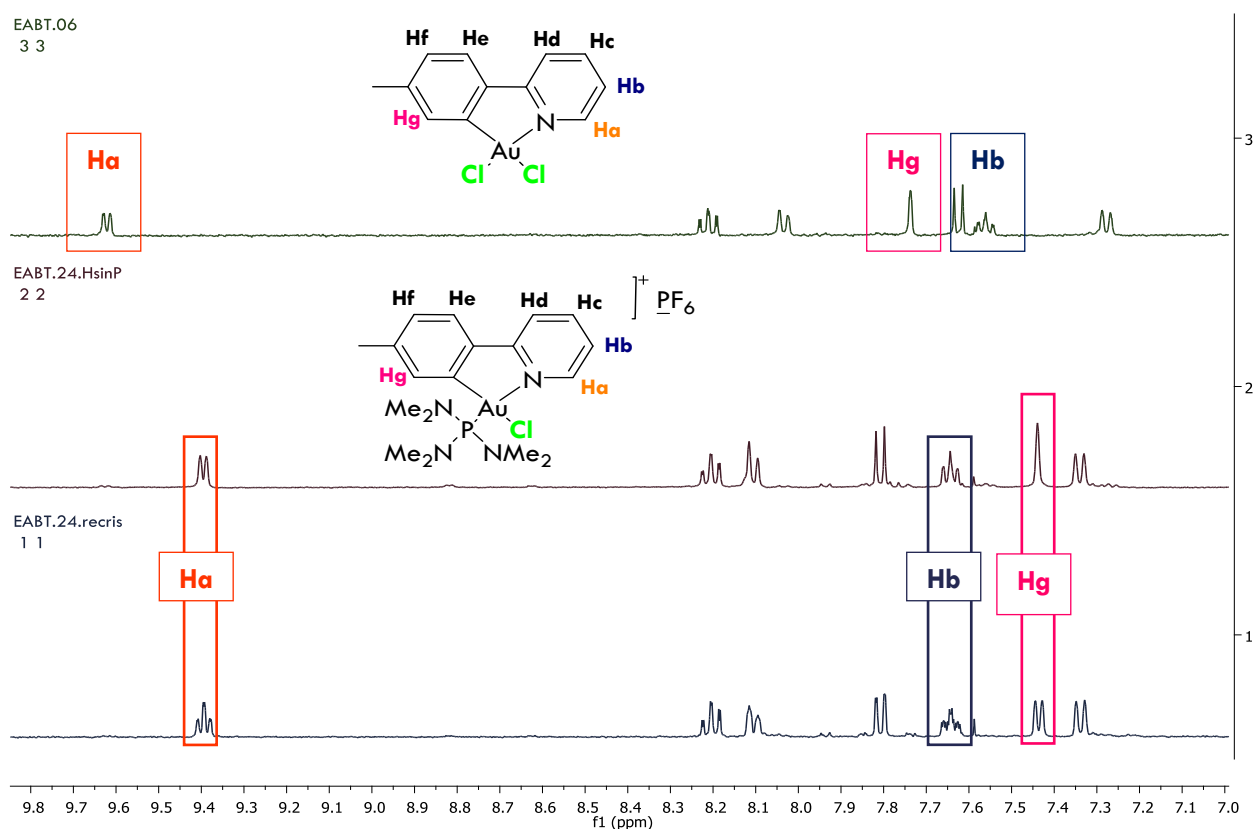


Figura 2.1.18. Comparativa de los espectros de $[\text{AuCl}_2(\text{tpy})]$ **1** (arriba), $^1\text{H}\{^{31}\text{P}\}$ -RMN (centro) y ^1H -RMN (abajo) de $[\text{AuCl}(\text{HMPT})\text{tpy}]$.

Este estudio no es concluyente, ya que el átomo de fósforo se va a acoplar en igual medida con Ha que con Hg ya que se encuentran al mismo número de enlaces (Tabla 2.5).

Tabla 2.1.5. Constantes de acoplamiento ^1H - ^{31}P (Hz) de $[\text{AuCl}(\text{HMPT})\text{tpy}]$.

	<i>Ha-P</i>	<i>Hg-P</i>
$J_{\text{H-P}}$ (Hz)	6.18	6.41

Así, se hace necesaria la realización de un experimento NOESY ^1H - ^1H (Figura 2.19), con el que se puede conocer la posición relativa del ligando fosfano.

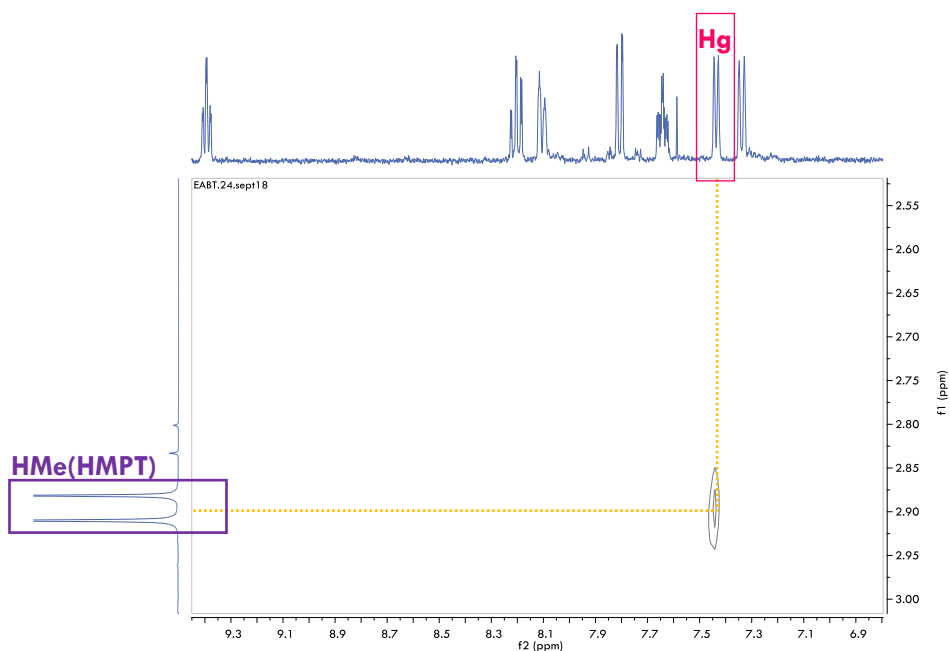


Figura 2.1.19. Espectro de NOESY (^1H - ^1H) de $[\text{AuCl}(\text{HMPT})\text{tpy}]$.

Según el espectro que se recoge arriba, los H_{HMPT} correlacionan con Hg y no con Ha; este hecho permite concluir que el Cl sustituido es el de la posición *trans* a N-py.

La formación de este isómero es coherente con otros complejos heterolepticos ciclometalados de Au(III) recogidos en la literatura, como $[\text{AuCl}(\text{PTA})(\text{bzip})](\text{PF}_6)$ publicado por Casini *et al.*,²¹ o $[\text{AuCl}(3\text{-thpy-C}^1,\text{N})(\text{PPh}_3)]\text{BF}_4$ descrito por Mikuriya *et al.*⁶ son algunos ejemplos en los que se pone de manifiesto que el átomo sustituido es efectivamente, el de la posición *trans* a N-py.

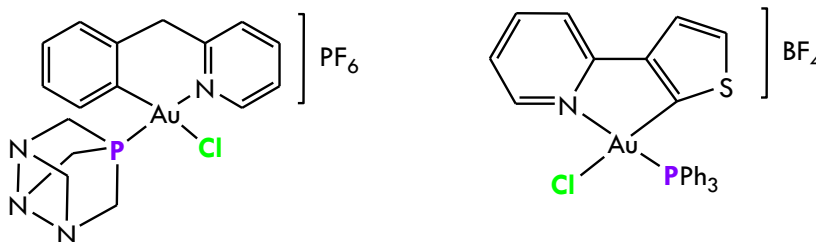


Figura 2.1.20. Estructuras de los complejos descrito por Casini (izq.) y Mikuriya (drcha.).

De esta forma, se propone la sustitución *trans* a Npy para los complejos heterolepticos con fórmula $[\text{AuCl}(\text{X})\text{L}]$.

COMPLEJOS DE AU(III) CON 2-TIOURACILO (2-TU)

Además de los complejos de Au(III) con 2-mercapto pirimidinas, se ha trabajado con 2-tiouracilo. Su elección se justifica por ser un derivado tanto del uracilo presente en el ARN, como del potente quimioterápico 5-fluoracilo (5-FU).²²

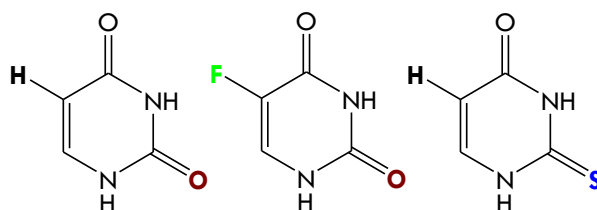


Figura 2.1.21. Estructura del uracilo (izq.), del 5-FU (centro) y 2-Tiouracilo (drcha.)

El 5-FU es capaz de entrar en la célula mediante el mismo mecanismo de transporte que el uracilo, una vez allí genera diferentes metabolitos activos análogos a los que generaría el uracilo. Así, sustituye al uracilo e interrumpe la síntesis del ARN y, mediante la inhibición de la timidilato sintasa (TS),²²⁻²³ también la síntesis del ADN. De esta forma consigue frenar la proliferación celular de las células tumorales. Así, se busca que este derivado del uracilo también sea capaz de actuar mediante este mecanismo mejorando si cabe la gran efectividad del 5-FU. En el caso de que el 2-tiouracilo (2-TU) no siga esta vía de acción, también cuenta con grupos aceptores y dadores de enlace de hidrógeno que favorecen la solubilidad en agua del complejo final.

Para la síntesis de este tipo de complejos se ha seguido el siguiente esquema de reacción (Figura 2.1.22):

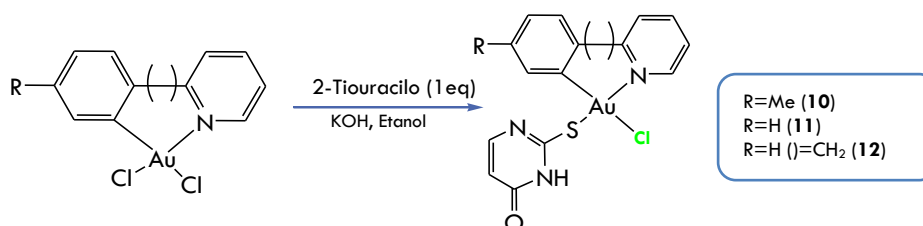


Figura 2.1.22. Esquema de reacción para la obtención de los derivados [AuCl(2-TU)L].

Como ya se puede observar en el anterior esquema de reacción, al contrario que ocurría con los anteriores grupos tiol utilizados; en este caso se da para los tres complejos ciclometalados una sustitución parcial. Para explicar este hecho, de nuevo la RMN ha resultado fundamental, puesto que en los espectros de ¹H-RMN realizados para los complejos con unidades 2-TU se ha encontrado como los protones H_i y H_h integran sólo por un protón. A modo de ejemplo, se recoge en la Figura 2.23 el espectro del complejo **10**, así como del

2-TU libre; cambios en el desplazamiento de este último confirma también la coordinación al centro metálico.

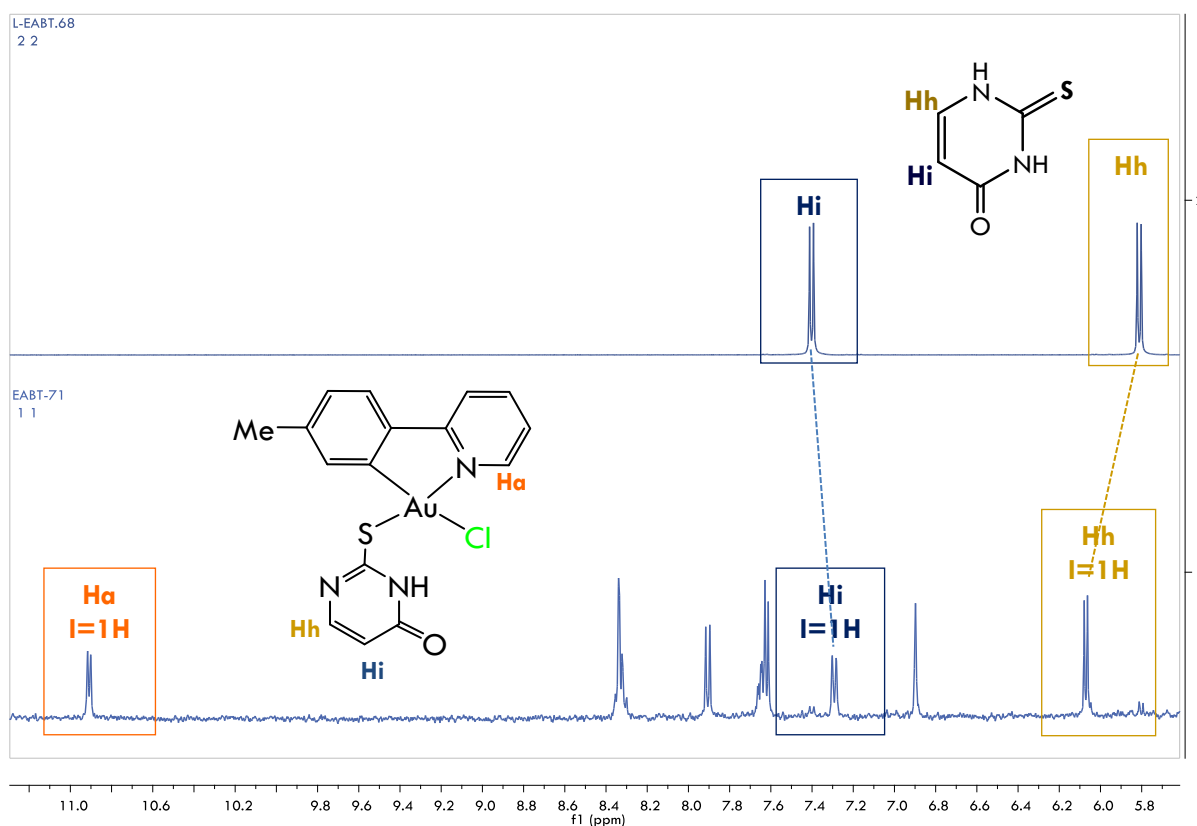


Figura 2.1.23. Espectro de ^1H -RMN para el complejo $[\text{AuCl}(2\text{-TU})\text{tpy}]$ (**10**).

Por otro lado, se realizaron estudios de análisis elemental que confirmaron que sólo se había coordinado un ligando tiouracilo, tal y como se había observado por ^1H -RMN.

Tabla 2.1.6. Valores de análisis elemental para el complejo **10**.

	%C	%H	%N	%S
$[\text{Au}(2\text{-TU})_2\text{tpy}]$	38.78	2.60	11.31	10.35
$[\text{AuCl}(2\text{-TU})\text{tpy}]$	36.61	2.08	7.96	6.08
Datos medidos 10	36.89	1.92	7.77	5.83

Como puede observarse a lo largo de este capítulo, se ha realizado un esfuerzo por determinar el grado de sustitución de los átomos de cloro. Este trabajo se justifica porque es un factor muy influyente no sólo por temas estructurales o de composición, si no por las grandes repercusiones que va a tener la estructura final de un complejo sobre su perfil farmacodinámico y cinético. De hecho, estudios sobre la constante de

lipofilicidad de un compuesto muestran como la presencia de un átomo de cloro contribuye positivamente a la hidrofobicidad del complejo respecto de un átomo de H.²⁴

Tabla 2.7. Valores de análisis elemental para los complejos **4**, **8** y **10**.

	4		8		10	
	Experimental	Teórico	Experimental	Teórico	Experimental	Teórico
%C	40.55	40.89	43.82	43.95	36.61	36.89
%H	2.56	2.75	3.35	3.37	2.08	1.92
%N	11.76	11.92	11.48	11.14	7.96	7.77
%S	10.63	10.92	10.36	10.20	5.83	6.08

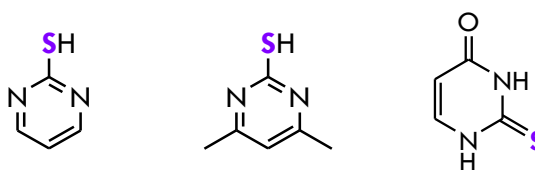
En la síntesis de los complejos hasta ahora mencionados, se han utilizado grupos tiol pero con residuos de tipo aromático. Una sustitución total generaría la especie con dos unidades aromáticas con un peso molecular sensiblemente mayor a la especie con sólo un residuo aromático. Según Lipinski, un fármaco con buenas características no debería superar 500 g/mol de peso molecular, por lo que una sustitución parcial parece ser más ventajosa para una mejor biodistribución a través del torrente sanguíneo. Con base en los valores de peso molecular de los productos sintetizados, sí es cierto que los complejos resultantes de una sustitución parcial tienen pesos más próximos a los 500 g/mol propuestos por Lipinski.

Tabla 2.8. Pesos moleculares de los complejos sintetizados.

Complejo	Peso Molecular
[Au(Spym) ₂ tpy] (4)	602.07
[Au(Spym) ₂ ppy] (5)	588.48
[AuCl(Spym)bzp] (6)	511.78
[Au(4,6-Spym) ₂ tpy] (7)	658.61
[Au(4,6-Spym) ₂ ppy] (8)	644.59
[AuCl(4,6-Spym)bzp] (9)	539.83
[AuCl(2-TU)tpy] (10)	527.78
[AuCl(2-TU)ppy] (11)	513.75
[AuCl(2-TU)bzp] (12)	527.78

Para evaluar esta teoría, se realizaron las medidas de su solubilidad en agua de los complejos de Au(III) hasta ahora comentados (Tabla 2.9).

Tabla 2.9. Solubilidad en agua de los complejos con unidades pirimidínicas.



Compuesto	4	5	6	7	8	9	10	11	12
S ^o ₂₅ (mg/l)	85	78	87	77	70	80	73	72	71

Los complejos con derivados pirimidínicos no muestran una elevada solubilidad en agua, aunque sí se observa una ligera mejoría en el carácter hidrófilo de los complejos **6** y **9** frente a los derivados análogos con dos unidades mercapto pirimidina. No obstante, la pequeña diferencia observada indica que el efecto del átomo de cloro es casi despreciable frente a la del otro grupo introducido.

Con base en estos resultados, se decidió buscar otras alternativas que contribuyeran a mejorar esa solubilidad en agua. Típicamente, se ha trabajado con grupos fosfano para mejorar esta propiedad, especialmente en la química de Au(I);²⁵ pero al tratarse de ligandos P-dadores y neutros, no son buenos candidatos para el Au(III), puesto que no estabilizan tanto este estado de oxidación frente a una posible reducción en el medio intracelular.

Por ello, como alternativa, se realizó una búsqueda de una molécula pequeña que contribuyera a disminuir el peso molecular del complejo total, así como con más átomos susceptibles de realizar enlaces de hidrógeno; es decir, buscar alternativas según la Regla de Lipinski.

COMPLEJOS DE Au(III) CON UNIDADES TIOUREA

Los complejos hasta ahora sintetizados no son todo lo solubles en medio acuoso que se esperaba; sin embargo, sí manifiestan una buena estabilidad tanto en disolución como en estado sólido. Así pues, viendo que los ligandos S-dadores consiguen estabilizar perfectamente el estado de oxidación +III, se decidió mantener este átomo como punto de enlace al centro metálico. Al igual que se ha pretendido con el uso de derivados tiopirimidínicos, el posible carácter biomimético de la molécula a introducir, era un valor añadido para mejorar la asimilación y distribución en el organismo. Con todos estos requisitos, así como la presencia de átomos sensibles a la formación de enlaces de hidrógeno, se recurrió al uso de tiourea (Tabla 2.10).

Tabla 2.10. Valores de Lipinski para la tiourea.

	Log P	H Aceptores	H Dadores	Peso Molecular
Tiourea	-1.020±0.187	2	4	76.12

Estos valores de los factores de Lipinski mejoran los encontrados para los derivados tiopirimidínicos utilizados anteriormente. Asimismo, cabe destacar que derivados tiourea se han utilizado como fármacos antibacterianos, antialérgicos, antioxidantes, o como antiinflamatorio.²⁶ Esto último, todavía le confiere mejores propiedades para su uso en antitumorales ya que procesos inflamatorios suelen asociarse con varios tipos de cáncer.

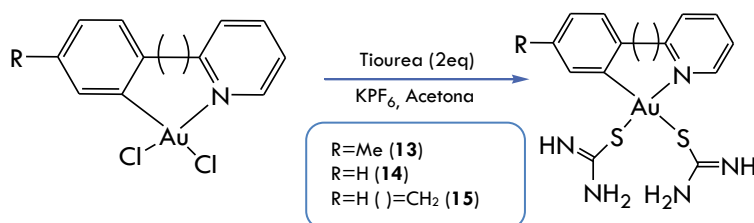


Figura 2.1.24. Esquema de reacción para la obtención de los derivados de Au(III) con tiourea.

Para evaluar el grado de sustitución de los átomos de Cl, hasta ahora el RMN había resultado sumamente útil; sin embargo, en el caso de las unidades tiourea, se debe buscar una técnica alternativa ya que los H de la tiourea son móviles. Estos H se van a estar intercambiando con moléculas de disolventes, haciendo difícil su asignación e integración. Por ello, se ha recurrido a la técnica de análisis elemental y espectrometría de masas.

Tabla 2.1.11. Análisis elemental de los complejos **13** y **15**.

	%C	%H	%N	%S
Datos Teóricos $[Au(tiourea)_2L]$	32.62	3.13	13.59	12.44
Datos Observados 13	32.46	3.38	13.71	12.55
Datos Observados 15	32.45	3.53	13.78	12.37

Según los resultados recogidos en la Tabla 2.1.11, los análisis elementales son consistentes con la introducción de 2 unidades de tiourea. Esta conclusión también se refuerza con la espectrometría de masas (MALDI⁺), donde en todos los casos se observa la señal correspondiente al ion molecular: $[Au(tiourea)_2L]$ L=tpy (**13**), bzp (**15**), PM=513 g/mol.

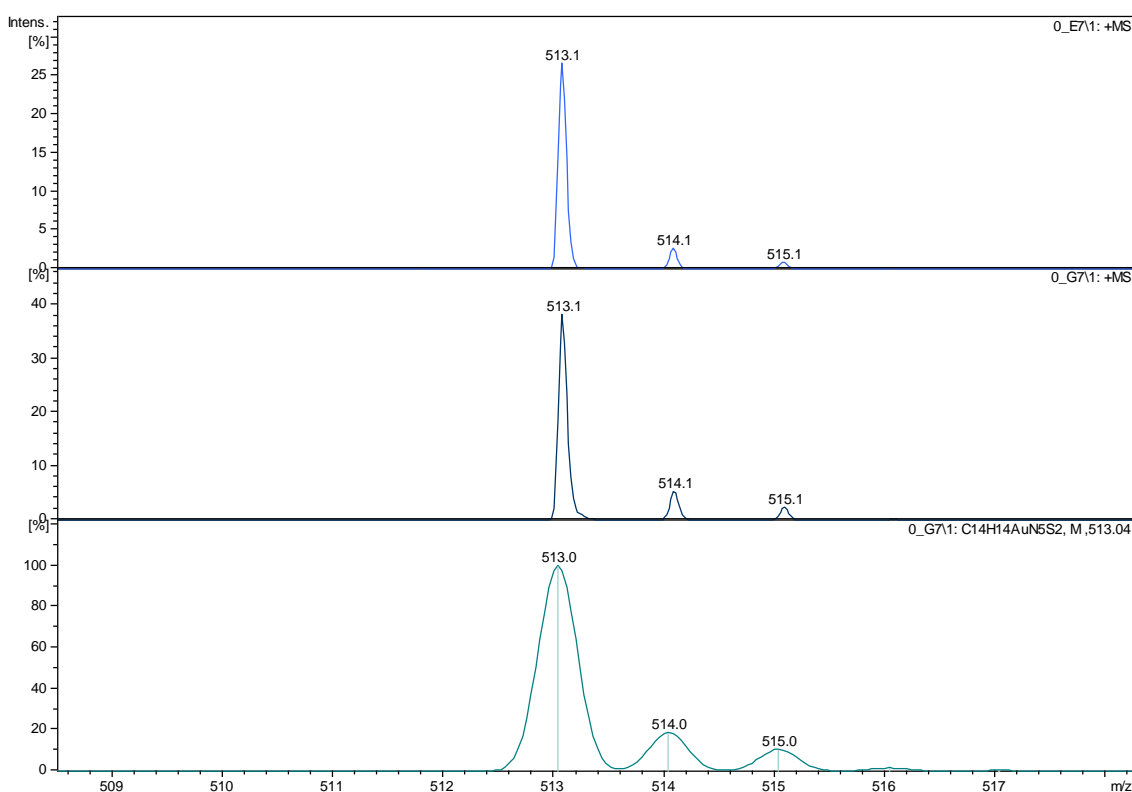


Figura 2.1.25. Señal del ion molecular (M^+) para el complejo **13** (arriba), **15** (centro) y simulación para el complejo $[Au(tiourea)_2L]$ (abajo).

Una vez aislados y caracterizados, se evaluó la solubilidad en agua de estos complejos, observando una mejora considerable respecto de los complejos hasta ahora sintetizados (Tabla 2.1.12). Sin embargo, los valores encontrados para estos complejos de Au(III) siguen siendo inferiores a los encontrados para fármacos antitumorales como el *cis*-Pt (2.5 g/l) o el oxaliplatino (4.0 g/l).

Tabla 2.1.12. Solubilidad en agua de los complejos con unidades tiourea.

Compuesto	13	14	15
S ^o ₂₅ (mg/l)	150	160	130

COMPLEJOS DE Au(III) CON RESIDUOS ACETATO

Tras el estudio de solubilidad realizado con los complejos con unidades tiourea, se comprobó como la utilización de moléculas de menor tamaño y con átomos susceptibles de formar enlaces de H, era beneficiosa para generar complejos más hidrófilos. Por ello, se decidió continuar por esta vía y trabajar con moléculas que reunieran estas dos propiedades. De esta forma, se optó por el uso de ligandos acetato.

La síntesis de derivados ciclometalados de Au(III) con unidades acetato se ha explotado siempre con el mismo objetivo que el que aquí nos ocupa, dotar de solubilidad en agua a dicho complejo. Sin embargo, durante el estudio de complejos de este tipo se ha demostrado que, en algunos casos, estos compuestos se hidrolizan perdiendo un primer sustituyente acetato fácilmente, y un segundo más lentamente.^{7, 27} Aunque por este hecho pueda parecer que este tipo de complejos no son útiles para su aplicación como antitumorales, no es así; ya que la activación de un fármaco mediante procesos de hidrólisis es bien conocida para casos tan importantes como el del *cis*-Pt.

A lo largo de esta tesis doctoral, no sólo se ha buscado desarrollar nuevos fármacos antitumorales, si no que éstos se puedan obtener a través de procedimientos sencillos. Así pues, simplificar y optimizar los procedimientos sintéticos utilizados ha sido también uno de los objetivos de esta investigación; no solo por cuestiones de *Green Chemistry*, sino también por el hecho de que todas estas reacciones han de ser económicamente viables a nivel industrial si finalmente se comprobara su aplicabilidad en el campo farmacéutico.

La obtención de los derivados Au(III)-acetato se ha realizado siguiendo el esquema que se recoge en la Figura 2.1.26. Esta reacción había sido previamente descrita por J.J. Vittal *et. al.*²⁸ sin embargo, utilizaba condiciones de atmósfera controlada y tiempos más largos que los aquí llevados a cabo.

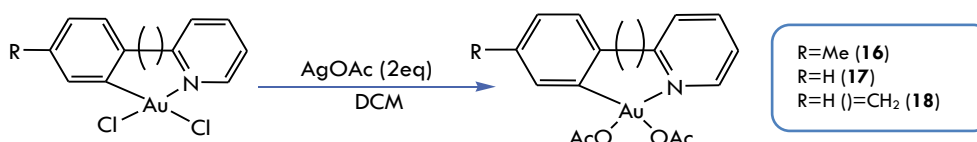


Figura 2.1.26. Esquema de reacción para la síntesis de derivados [Au(OAc)₂L].

Al igual que con el resto de los complejos comentados hasta ahora, estos derivados se han caracterizado por diferentes técnicas, estudiando de nuevo el grado de sustitución de los átomos de Cl por RMN. Mediante el estudio de los espectros de ^1H -RMN realizados, se ha podido concluir que la sustitución se produce sobre los dos átomos de Cl coordinándose dos unidades acetato. Este hecho se constata por la inequivalencia observada en los grupos Me (Hi) de los residuos acetato. El origen de esta inequivalencia reside en la diferente naturaleza del átomo dador en posición *trans*: anillo piridínico (N) o el bencílico (C).

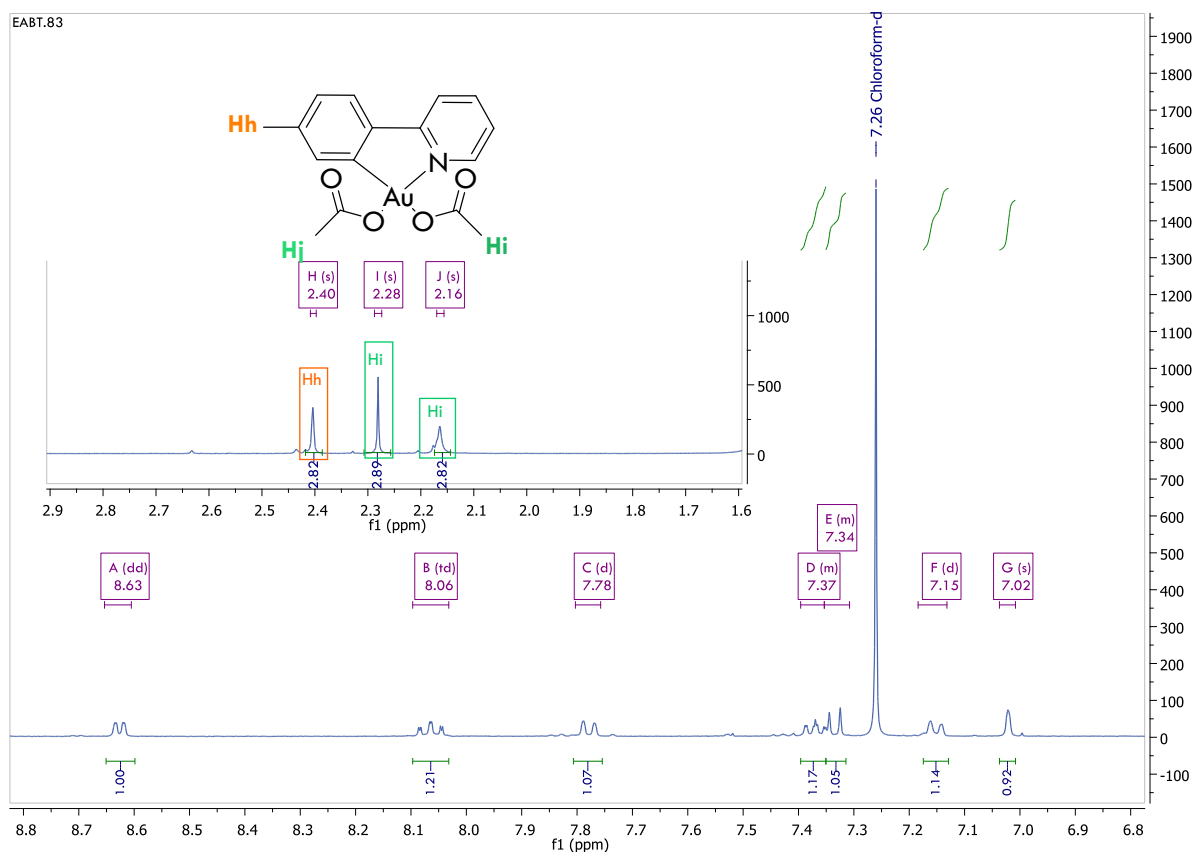


Figura 2.1.27. Espectro de ^1H -RMN del complejo $[\text{Au}(\text{OAc})_2(\text{tpy})]$ (16)

El espectro que se recoge en la Figura 2.1.27, no sólo demuestra el grado de sustitución, sino también el modo de coordinación de los grupos acetato. El hecho de que se dé una sustitución total, indica que las dos unidades acetato se encuentran coordinadas al centro metálico a través de una unión monodentada; ya que el Au(III) tiene un índice de coordinación 4 que se superaría de darse dos unidades acetato coordinadas bidentadamente.

Para confirmar este hecho, se ha recurrido a la espectroscopía IR,²⁹ donde los grupos carboxilato muestran varias bandas intensas que van a proporcionar información estructural especialmente útil. Las bandas más características de compuestos con enlace M-carboxilato son las bandas de tensión CO_2 tanto simétrica (ν_s) como asimétrica (ν_{as}). Estas bandas se dan a frecuencias distintas a las del carboxilato libre por lo que proporcionan una poderosa herramienta, e inequívoca, de caracterización; gracias a que la frecuencia de estas bandas es fuertemente dependiente de la estructura del grupo carboxilato, de la naturaleza del metal y del ligando.³⁰ Esto es importante porque la separación entre estas bandas de tensión va a variar en función de estos mismos factores, siendo por tanto un parámetro indicativo de la estructura del carboxilato ($\Delta\nu$).

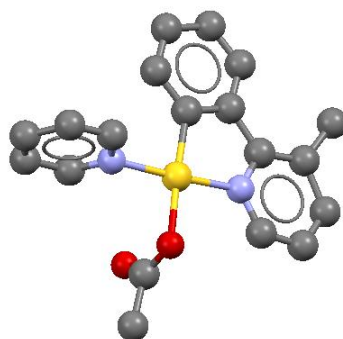
Tabla 2.1.13. Frecuencias de tensión del grupo acetato.

Complejo	$\nu_{\text{asimétrica}} (\text{cm}^{-1})$	$\nu_{\text{simétrica}} (\text{cm}^{-1})$	$\Delta\nu = \nu_{\text{as}} - \nu_{\text{s}}$	Tipo de coord..
AcO^-	1578	1414	164	Iónica
$\text{Si}(\text{OAc})_4$	1745	1290	455	Monodentada
$\text{RuH}(\text{OAc})(\text{PPh}_3)_2$	1526	1449	77	Bidentada
$[\text{Au}(\text{OAc})(\text{pmpy})(\text{py})]\text{ClO}_4$	1626	1308	318	Monodentada
$[\text{Au}(\text{OAc})_2\text{tpy}]$ 16	1625	1310	315	Monodentada
$[\text{Au}(\text{OAc})_2\text{ppy}]$ 17	1633	1309	324	Monodentada
$[\text{Au}(\text{OAc})_2\text{bzp}]$ 18	1625	1304	321	Monodentada

Respecto de la separación de las bandas del carboxilato libre, una coordinación monodentada suele implicar una mayor diferencia entre las frecuencias de tensión mencionadas ($\Delta\nu$). Este hecho se explica por la ruptura en la simetría del carbonilo, que conlleva un aumento de ν_{as} y una disminución de ν_{s} , como ocurre con la especie de silicio.³⁰ De darse enlaces de hidrógeno con moléculas de disolvente, la elucidación del tipo de coordinación del grupo carboxílico es más compleja ya que ν_{as} decrece.³¹

Según lo mencionado anteriormente, y de acuerdo con los valores recogidos en la Tabla 2.1.13, se puede proponer que las dos unidades acetato están coordinadas de forma monodentada.

Asimismo, el complejo ciclometalado de Au(III) descrito por Parish *et al.*, y recogido en la Tabla 2.1.13, también se estudió por difracción de rayos X, confirmando la coordinación del grupo acetato de forma monodentada, tal y como se había predicho por espectroscopia infrarroja.²⁰


Figura 2.1.28. Estructura del complejo $[\text{Au}(\text{OAc})(\text{pmpy})(\text{py})]^+$.

El complejo cristaliza con una molécula de CH_2Cl_2 que se ha omitido por simplicidad.

Al igual que con el resto de los complejos sintetizados, tras determinar su estructura, se realizaron los estudios de solubilidad en agua:

Tabla 2.1.14. Solubilidad en agua de los complejos con unidades acetato.

Compuesto	16	17	18
$S^{\circ}_{25} (\text{mg/l})$	420	720	1200

Los complejos con residuos de tipo acetato tienen una solubilidad en agua superior a los sintetizados anteriormente, incluso mejor que los derivados con unidades tiourea, lo que confirma la necesidad de trabajar con moléculas pequeñas además de capaces de realizar enlaces de hidrógeno. Asimismo, parece que grupos O-dadores pueden ser una buena alternativa.

Tabla 2.1.15. Resumen de las propiedades de Lipinski para los grupos aniónicos utilizados.

Grupos utilizados	H Aceptores	H Dadores	Peso molecular
2-mercaptopirimidina	2	0	112.15
(4,6)-dimetil-2-mercaptopirimidina	2	0	140.21
2-tiouracilo	3	2	128.15
Tiourea	2	4	76.12
Acetato	2	0	59.05

COMPLEJOS DE Au(III) CON AMINOÁCIDOS

El patrón de búsqueda para nuevas moléculas para la sustitución de los átomos de Cl, fue el mismo que el utilizado a lo largo de esta investigación, pero con un parámetro adicional como era la posibilidad de formar enlaces Au-O. De esta forma las restricciones impuestas por las conclusiones de los estudios anteriores eran:

- .. Bajo peso molecular.
- .. Átomos capaces de realizar enlaces de hidrógeno.
- .. Posible carácter biomimético o biomoléculas.
- .. Moléculas con grupos O-dadores.

Así pues, se pensó en el uso de aminoácidos para la sustitución de los átomos de Cl presentes en los complejos de partida. No obstante, en el diseño de un fármaco nada es trivial y así se realizó evaluaron las propiedades de los diferentes aminoácidos ($\alpha\alpha$) para realizar una selección.

Los aminoácidos suelen clasificarse en esenciales y no esenciales de acuerdo a si van a poder ser sintetizados por el organismo (no esenciales), o si por el contrario deben ser administrados en la dieta (esenciales). En un intento por conseguir que el fármaco sea tolerado y mejor asimilado, se decidió trabajar con aminoácidos esenciales. De esta forma, la lista se redujo de 20 a 9 posibles aminoácidos.

Los aminoácidos esenciales son: histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptófano y valina. Los cuales presentan unas propiedades químicas muy diferentes en función de su cadena (ver Figura 2.29), dado que se quiere conseguir un complejo que sea soluble en agua, se prefirió trabajar con un aminoácido que contengan átomos que pueden participar en enlaces de hidrógeno. Por otro lado, la posibilidad de utilizar aminoácidos con anillos aromáticos que pudieran conferir propiedades luminiscentes al complejo final, era también algo digno de consideración.

Aminoácidos esenciales

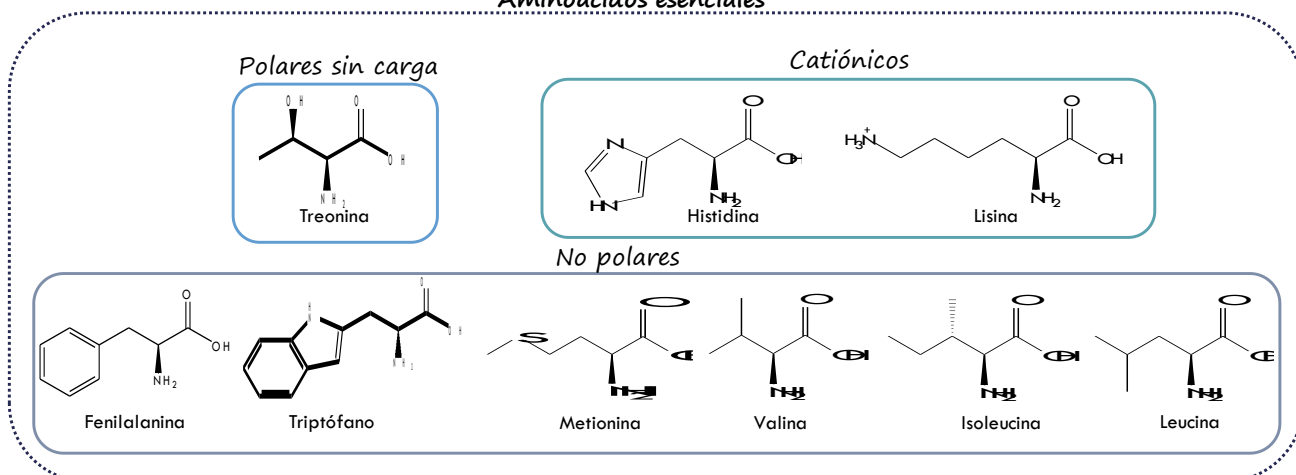


Figura 2.1.29. Clasificación de los aminoácidos esenciales en función de las propiedades químicas de su cadena.

La mayor parte de los aminoácidos esenciales contienen una cadena lateral de tipo apolar, por lo que se ha decidido trabajar con este tipo de aminoácidos seleccionados. El primer aminoácido seleccionado fue la L-fenilalanina, ya que es a su vez necesaria para la producción de otro aminoácido, la L-tirosina; y es precursor de las catecolaminas como la L-dopamina, norepinefrina y epinefrina. Asimismo, también se encuentra en muchos neuropéptidos. La L-fenilalanina ya forma parte de algunos cocteles de quimioterápicos utilizados en el tratamiento del cáncer de mama,³² e incluso se ha encontrado que puede constituir un biomarcador de cáncer esofágico.³³⁻³⁴

El segundo aminoácido seleccionado fue la L-metionina puesto que incorpora un átomo de azufre en su estructura, lo que le permitiría realizar interacciones de tipo enlace de hidrógeno y dotar de solubilidad al complejo final. La L-metionina es un intermediario en la biosíntesis de cisteína, carnitina, taurina, lecitina, fosfatidilcolina y otros fosfolípidos, por lo que fallos en la conversión de metionina pueden desembocar en aterosclerosis, que es un tipo de arterioesclerosis. Asimismo, la metionina junto con la cisteína va a poder generar S-adenosil metionina cuya función es dador de metilos. Esta función tiene más importancia de la que parece puesto que, alteraciones en el metabolismo de metionina, así como en los procesos de transmetilación se producen con frecuencia en células tumorales; con la consiguiente alteración en la regulación de genes implicados en el proceso oncogénico.³⁵⁻³⁶

Así pues, teniendo en cuenta el papel de estos aminoácidos en procesos tumorales y los valores encontrados para la regla de Lipinski (Tabla 2.1.16), se les ha considerado buenos candidatos para la sustitución de los átomos de cloro.

Tabla 2.1.16. Valores de Lipinski para los aminoácidos seleccionados.

Aminoácido	H Aceptores	H Dadores	Peso molecular
L-fenil alanina	3	3	165.19
L/D metionina	3	3	135.18

Para la obtención de estos derivados se ha utilizado como base NaOH en metanol según el siguiente procedimiento:

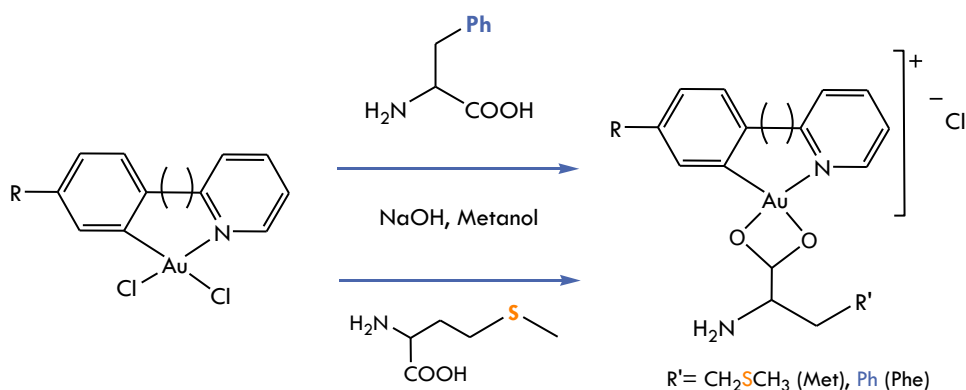


Figura 2.1.30. Esquema sintético para la obtención de los derivados de Au(III) con aminoácidos, 19-23.

Este tipo de complejos sólo ha incorporado una molécula del aminoácido utilizado, con base en lo observado en las integraciones encontradas en el espectro de ^1H -RMN. Así, se puede observar como la señal del grupo Me integra por 3H, mientras que cada señal de los H de la molécula de fenilalanina sólo integra por 1H.

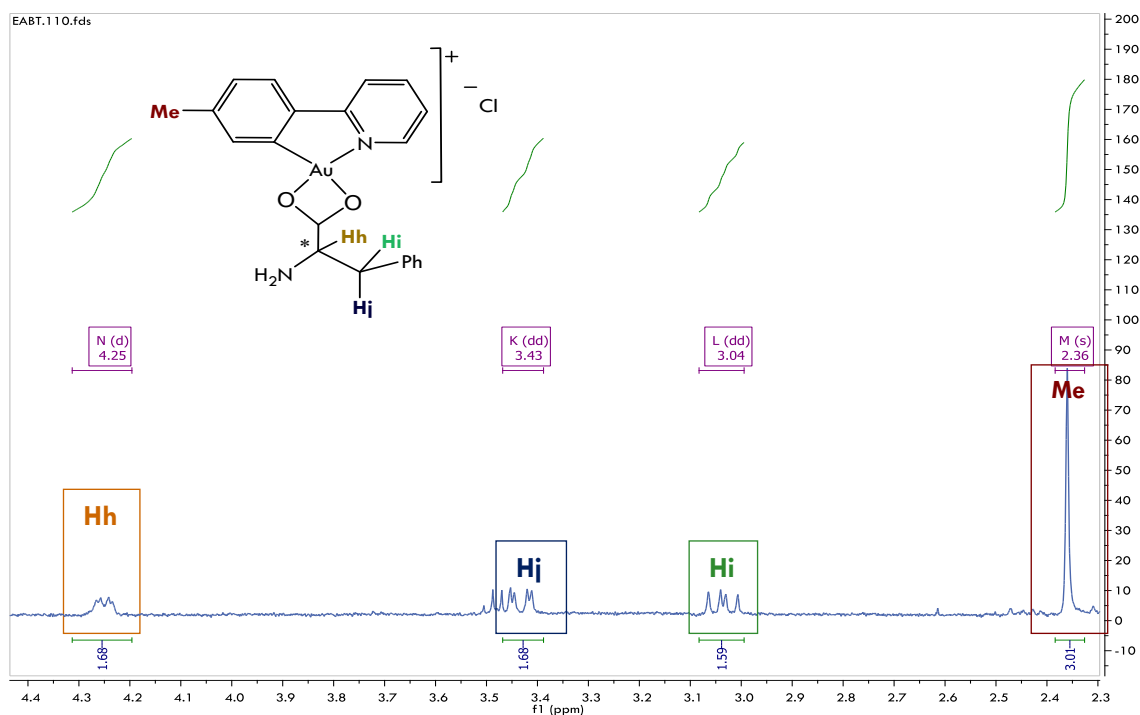


Figura 2.1.31. Espectro de ^1H -RMN del complejo $[\text{Au}(\text{Phe})\text{tpy}]\text{Cl}$ (19).

Sin embargo, al contrario que lo observado con el resto de complejos anteriormente, la presencia de un único residuo aminoácido no implica una sustitución parcial, ya que puede darse una coordinación

bidentada a través del grupo ácido. Para elucidar el tipo de coordinación del aminoácido, se realizó un estudio por IR para determinar la presencia o no de un enlace Au-Cl. En el espectro obtenido no se encuentra ninguna banda sobre 350 cm^{-1} (Figura 2.1.32, zona recuadrada); por lo que no observarse un enlace Au-Cl, parece indicar que se trata de una coordinación bidentada para satisfacer la capacidad coordinativa del centro metálico.

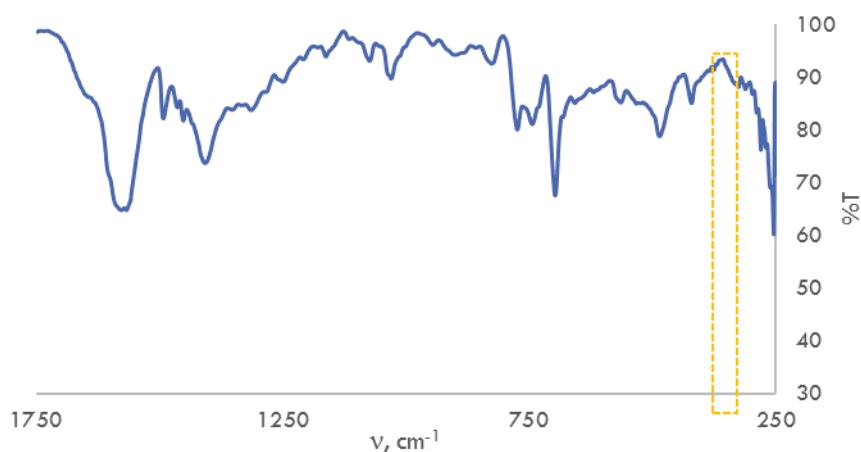


Figura 2.1.32. Zona de 1750 a 250 cm^{-1} del complejo $[\text{Au}(\text{Phe})(\text{tpy})]\text{Cl}$ (**19**).

Así pues, si el aminoácido presenta efectivamente una coordinación bidentada, el átomo de Au no queda neutralizado electrónicamente, haciendo que el complejo sea iónico. En función de la conductividad obtenida para el complejo, se puede conocer la relación de electrolitos, tal y como se recoge en la Tabla 2.17:

Tabla 2.1.17. Relación de electrolitos en función de la conductividad medida en acetona.

Relación	1:1	2:1	3:1	4:1
Conductividad ($\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$)	100-140	160-200	270	360

Así se puede observar como la conductividad total ($99.6\ \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$) encaja en el rango de valores indicativo de una relación 1:1; esto confirma que se trata de un complejo iónico con un átomo de Cl fuera de la esfera de coordinación, lo que concuerda con la no existencia de la banda de vibración correspondiente con el enlace Au-Cl.

COMPLEJOS DE Au(III) CON DERIVADOS ACETILENO

Como ya se ha comentado en el capítulo anterior, y aunque la química de Au(III) está dominada principalmente por el uso de ligandos N- y O-dadores así como ligandos haluro;³⁷⁻³⁹ también hay numerosos ejemplos de complejos con unidades fosfano y tiol que suelen ser de tipo alquilo, arilo (como en

el apartado anterior) o iluros. Sin embargo, y a pesar de que los complejos de Au(I) y de Pt(II) con unidades acetiluro se han estudiado ampliamente,⁴⁰⁻⁴¹ existen pocos ejemplos de complejos etinilo de Au(III). Los complejos de Au(I) y Pt(II) con este tipo de ligandos son conocidos por mostrar una rica fotoluminiscencia, propiedad que en los complejos de Au(III) es virtualmente desconocida.

Sabiendo que Pt(II) y Au(III) son isoelectrónicos e isoestructurales, se decidió trabajar con este tipo de moléculas para intentar conseguir complejos de Au(III) con buenas propiedades luminiscentes, como sucede con el Pt(II). De ser así, esta característica podría permitir monitorizar el metabolismo de los compuestos sintetizados en el organismo. Esto es muy importante ya que puede esclarecer los modos de acción involucrados en las actividades biológicas de los complejos de Au(III),⁴²⁻⁴³ o al menos la diana sobre la que actúa, todavía sin determinar con exactitud.⁴⁴⁻⁴⁵

La selección de los residuos acetiluro con los que se ha trabajado, no ha sido trivial ya que una vez más, está elección va a ser determinante para su aplicabilidad como fármaco. Así se ha basado en los siguientes puntos:

- Propiedades luminiscentes: se han seleccionado ligandos aromáticos que contribuyen positivamente a la luminiscencia al aumentar la deslocalización y rigidez del sistema.
- Solubilidad en agua (Factor de Lipinski): la rigidez de los anillos aromáticos disminuye la solubilidad en agua de los complejos; por ello se decidió utilizar ligandos que, a su vez, también tuvieran átomos de N capaces de generar enlaces de hidrógeno (Tabla 2.1.18).

Tabla 2.1.18. Valores de Lipinski para los acetiluros utilizados.

	Log P	H Aceptores	H Dadores	Peso Molecular
<i>p</i> -tolil acetileno	3.26±0.28	0	0	116.16
2-etinil piridina	1.15±0.28	1	0	103.12

Para la obtención de este tipo de complejos se siguió el esquema sintético recogido en la Figura 2.33.

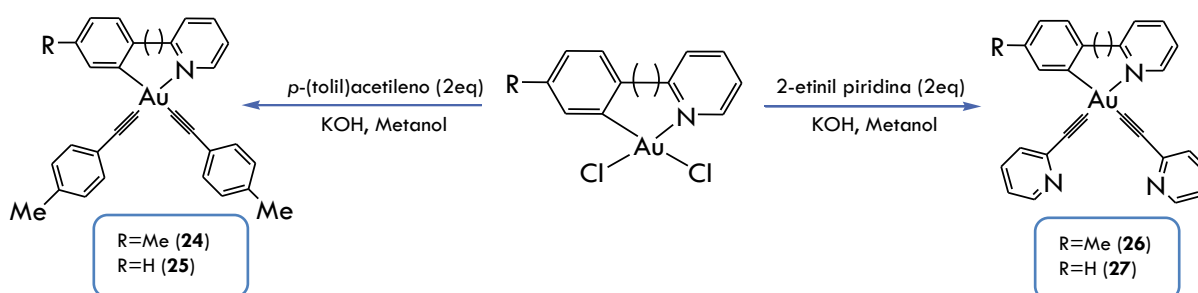


Figura 2.1.33. Esquema de reacción para la obtención de derivados etinilo.

La obtención este tipo de complejos, fue ensayada en muchas condiciones hasta llegar a la que se recoge en la Figura 2.1.33. Las condiciones que se probaron variaban el tipo de base o el disolvente utilizado, siempre sin éxito hasta que se encontró la pareja KOH/MeOH. Para intentar entender este hecho, se analizaron las condiciones ácido-base utilizadas:

Tabla 2.1.19. Bases utilizadas para la introducción de unidades etinilo.

Base	pka teórico
CO ₃ ²⁻	10
NEt ₃	10.75
OH ⁻	15

De las bases testadas, el hidróxido es la base más fuerte, lo que explica que sea ésta la que ha conseguido la desprotonación total del acetileno y por ello la coordinación al centro metálico. No obstante, el efecto del disolvente también ha sido determinante para que la reacción tuviera lugar ya que, de todos los disolventes utilizados (Tabla 2.1.20), sólo en combinación con metanol se ha obtenido el producto deseado.

Tabla 2.1.20. Disolventes utilizados con KOH para la introducción de unidades etinilo.

Disolvente	Resultado	Polaridad relativa⁴⁶
Acetonitrilo	Sin reacción	0.46
Etanol	Mezcla	0.65
Metanol	Producto puro	0.76

Tal y como se puede observar en la Tabla anterior, la polaridad es un factor clave para la obtención de este tipo de complejos, puesto que la reacción no tuvo lugar al utilizar acetonitrilo, pero sí con los disolventes más polares, aunque con diferente pureza del producto final. El hecho de que un incremento en la polaridad favorezca la reacción puede estar relacionado con la solvatación de los iones generados, ya que las moléculas de disolvente van a formar una capa de solvatación alrededor del ion con efecto estabilizador. Esta estabilización es especialmente notable en el caso de aniones, puesto que pueden darse enlaces de hidrógeno que hacen que la formación del ion acetiluro sea más estable, ya que se da un mayor grado de solvatación.⁴⁷

Así pues, mediante el uso de la combinación MeOH/KOH, se ha conseguido la sustitución de los dos átomos de cloro por las unidades acetileno. Este hecho se ha confirmado por las técnicas de caracterización utilizadas a lo largo de este capítulo, siendo especialmente útil la RMN.

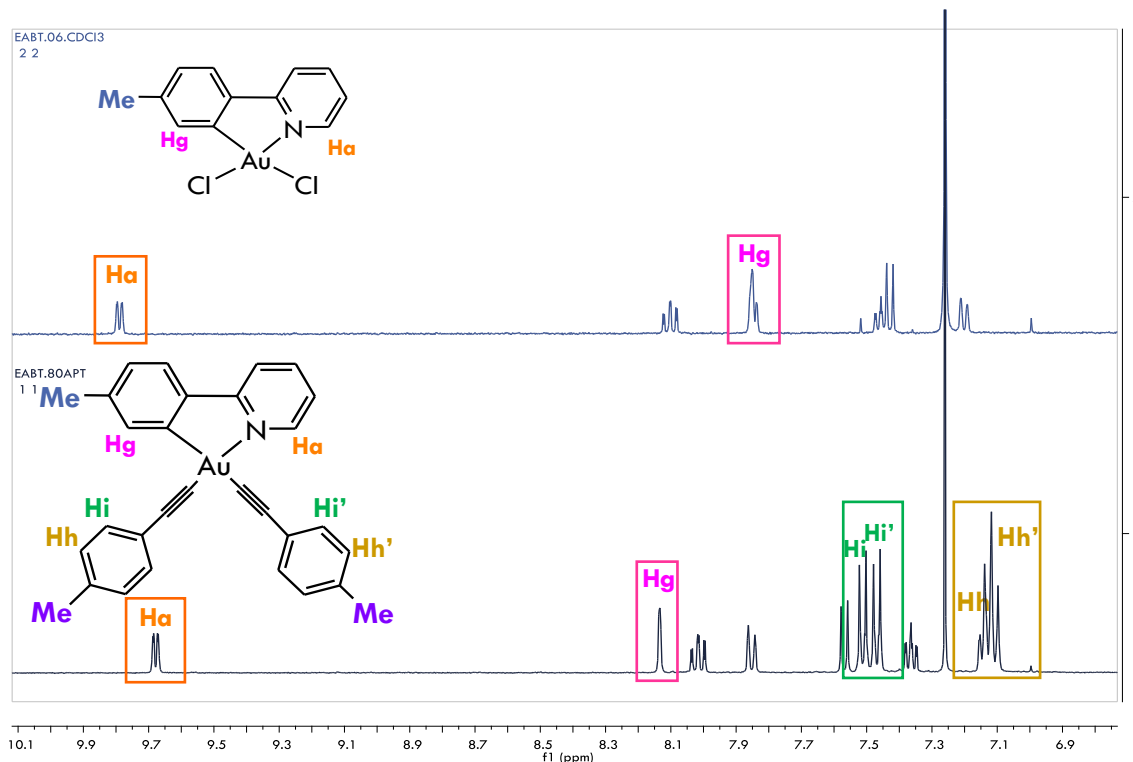


Figura 2.1.34. Comparativa de la zona aromática de los espectros de ^1H -RMN de los complejos $[\text{AuCl}_2(\text{tpy})]$ **1** (arriba) y $[\text{Au}(\text{tolilacetileno})_2\text{tpy}]$ **24** (abajo).

La coordinación de la unidad etinilo se confirma no sólo por la modificación del espectro respecto del $[\text{AuCl}_2\text{L}]$ por la aparición de las señales de los anillos, sino también un desplazamiento a campo bajo de la señal del Hg adyacente a N-py. En lo que se refiere a la sustitución de los dos átomos de Cl, se puede demostrar por el carácter inequivalente observado para cada unidad acetiluro, ya que una se encuentra en una posición *trans* a piridina y la otra, *trans* a benceno. Este fenómeno se percibe en la zona aromática con los dos dobletes de cada Hi inequivalente; y aún más claramente en la zona alifática, con los dos singletes adicionales respecto del espectro de ^1H -RMN de $[\text{AuCl}_2\text{tpy}]$, correspondientes a los dos metilos diferentes de cada unidad acetiluro. (Figura 2.1.35).

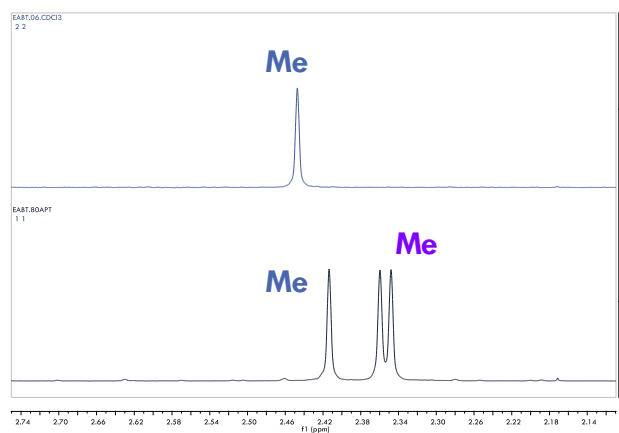


Figura 2.1.35. Comparativa de la zona alifática de los espectros de ^1H -RMN de los complejos $[\text{AuCl}_2\text{tpy}]$ **1** (arriba) y $[\text{Au}(\text{tolilacetileno})_2\text{tpy}]$ **24** (abajo).

La estructura propuesta por RMN fue confirmada posteriormente por estudios de difracción de rayos X sobre unos cristales obtenidos por evaporación lenta de CDCl_3 .

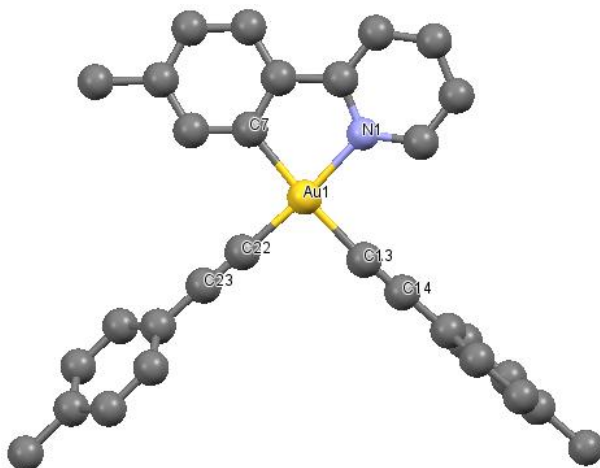


Figura 2.1.36. Estructura cristalina del complejo $[\text{Au}(\text{Tolilacetileno})_2\text{tpy}]$ (**24**).

Los datos cristalográficos más importantes se recogen en la Tabla 2.1.21, donde se puede observar una ligera distorsión de la geometría plano cuadrada típica de Au(III) que implica ángulos de 90° . Esta distorsión se debe al anillo ciclometalado que genera una mayor tensión angular (Tabla 2.1.21b. entrada 7) que en el resto de los ángulos, que sí son más próximos a 90° (Tabla 2.1.21b. entradas 5, 6 y 8).

Además de la distorsión del entorno plano cuadrado del metal, los ángulos $\text{Au}-\text{C}\equiv\text{C}$ también exhiben una ligera desviación de la linealidad típica 180° , especialmente en el caso $\text{Au}-\text{C}_{13}-\text{C}_{14}$ (Tabla 2.1.21b. entrada 2), que podría explicarse por la menor distancia observada en el enlace $\text{Au}-\text{C}_{22}$ (Tabla 2.1.21a. entrada 1); ya que esto indicaría que la densidad electrónica estaría más localizada en ese enlace que en el alquino.

Tabla 2.1.21. Datos cristalográficos más relevantes del complejo $[\text{Au}(\text{Tolilacetileno})_2\text{tpy}]$ (**24**).

a						Distancias (Å)					
1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
Au-C₂₂	Au-N₁	Au-C₁₃	Au-C₇	C₁₃-C₁₄	C₂₂-C₂₃	Au-C₂₂	Au-N₁	Au-C₁₃	Au-C₇	C₁₃-C₁₄	C₂₂-C₂₃
1.953(6)	2.032(3)	2.043(6)	2.049(4)	1.209(8)	1.202(9)						

b								Ángulos (°)							
1	2	3	4	5	6	7	8	1	2	3	4	5	6	7	8
Au-C₂₂-C₂₃	Au-C₁₃-C₁₄	C₂₂-Au-N₁	C₁₃-Au-C₇	C₂₂-Au-C₁₃	C₂₂-Au-C₇	N₁-Au-C₇	N₁-Au-C₁₃	Au-C₂₂-C₂₃	Au-C₁₃-C₁₄	C₂₂-Au-N₁	C₁₃-Au-C₇	C₂₂-Au-C₁₃	C₂₂-Au-C₇	N₁-Au-C₇	N₁-Au-C₁₃
177.7(6)	170.6(5)	173.7 (2)	173.7(2)	91.9(2)	92.7(2)	81.4(2)	94.1(2)								

Una vez aislados y caracterizados los complejos con unidades alquínico, se realizó un nuevo estudio de solubilidad en agua para evaluar su aplicación como fármaco. Los resultados se recogen en la Tabla 2.1.22:

Tabla 2.1.22. Solubilidad (mg/l) en agua de los complejos con unidades acetileno.

Compuesto	24	25	26	27
Solubilidad	102	142	197	220

Según los valores recogidos en la Tabla 2.1.22, los complejos $[Au(C\equiv CR)_2L]$ son ligeramente más solubles en agua que los que incorporan los derivados pirimidínicos, pero menos que los que contienen grupos acetato. Con base en este estudio se ha concluido que no sólo átomos capaces de generar enlaces de hidrógeno son suficientes para dotar de una buena solubilidad al complejo, sino que debe ser la conjunción de esta propiedad y el tamaño.

Además, se han estudiado las propiedades luminiscentes de estos derivados en disolución $5 \cdot 10^{-3}$ M en CH_2Cl_2 , y todos brillan en el color naranja. (ver anexos)

COMPLEJOS DE Au(I)

En la introducción ya se ha recogido que, a pesar de ser el mismo metal, el estado de oxidación tiene un marcado efecto en la química del Au. Mientras que el Au(III) es duro, el Au(I) tiene un carácter blando, por lo que tenderá a coordinarse con ligandos blandos como P-, o S-dadores. Esta tendencia se pone de manifiesto en el precursor de Au(I) utilizado generalmente: $[AuCl(tht)]$ (tht: tetrahidrotiofeno). La elección de este complejo de Au(I) como precursor reside en dos grandes ventajas, la primera es que el ligando tht tiene un carácter lábil que permite reemplazarlo por una gran variedad de nuevos grupos. La segunda de las ventajas es el hecho que tiene H visibles por RMN, lo que permite evaluar el éxito de la reacción, así como la pureza del producto formado.

Tal y como se ha comentado, la estabilización de compuestos de Au(I) mediante la coordinación de ligandos fosfano es ampliamente conocida, y se ha estudiado en el grupo mediante la realización de varias tesis doctorales, Trabajos Fin de Máster y de Grado.⁴⁸⁻⁵⁰ En ellos, se ha constatado esta estabilización, pero también se ha aprovechado para utilizar fosfanos hidrosolubles para conferir a los complejos esta propiedad. Entre los fosfanos utilizados destacan PTA, derivados PTA y HMPT. Sin embargo, la presente investigación se ha centrado en el fosfano HMPT ya que presenta una solubilidad en agua superior a la de los otros fosfanos sintetizados (Tabla 2.1.23).

Tabla 2.1.23. Solubilidad en agua (25°C) de algunos fosfanos utilizados en el grupo.⁵¹

Fosfano	PTA	[PTA-CH ₂ -pCOOH-C ₆ H ₄]Br	[PTA-CH ₂ -pCH ₂ COOH-C ₆ H ₄]Br	[PTA-CH ₂ -pNO ₂ -C ₆ H ₄]Br	[pybisPTA]Br ₂	[PTA-m-CH ₂ C ₆ H ₄ CH ₂ -PTA]Br ₂	HMPT
Solubilidad (g/l)	235	17.1	20.7	28.2	854	810	1000

A pesar de la gran solubilidad del fosfano seleccionado, éste tiene como inconveniente la baja estabilidad al aire en su forma libre, por lo que se han requerido condiciones de atmósfera controlada para la preparación del producto de partida.

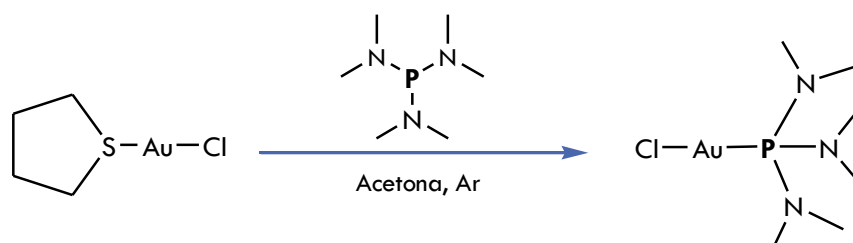


Figura 2.1.37. Esquema sintético para la obtención del producto de partida [AuCl(HMPT)].

El producto [AuCl(HMPT)] ya había sido aislado y caracterizado previamente por Schmidbauer *et al.* en 1997,⁵² pero en esta tesis se han cambiado las condiciones para utilizar el derivado [AuCl(tht)] en vez del derivado con dimetilsulfuro. Este cambio se justifica por el hecho de que el tht no tiene establecido un valor límite de exposición diaria (TLV), mientras que el dimetilsulfuro sí (TLV=10ppm).⁵³

Este complejo ha servido como producto de partida para la obtención de derivados con unidades tiol y acetiluro, mediante la desprotonación con KOH en medio etanólico. Así, los productos recogidos en la Figura 2.1.38, se sintetizaron bajo nuestra supervisión en los Trabajos Fin de Grado de R. Pena-Martinez y N. Espallargas.⁴⁸⁻⁴⁹

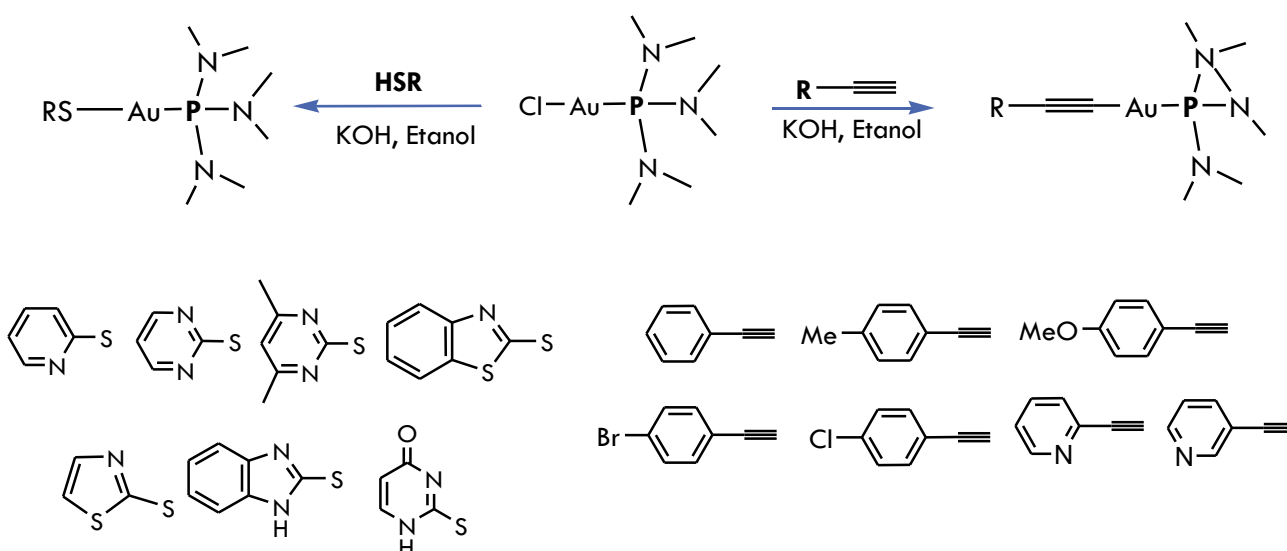


Figura 2.1.38. Esquema sintético para la obtención de derivados de Au(I) con el fosfano HMPT (28-41).

Así se aislaron y caracterizaron los siguientes complejos, donde resulta especialmente útil la $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -RMN para evaluar tanto la sustitución del Cl como la pureza del complejo. En todos los casos, se encontró una única señal en $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -RMN generada por el ligando HMPT, que presentaba un desplazamiento hacia campo bajo respecto del encontrado con el producto de partida. Este desapantallamiento se dio de forma más marcada para los derivados con unidades etinilo.

Tabla 2.1.24. Desplazamientos (ppm) encontrados en $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -RMN para los derivados de Au(I).

COMPLEJO	$^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ RMN (ppm)
[AuCl(HMPT)]	110.87
[Au(2-Mercaptopiridina) HMPT] 28	124.05
[Au(2-Mercaptopirimidina) HMPT] 29	124.05
[Au(2-Mercapto-4,6-Dimetilpirimidina) HMPT] 30	110.86
[Au(2-Mercaptobenzotiazol) HMPT] 31	121.06
[Au(2-Mercaptotiazolina) HMPT] 32	122.80
[Au(2-Mercaptobenzimidazol) HMPT] 33	120.78
[Au(2-Tiouracil) HMPT] 34	120.88
[Au(Fenilacetileno)HMPT] 35	133.46
[Au(Tolilacetileno) HMPT] 36	133.23
[Au(4-OMe-fenilacetileno) HMPT] 37	135.24
[Au(4-Br-fenilacetileno) HMPT] 38	133.24
[Au(4-Cl-fenilacetileno) HMPT] 39	133.18
[Au(2-etinilpiridina) HMPT] 40	133.12
[Au(3-etinilpiridina) HMPT] 41	132.92

Estos complejos de Au(I) fueron también caracterizado por el resto de técnicas habituales incluyendo difracción de Rayos X para algunos de los complejos:

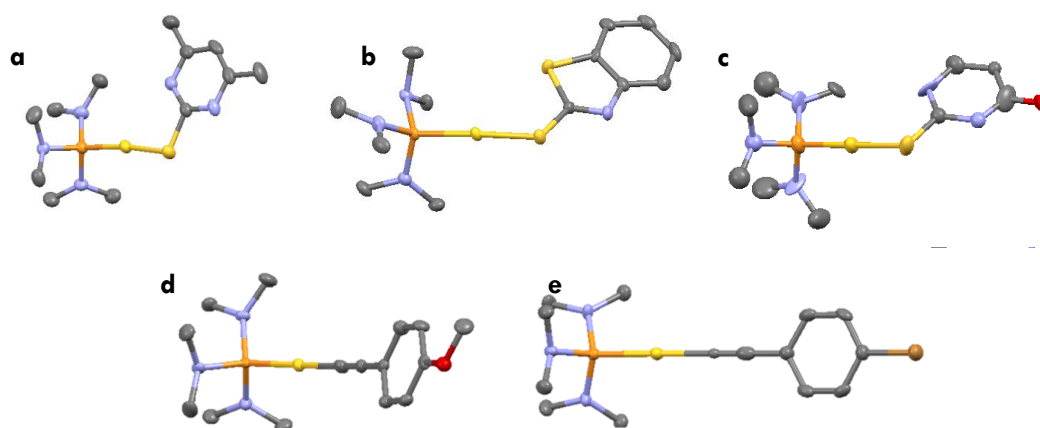


Figura 2.1.39. Estructuras cristalinas de los complejos [Au(2-Mercapto-4,6-Dimetilpirimidina)HMPT] **30** (a), [Au(2-Mercaptobenzotiazol)HMPT] **31** (b), [Au(2-Tiouracil) HMPT] **34** (c) [Au(4-OMe-fenilacetileno)HMPT] **37** (d) y [Au(Tolilacetileno)HMPT] **35** (e).

Las distancias y ángulos más relevantes de estas estructuras se encuentran recogidos en la Tabla 2.1.25. De entre las distancias detalladas, merece una especial atención la distancia Au-R, puesto que, a pesar de que la distancias Au-P es bastante similar entre los complejos con acetileno y tioles, las distancias Au-R son significativamente distintas. Las distancias Au-S de los complejos coinciden con las encontradas en la bibliografía,²¹ así como las distancias de los derivados acetileno.³⁸

En lo que respecta al ángulo Au-C≡C, se puede observar la ligera distorsión de la linealidad típica del Au(I), aunque el derivado con tolilacetileno presenta un ángulo de enlace muy próximo al valor ideal de 180°C. Algo similar ocurre con el ángulo de enlace Au-S-C, donde se observa perfectamente la geometría angular impuesta por el átomo de azufre.

Tabla 2.1.25. Distancias y enlaces representativos de los complejos: [Au(4-OMe-fenilacetileno)HMPT] **37**, [Au(Tolilacetileno)HMPT] **35**, [Au(2-Mercapto-4,6-Dimetilpirimidina)HMPT] **30**, [Au(2-Mercaptobenzotiazol)HMPT] **31** y [Au(2-Tiouracil) HMPT] **34**.

	[Au(4-OMe-Phacetileno)HMPT]	[Au(Tolilacetileno)HMPT]	[Au(4,6-DimetilSpym)HMPT]	[Au(2-S-benzotiazol)HMPT]	[Au(2-Tiouracil)HMPT]
Distancias (Å)					
Au-P	2.2731(3)	2.272(2)	2.2623(13)	2.2655(13)	2.252(6)
Au-R	2.006(6)	2.053(7)	2.3114(14)	2.3153(13)	2.319(6)
C≡C	1.194(8)	1.137(12)			
Ángulos (°)					
R-Au-P	173.56(16)	179.75(18)	173.35(5)	178.03(4)	179.2(2)
Au-C≡C	170.2(5)	179.3(7)			
C≡C-C	176.2(6)	179.9(9)			
Au-S-C			104.01(19)	102.93(15)	100.4(7)

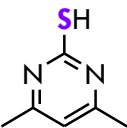
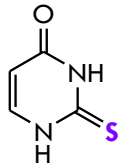
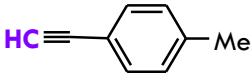
Una vez perfectamente caracterizados, se procedió al estudio de sus propiedades comenzando por cuantificar su solubilidad en agua.

Tabla 2.1.26. Solubilidad en agua (25°C) de los derivados de Au(I).

COMPLEJO	Solubilidad (mg/l)
[AuCl(HMPT)]	496.6
[Au(2-Mercaptopiridina) HMPT] 28	103.0
[Au(2-Mercaptopirimidina) HMPT] 29	180.2
[Au(2-Mercapto-4,6-Dimetilpirimidina) HMPT] 30	440.0
[Au(2-Mercaptobenzotiazol) HMPT] 31	141.1
[Au(2-Mercaptotiazolina) HMPT] 32	305.5
[Au(2-Mercaptobenzimidazol) HMPT] 33	184.7
[Au(2-Tiouracil) HMPT] 34	333.4
[Au(Fenilacetileno)HMPT] 35	150.6
[Au(Tolilacetileno) HMPT] 36	135.8
[Au(4-OMe-fenilacetileno) HMPT] 37	198.2
[Au(4-Br-fenilacetileno) HMPT] 38	95.6
[Au(4-Cl-fenilacetileno) HMPT] 39	101.7
[Au(2-etinilpiridina) HMPT] 40	236.4
[Au(3-etinilpiridina) HMPT] 41	280.7

Según estos valores, se comprueba que los complejos de Au(I), a pesar de introducir un fosfano tan soluble como HMPT; no presentan una solubilidad en agua mucho mayor que los derivados de Au(III). Si se compara los derivados análogos de Au(I) y Au(III) se puede observar como los complejos de Au(III) son hasta dos veces más solubles en medio acuoso, que los sintetizados con Au(I):

Tabla 2.1.27. Estudio de la solubilidad en función del estado de oxidación del metal Au(I) y Au(III).

S° (mg/l)			
[AuXL] L: HMPT	440	333	135
[AuX ₂ L] L: tpy	870	730	102

BIBLIOGRAFÍA

1. ADMET for medicinal chemists: A Practical Guide. John Wiley & Sons: 2010.
2. Lipinski, C. A.; Lombardo, F.; Dominy, B. W.; Feeney, P. J., Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Deliv Rev* **2001**, *46* (1-3), 3-26.
3. Fernandez-Cestau, J.; Bertrand, B.; Blaya, M.; Jones, G. A.; Penfold, T. J.; Bochmann, M., Synthesis and luminescence modulation of pyrazine-based gold(III) pincer complexes. *Chemical Communications* **2015**, *51* (93), 16629-16632.
4. Meyer, N.; Sivanathan, S.; Mohr, F., Transfer of organic groups to gold using organotin compounds. *Journal of Organometallic Chemistry* **2011**, *696*, 3.
5. Nonoyama, M.; Nakajima, K., Direct cycloauration of 1-(2-pyridylamino and 2-pyrimidinylamino)naphthalene and 2-(p-toluidino)quinoline with sodium tetrachloroaurate(III). *Transition Metal Chemistry* **1999**, *24* (4), 449-453.
6. Fuchita, Y.; Ieda, H.; Wada, S.; Kameda, S.; Mikuriya, M., Organogold(III) complexes derived from auration reactions of thienyl-substituted pyridine derivatives. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **1999**, *0*, 4.
7. Parish, R. V.; Mack, J.; Hargreaves, L.; Wright, J. P.; Buckely, R. G.; Elsome, A. M.; Fricker, S. P.; Theobald, B. R., Chemical and biological reactions of diacetato[2-(dimethylaminomethyl)-phenyl]gold(III), [Au(O₂CMe)₂(dmamp)]. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **1996**, *0*, 5.
8. Cinellu, M. A.; Zucca, A.; Stoccoro, S.; Minghetti, G.; Manassero, M.; Sansoni, M., Synthesis and characterization of gold(III) adducts and cyclometallated derivatives with 6-benzyl- and 6-alkyl-2,2'-bipyridines. *Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions* **1996**, (22), 4217-4225.
9. Colom, E. Aplicación de derivados ortometalados de Au(III). Trabajo Fin de Master, 2015.
10. Gomez-Bachiller, M. Ligandos y complejos metálicos solubles en agua: Síntesis, estructuras y propiedades biológicas. Trabajo Fin de Grado, Universidad de Zaragoza, 2017.
11. Cattalini, L.; Clark, R. J. H.; Orio, A.; Poon, C. K., The Infrared Spectra (450-70 cm⁻¹) of Square Planar Pyridine and Substituted Pyridine Complexes of Gold(III) *Inorganica Chimica Acta* **1968**, *2*, 3.
12. Ryabov, A. D.; Sakodinskaya, I. K.; Yatsimirsky, A. K., Kinetics and mechanism of ortho-palladation of ring-substituted NN-dimethylbenzylamines. *Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions* **1985**, (12), 2629-2638.
13. Ryabov, A. D., Mechanisms of intramolecular activation of carbon-hydrogen bonds in transition-metal complexes. *Chemical Reviews* **1990**, *90* (2), 403-424.
14. Davies, D. L.; Donald, S. M. A.; Macgregor, S. A., Computational Study of the Mechanism of Cyclometallation by Palladium Acetate. *Journal of the American Chemical Society* **2005**, *127* (40), 13754-13755.
15. Parish, R. V., Organogold chemistry: I structure and synthesis. *Gold Bulletin* **1997**, *30* (1), 3-12.
16. Janzen, D. E.; Doherty, S. R.; VanDerveer, D. G.; Hinkle, L. M.; Benefield, D. A.; Vashi, H. M.; Grant, J. G., Cyclometallated gold(III) complexes with a trithiacrown ligand: Solventless Au(III) cyclometallation, intramolecular gold-sulfur interactions, and fluxional behavior in 1,4,7-trithiacyclononane Au(III) complexes. *Journal of Organometallic Chemistry* **2014**, *755*, 10.
17. Henderson, W.; Nicholson, B. K.; Faville, S. J.; Fan, D.; Ranford, J. D., Gold(III) thiosalicylate complexes containing cycloaurated 2-arylpyridine, 2-anilinopyridine and 2-benzylpyridine ligands. *Journal of Organometallic Chemistry* **2001**, *631* (1-2), 5.
18. Constable, E. C.; Leese, T. A., Cycloaurated derivatives of 2-phenylpyridine. *J. Organomet. Chem.* **1984**, *363* (3), 5.
19. Brandon, J. Síntesis de compuestos organometálicos de metales nobles con posible aplicación en química médica. Trabajo Fin de Grado, Universidade da Coruña, 2014.
20. Parish, R. V.; Wright, J. P.; Pritchard, R. G., Mercury(II) and gold(III) derivatives of 2-phenylpyridines and 2-phenyl-4-(methylcarboxylato)quinoline. *Journal of Organometallic Chemistry* **2000**, *596* (1-2), 11.
21. Bertrand, B.; Spreckelmeyer, S.; Bodio, E.; Cocco, F.; Picquet, M.; Richard, P.; Le Gendre, P.; Orvig, C.; Cinellu, M. A.; Casini, A., Exploring the potential of gold(III) cyclometallated compounds as cytotoxic agents: variations on the C^N theme. *Dalton Trans* **2015**, *44* (26), 11911-8.
22. Longley, D. B.; Harkin, D. P.; Johnston, P. G., 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nat Rev Cancer* **2003**, *3* (5), 330-8.

23. Rose, M. G.; Farrell, M. P.; Schmitz, J. C., Thymidylate synthase: a critical target for cancer chemotherapy. *Clin Colorectal Cancer* **2002**, 1 (4), 220-9.
24. Thomas, G., *Medicinal Chemistry, an introduction*. Wiley 2000; Vol. 1, p 517.
25. Nobili, S.; Mini, E.; Landini, I.; Gabbiani, C.; Casini, A.; Messori, L., Gold compounds as anticancer agents: chemistry, cellular pharmacology, and preclinical studies. *Med Res Rev* **2010**, 30 (3), 550-80.
26. Shakeel, A.; Altaf, A. A.; Quershi, A. M.; Badshah, A., Thiourea Derivatives in Drug Design and Medicinal Chemistry: A Short Review. *Journal of Drug Design and Medicinal Chemistry* **2016**, 2 (1), 10.
27. Buckley, R. G.; Elsome, A. M.; Fricker, S. P.; Henderson, G. R.; Theobald, B. R.; Parish, R. V.; Howe, B. P.; Kelland, L. R., Antitumor properties of some 2-[(dimethylamino)methyl]phenylgold(III) complexes. *J Med Chem* **1996**, 39 (26), 5208-14.
28. Fan, D.; Yang, C. T.; Ranford, J. D.; Lee, P. F.; Vittal, J. J., Chemical and biological studies of the dichloro(2-phenylpyridine) gold(III) complex and its derivatives. *Dalton Trans* **2003**, 0, 5.
29. Palacio, E. G., Infrared spectroscopy of metal carboxylates: II. Analysis of Fe(III), Ni and Zn carboxylate solutions. *Hydrometallurgy* **2004**, 72, 9.
30. Colthup, N.; Daly, L.; Wiberley, S., *Introduction to Infrared and Raman Spectroscopy*. 3rd ed.; 1990; p 547.
31. Nakamoto, K., *Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds*. 6th ed.; 2009; Vol. Part B: Applications in Coordination, Organometallic, and Bioinorganic Chemistry.
32. Canellos, G. P.; Pocock, S. J.; Taylor, S. G., 3rd; Sears, M. E.; Klaasen, D. J.; Band, P. R., Combination chemotherapy for metastatic breast carcinoma. Prospective comparison of multiple drug therapy with L-phenylalanine mustard. *Cancer* **1976**, 38 (5), 1882-6.
33. Lai, H. S.; Lee, J. C.; Lee, P. H.; Wang, S. T.; Chen, W. J., Plasma free amino acid profile in cancer patients. *Semin Cancer Biol* **2005**, 15 (4), 267-76.
34. Wiggins, T.; Kumar, S.; Markar, S. R.; Antonowicz, S.; Hanna, G. B., Tyrosine, Phenylalanine, and Tryptophan in Gastroesophageal Malignancy: A Systematic Review. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* **2015**, 24 (1), 6.
35. Hoffman, R. M., Methionine dependence in cancer cells - a review. *In Vitro* **1982**, 18 (5), 421-8.
36. Hoffman, R. M., Altered methionine metabolism, DNA methylation and oncogene expression in carcinogenesis. A review and synthesis. *Biochim Biophys Acta* **1984**, 738 (1-2), 49-87.
37. Garg, J. A.; Blacque, O.; Venkatesan, K., Syntheses and photophysical properties of luminescent mono-cyclometalated gold(III) cis-dialkynyl complexes. *Inorg Chem* **2011**, 50 (12), 5430-41.
38. Wong, K. M.; Hung, L. L.; Lam, W. H.; Zhu, N.; Yam, V. W., A class of luminescent cyclometalated alkynylgold(III) complexes: synthesis, characterization, and electrochemical, photophysical, and computational studies of [Au(C=N=C)(C triple bond C-R)] (C=N=C = kappa(3)C,N,C bis-cyclometalated 2,6-diphenylpyridyl). *J Am Chem Soc* **2007**, 129 (14), 4350-65.
39. Yam, V. W.; Wong, K. M.; Hung, L. L.; Zhu, N., Luminescent gold(III) alkynyl complexes: synthesis, structural characterization, and luminescence properties. *Angew Chem Int Ed Engl* **2005**, 44 (20), 3107-10.
40. Vergara, E.; Cerrada, E.; Casini, A.; Zava, O.; Laguna, M.; Dyson, P. J., Antiproliferative Activity of Gold(I) Alkyne Complexes Containing Water-Soluble Phosphane Ligands. *Organometallics* **2010**, 29 (11), 7.
41. Lu, W.; Mi, B. X.; Chan, M. C.; Hui, Z.; Che, C. M.; Zhu, N.; Lee, S. T., Light-emitting tridentate cyclometalated platinum(II) complexes containing sigma-alkynyl auxiliaries: tuning of photo- and electrophosphorescence. *J Am Chem Soc* **2004**, 126 (15), 4958-71.
42. Hemmert, C.; Gornitzka, H., Luminescent bioactive NHC-metal complexes to bring light into cells. *Dalton Trans* **2016**, 45 (2), 440-7.
43. Wenzel, M.; de Almeida, A.; Bigaeva, E.; Kavanagh, P.; Picquet, M.; Le Gendre, P.; Bodio, E.; Casini, A., New Luminescent Polynuclear Metal Complexes with Anticancer Properties: Toward Structure-Activity Relationships. *Inorg Chem* **2016**, 55 (5), 2544-57.
44. Visbal, R.; Fernandez-Moreira, V.; Marzo, I.; Laguna, A.; Gimeno, M. C., Cytotoxicity and biodistribution studies of luminescent Au(I) and Ag(I) N-heterocyclic carbenes. Searching for new biological targets. *Dalton Trans* **2016**, 45 (38), 15026-33.
45. Zhang, J.; Fu, Y.; Conroy, C. V.; Tang, Z.; Li, G.; Zhao, R. Y.; Wang, G., Fluorescence Intensity and Lifetime Cell Imaging with Luminescent Gold Nanoclusters. *J Phys Chem C Nanomater Interfaces* **2012**, 116 (50).
46. Reichardt, C., *Solvents and Solvent Effects in Organic Chemistry*. 3rd ed.; Wiley-VCH Publishers: 2003.
47. Sykes, P., *Mecanismos de reacción en química orgánica*. 1985.

48. Espallargas, N. Diseño de ligandos y complejos metálicos solubles en agua como agentes terapéuticos contra cáncer y alzheimer. Trabajo Fin de Grado, Universidad de Zaragoza, 2017.
49. Pena-Martínez, R. Ligandos y complejos metálicos solubles en agua: Síntesis, estructura y propiedades biológicas. Trabajo Fin de Grado, Universidad de Zaragoza, 2016.
50. Atrián-Blasco, E. Síntesis dirigida de complejos de oro solubles en agua. Trabajo Fin de Máster, Universidad de Zaragoza, 2012.
51. Atrián-Blasco, E. Síntesis dirigida de compuestos metálicos solubles en agua en función de sus aplicaciones biomédicas. Universidad de Zaragoza, 2015.
52. Bauer, A.; Mitzel, N. W.; Schier, A.; Schmidbaur, H.; Rankin, D. W. H., Tris(dimethylamino)phosphane as a New Ligand in Gold(I) Chemistry: Synthesis and Crystal Structures of $[(\text{Me}_2\text{N})_3\text{P}]\text{AuCl}$, $\{[(\text{Me}_2\text{N})_3\text{PAu}]_3\text{O}\}^+\text{BF}_4^-$, $\{[(\text{Me}_2\text{N})_3\text{PAu}]_3\text{NP}(\text{NMe}_2)_3\}^{2+}$ $\{\text{BF}_4\}^-_2$ and the Precursor Molecule $(\text{Me}_2\text{N})_3\text{PNSiMe}_3$. *Chemische Berichte* **1997**, 30 (4), 5.
53. trabajo, l. n. d. s. e. h. e. e.
<http://www.insht.es/InshtWeb/Contenidos/Documentacion/FichasTécnicas/FISQ/Ficheros/801a900/nspn0878.pdf> (accessed June 2018).

Capítulo II: Discusión de resultados

PARTE II: APLICACIÓN COMO ANTITUMORALES

DISCUSIÓN DE RESULTADOS (II): ESTUDIOS BIOLÓGICOS

ESTUDIOS FARMACODINÁMICOS

La determinación de la actividad antitumoral de los complejos sintetizados recogidos en la parte (I) de la discusión de resultados, así como los estudios sobre sus mecanismos de acción, se han realizado en la línea celular de adenocarcinoma de colon humano (línea Caco-2). Esta línea fue establecida por Fogh *et al.* en 1974,¹ se trata de una línea muy heterogénea y fuertemente dependiente de las condiciones de cultivo.²⁻⁴

Sin embargo, la principal característica de esta línea celular es que es la única línea de cáncer de colon que experimenta una diferenciación enterocítica espontánea en condiciones de cultivo normales al alcanzar la confluencia.⁵ Es decir, que cuando las células son cultivadas presentan una morfología indiferenciada que se mantiene durante la fase de crecimiento exponencial (Figura 2.2.1a); pero que una vez se alcanza la confluencia celular, estas células se diferencian permaneciendo con la misma morfología durante su fase estacionaria, donde las células ya no se dividen y su número permanece constante (Figura 2.2.1b).

Después de un tiempo de cultivo superior a 15 días, estas células diferenciadas forman una monocapa de células polarizadas con microvellosidades en su parte apical y uniones estrechas en su porción basolateral que se mantiene constante en el tiempo (Figura 2.2.1c). Estas características entre otras, son típicas de células epiteliales intestinales sanas.

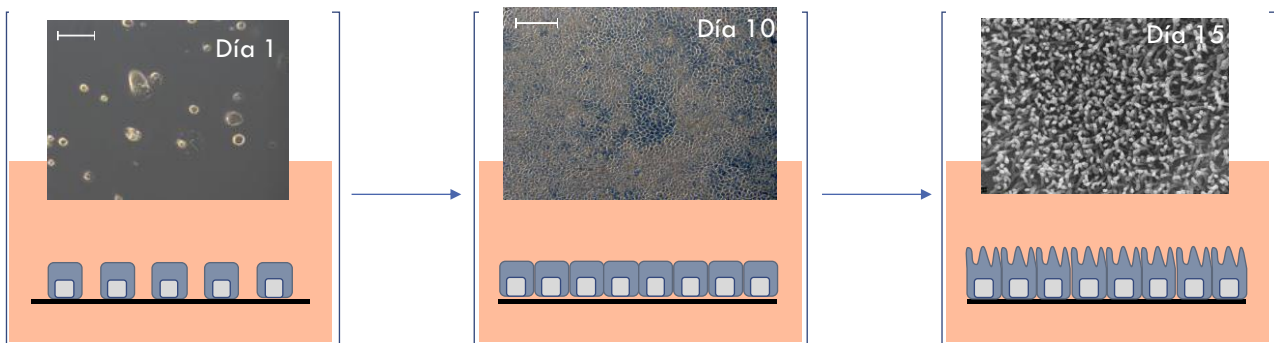


Figura 2.2.1. Esquema de la diferenciación de las células Caco-2 a lo largo del tiempo.

La selección de esta línea celular como modelo de cáncer de colon *in vitro* para estudios de citotoxicidad es bastante común por su naturaleza tumoral pero, puesto que cuando se alcanza la diferenciación celular tiene características de epitelio intestinal, también es indicada para estudios de toxicidad en tejido intestinal sano.⁶ No obstante, esta línea presenta un inconveniente, su marcada heterogeneidad en cuanto a morfología, expresión de proteínas y a su organización en borde de cepillo. Además, también se ha encontrado que esta heterogeneidad es dependiente del pasaje celular. Por ello, se han aislado las poblaciones homogéneas de células Caco-2, y se trabaja mediante clonación de las mismas. Los diferentes clones tienen importantes diferencias entre ellos y son precisamente las diferentes características las que permiten su clasificación.

Los clones de la línea celular Caco-2 se clasifican en función de la expresión de la sacarosa-isomaltosa (SI), estructura de borde de cepillo, transporte y actividad de biotransformación.⁷ De esta forma, se distinguen los siguientes clones:

Tabla 2.2.1. Características de los clones derivados de la línea celular Caco-2.⁷

Clon	Origen	Características
Caco-2/40	Imperial College de Londres	Expresión homogénea del transportador de ácido taurocólico.
Caco-2/BBE 1&2	Caco-2/ATCC	Expresión en borde de cepillo más homogénea y comparable con enterocitos humanos.
Caco-2/16	Caco-2/ATCC	Alta expresión de sacarosa-isomaltosa.
Caco-2/AQ	Caco-2/15	Mayores valores de fosfatasa alcalina que Caco-2/15.
Caco-2/PD7	Caco-2 pasajes tempranos	Expresión homogénea de sacarosa-isomaltosa
Caco-2/PD10		
Caco-2/PF11		
Caco-2 /TC7	Caco-2 pasajes tardíos	Alta expresión de sacarosa-isomaltosa y bajo consumo de glucosa. Altos niveles del transportador de ácido taurocólico. Aumento de la expresión de los transportadores de monosacáridos SGLT1, GLUT2 y GLUT5 que aumenta con el tiempo de cultivo. Descenso en la expresión de los transportadores de monosacáridos GLUT1 y GLUT3 en células en crecimiento, tras darse la confluencia. Expresión del citocromo CYP3A5 y expresión estable del citocromo CYP3A4. Alta actividad de las enzimas UDP-GST. Elevada inducibilidad del gen del citocromo P450IA1 por la b-naftoflavona.

En los estudios realizados a lo largo de esta investigación, se ha utilizado el clon TC7 derivado de la línea parental Caco-2 (Tabla 2.2.1), dado que posee un excelente grado de caracterización bioquímica, así como de diferenciación morfológica y funcional de tipo enterocitario: crecimiento en monocapa, morfología de célula cilíndrica polarizada con microvellosidades en la parte apical, uniones estrechas entre células, y las enzimas típicas de un enterocito. Estudios más detallados sobre este clon demuestran que presenta uniones intercelulares más desarrolladas, así como una mayor homogeneidad que su línea parental Caco-2,⁸ lo que se traduce en una mayor robustez de los resultados.

ESTUDIOS DE VIABILIDAD CELULAR Y DETERMINACION DE IC₅₀

Con el objetivo final de buscar una aplicación biológica a los derivados de Au sintetizados a lo largo de esta investigación, se realizaron, en primer lugar, estudios para cuantificar la viabilidad celular de las células Caco-2 tras su tratamiento con los diferentes complejos de Au, para posteriormente determinar la IC₅₀ de cada compuesto.

El parámetro IC₅₀ hace referencia a la concentración de un inhibidor enzimático, en este caso un fármaco, necesaria para inhibir el crecimiento de la población celular a la mitad. Así pues, cuanto menor es el valor IC₅₀, más efectiva es la molécula utilizada; lo que significa que la dosis necesaria para mostrar un efecto inhibitorio es menor. Esto además se relaciona con menores efectos secundarios, así como con una menor toxicidad para los tejidos sanos.

En la bibliografía se recogen numerosos estudios para determinar la viabilidad celular entre los que destacan la reducción de la sal tetrazolio (MTT), reducción de la sal sódica de resazurina, marcadores de proteasa y detección de ATP. Para la realización de todos estos ensayos, se requiere la incubación del reactivo propio de la técnica con una población de células viables para convertir el sustrato en un producto coloreado o fluorescente que se puede detectar con un lector de placas. De esta forma, la formación de ese producto y también la señal resultante es proporcional al número de células viables presentes. Esto es así porque, cuando las células mueren, pierden rápidamente la capacidad de convertir el sustrato en producto. El ensayo de ATP es algo diferente ya que la adición del reactivo de ensayo rompe inmediatamente las células, por lo que no hay un período de incubación del reactivo con una población celular viable.

El método utilizado para estudiar la viabilidad celular a lo largo de esta investigación, ha sido el ensayo de MTT,⁹ que se basa en la reducción metabólica de (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio bromuro) tetrazolio (MTT), mediada por NADH, en formazán. Se trata de una técnica colorimétrica, en la que el reactivo MTT de color amarillo, evoluciona al producto formazán, que es de color azul-púrpura. Este último es un compuesto insoluble que precipita en el interior de las células y en la superficie; por lo que antes de realizar la lectura debe solubilizarse. Se ha utilizado DMSO como disolvente, aunque existen otras opciones.

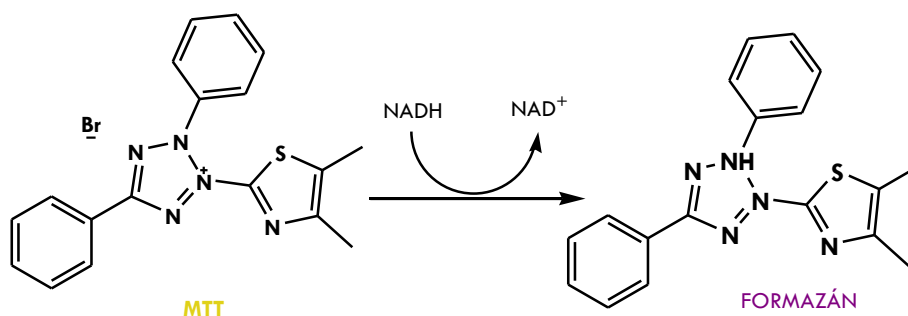


Figura 2.2.2. Reducción metabólica de MTT a formazán.

El tiempo de incubación con el reactivo MTT se ha fijado a 2 horas y media para todos los análisis. Este parámetro es importante porque al tratarse de un proceso metabólico, la cantidad de formazán formado va a ser directamente proporcional al tiempo de exposición. No obstante, el tiempo también está limitado por la toxicidad que se deriva del consumo de NADH.¹⁰

Además de determinar el efecto de los complejos de Au sobre la viabilidad de células tumorales, es conveniente comprobar, para el correcto desarrollo de un nuevo fármaco, que no presenta toxicidad alguna

sobre las células normales. Por ello, se han realizado de forma paralela dos experimentos de MTT en distintos estados de confluencia:

- 80% de confluencia, cuando las células se consideran cancerígenas. Así estas células son tratadas con los complejos 48 h después de su siembra.
- 100% de confluencia, cuando las células presentan una morfología similar al epitelio intestinal y que, por tanto, se pueden considerar células normales. El tratamiento en este caso se realiza tras 12 días después de su siembra.

Así pues, y siguiendo el protocolo establecido para el ensayo MTT (ver Parte experimental), se incubaron las células Caco-2 durante 72 h con los complejos de Au(III) y Au(I) a diferentes concentraciones: 0, 1, 5, 10, 15 y 20 μM , en los dos experimentos.

Para un mejor análisis de los resultados obtenidos, se han utilizado los complejos auranofin y *cis*-Pt como referencia. El auranofin es un complejo lineal de Au(I) que ha demostrado actividad *in vitro* contra una amplia gama de líneas celulares de cáncer,¹¹ y efecto antitumoral *in vivo* contra la leucemia linfocítica de ratón (leucemia P388).¹² El uso de *cis*-Pt se ha seleccionado por ser el fármaco metálico más conocido y utilizado en el tratamiento del cáncer de colon.

COMPLEJOS DE Au(I)

Todos los complejos testados de Au(I) con residuos tiolato inhibieron la viabilidad de las células tumorales de manera concentración dependiente, tal como se muestra en la Figura 2.2.3. No obstante, cuando se testaron estos complejos en células normales, dos de los complejos: ([Au(2-Mercaptobenzimidazol)HMPT] y [Au(2-Tiouracil)HMPT]), no mostraron efecto significativo sobre la viabilidad celular. Esta selectividad les hace a estos dos últimos, buenos candidatos para su aplicación como antitumorales.

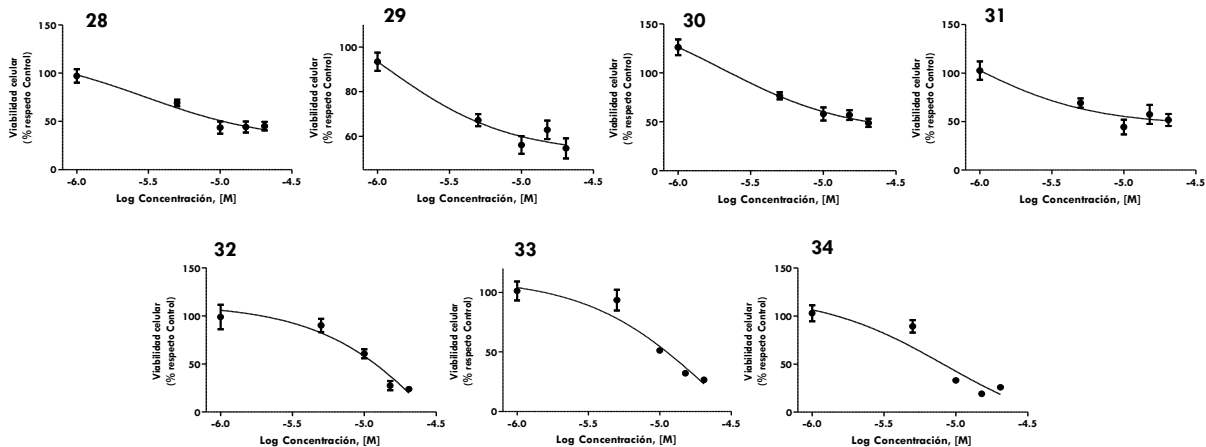


Figura 2.2.3. Curvas dosis-respuesta de los complejos [Au(SR)(HMPT)] en células Caco-2 tumorales (5 d). Los datos se expresan como la media \pm EEM y n=16 experimentos. Se utilizó un test ANOVA de 1 vía y un post-análisis de comparación múltiple Bonferroni para comparar los efectos de las diferentes concentraciones del compuesto respecto del control (***) $p < 0.0001$ para 28-30, 32-34; *) $p < 0.01$ para 31).

En la Tabla 2.2.2, se recogen los resultados de los valores de IC_{50} obtenidos para los complejos de Au(I) [Au(SR)(HMPT)] para los experimentos realizados sobre las Caco-2 tumorales y normales.

Tabla 2.2.2. Valores de IC_{50} (μM) de los derivados de [Au(SR)(HMPT)].

Compuesto	IC_{50} en células tumorales	IC_{50} en células normales
Cis-Pt	45.6±8.08	
Auranofin	2.10±0.40	
[Au(2-Mercaptopiridina)HMPT] 28	3.87±0.15	10.5±0.07
[Au(2-Mercaptopirimidina) HMPT] 29	3.08±0.14	5.14±0.08
[Au(2-Mercapto-4,6-Dimetilpirimidina) HMPT] 30	3.17±0.10	8.81±0.09
[Au(2-Mercaptobenzotiazol) HMPT] 31	3.16±0.20	11.3±0.08
[Au(2-Mercaptotiazolina) HMPT] 32	7.40±0.10	10.1±0.14
[Au(2-Mercaptobenzimidazol) HMPT] 33	4.50±0.10	<u>Sin efecto</u>
[Au(2-Tiouracil) HMPT] 34	4.55±0.11	<u>Sin efecto</u>

Los datos se expresan como la media \pm EEM y $n \geq 12$ experimentos.

El complejo menos efectivo de los que incorporan un grupo tiol fue el [Au(2-Mercaptotiazolina) HMPT] con una IC_{50} de $7.40 \pm 0.10 \mu M$, mientras que el más efectivo fue el [Au(2-Mercaptopirimidina) HMPT] con una IC_{50} de $3.08 \pm 0.14 \mu M$. Por otra parte, todos los complejos testados demostraron ser menos efectivos que el auranofin con una IC_{50} de $2.10 \pm 0.40 \mu M$, pero más efectivos que el cis-Pt con una IC_{50} de $45.6 \pm 8.08 \mu M$.

Cuando se testaron los complejos en células normales, sólo los complejos subrayados **33** y **34**, no tuvieron efecto sobre la viabilidad celular. Por ello, y a pesar de que no son los más citotóxicos para las células tumorales, son éstos los compuestos que se seleccionaron para realizar estudios más exhaustivos.

De la misma forma se procedió con los complejos de Au(I) unidades alquínico, [Au(C \equiv CR)(HMPT)]. Sorprendentemente, se puede observar que cuando se utilizan grupos acetiluro en vez de grupos tiol, se mejora considerablemente la selectividad de los complejos, ya que todos estos complejos afectan a la viabilidad de las células tumorales (Figura 2.2.4), pero sólo el complejo **36** tiene efecto citotóxico sobre células epiteliales normales.

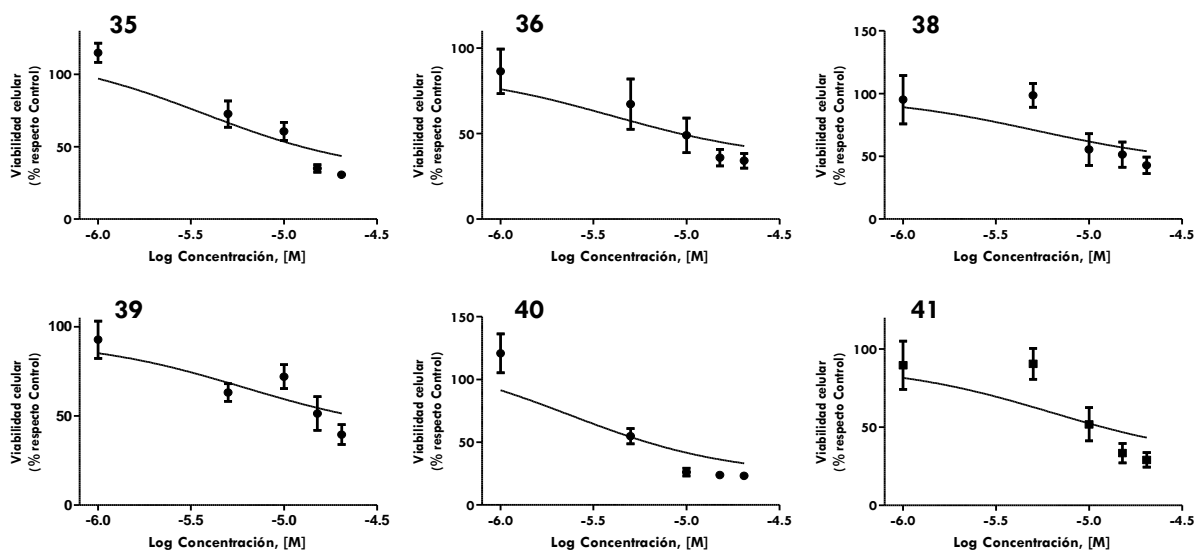


Figura 2.2.4. Curvas dosis-respuesta de los complejos $[\text{Au}(\text{C}\equiv\text{CR})(\text{HMPT})]$ en células Caco-2 tumorales (5 d). Los datos se expresan como la media \pm EEM y $n=16$ experimentos. Se utilizó un test ANOVA de 1 vía y un post-análisis de comparación múltiple Bonferroni para comparar los efectos de las diferentes concentraciones del compuesto respecto del control (***) $p < 0.001$ para **35-41**)

En la Tabla 2.2.3, se recogen los valores de IC_{50} obtenidos para los complejos con estructura $[\text{Au}(\text{C}\equiv\text{CR})(\text{HMPT})]$.

Tabla 2.2.3. Valores de IC_{50} (μM) de los derivados de $[\text{Au}(\text{C}\equiv\text{CR})(\text{HMPT})]$.

Compuesto	IC_{50} en células tumorales	IC_{50} en células normales
cis-Pt	45.6 ± 8.08	
Auranofin	2.10 ± 0.4	
$[\text{Au}(\text{Fenilacetileno})\text{HMPT}]$ 35	3.72 ± 0.08	Sin efecto
$[\text{Au}(\text{Tolilacetileno})\text{HMPT}]$ 36	4.02 ± 0.18	14.4 ± 0.09
$[\text{Au}(4\text{-Br-fenilacetileno})\text{HMPT}]$ 38	5.25 ± 0.21	Sin efecto
$[\text{Au}(4\text{-Cl-fenilacetileno})\text{HMPT}]$ 39	6.14 ± 0.14	Sin efecto
$[\text{Au}(2\text{-etinilpiridina})\text{HMPT}]$ 40	2.33 ± 0.10	Sin efecto
$[\text{Au}(3\text{-etinilpiridina})\text{HMPT}]$ 41	6.26 ± 0.15	Sin efecto

Los datos se expresan como la media \pm EEM y $n \geq 12$ experimentos.

El complejo más efectivo de este grupo fue el **40** con una IC_{50} de $2.33 \pm 0.10 \mu\text{M}$, mientras que el menos efectivo fue el **41** con una IC_{50} de $6.26 \pm 0.15 \mu\text{M}$. Al igual que con los complejos que llevan tiol, los complejos con grupos acetiluro son más efectivos que el cis-Pt, pero menos efectivos que el auranofin, aunque el complejo **40** tiene una IC_{50} similar a la del auranofin. Por todo ello, para los siguientes estudios se seleccionaron todos los complejos, a excepción del $[\text{Au}(\text{Tolilacetileno})\text{HMPT}]$ **36**, que tuvo efecto citotóxico sobre las células sanas.

RELACIÓN ESTRUCTURA-ACTIVIDAD: ESTUDIOS SAR

El hecho de que se hayan sintetizado estas familias de Au(I) y Au(III) se ha visto motivado por el intento de realizar estudios SAR con los que poder relacionar la actividad con la estructura y así, intentar elucidar la parte activa de la molécula, denominada farmacóforo.

De esta forma, si se comparan los complejos [Au(fenilacetileno)HMPT] **35** y [Au(tolilacetileno)HMPT] **36**, se puede observar la influencia de la estructura sobre la actividad citotóxica. No sólo el complejo con la unidad fenilacetileno resulta más activo que el que contiene tolilacetileno, sino que además es más selectivo, puesto que no presenta efecto sobre células normales. La única diferencia estructural reside en la presencia del grupo metilo, que aumenta el tamaño final del complejo y con ello su lipofilidad. Esto se traduce en una mayor penetrabilidad en las membranas celulares,¹³ lo que podría favorecer el efecto inhibitorio del complejo [Au(Tolilacetileno) HMPT], en las células normales.

Valorando los resultados de los estudios en células tumorales y sanas, los productos seleccionados para profundizar en el estudio de su mecanismo de acción fueron los siguientes:

Tabla 2.2.4. Valores de IC₅₀ (µM) de los derivados de [Au(X)(HMPT)] seleccionados.

Compuesto	IC ₅₀ en células tumorales	IC ₅₀ en células normales	Código
[Au(Fenilacetileno)HMPT]	3.72±0.08	Sin efecto	35
[Au(4-Br-fenilacetileno)HMPT]	5.25±0.21	Sin efecto	38
[Au(4-Cl-fenilacetileno)HMPT]	6.14±0.14	Sin efecto	39
[Au(2-etinilpiridina)HMPT]	2.33±0.10	Sin efecto	40
[Au(3-etinilpiridina)HMPT]	6.26±0.15	Sin efecto	41
[Au(2-Mercaptobenzimidazol)HMPT]	4.50±0.10	Sin efecto	33
[Au(2-Tiouracil)HMPT]	4.55±0.11	Sin efecto	34

Los datos se expresan como la media ± EEM y n ≥ 12 experimentos.

Según los valores de la Tabla 2.2.4, y como se ha descrito anteriormente, todos los complejos de Au(I) seleccionados presentan valores inferiores al *cis*-Pt para esta línea tumoral, y aunque no mejoran los valores del auranofin, la selectividad de estos complejos es buena, puesto que no son citotóxicos para las células normales incluso a concentraciones 5 veces superiores a su IC₅₀.

COMPLEJOS DE Au(III)

Este mismo estudio se ha realizado con todos los cicloauratos sintetizados a lo largo de esta investigación **1-27**; donde se pudo observar que los complejos de Au(III), **5, 10, 12, 20 y 24** tenían efecto sobre la viabilidad de las células Caco-2 tumorales (Figura 2.2.5). Sin embargo, los compuestos **1-4, 6-9, 11, 13-19, 21-23, 25-27**; no mostraron efecto citotóxico sobre estas células.

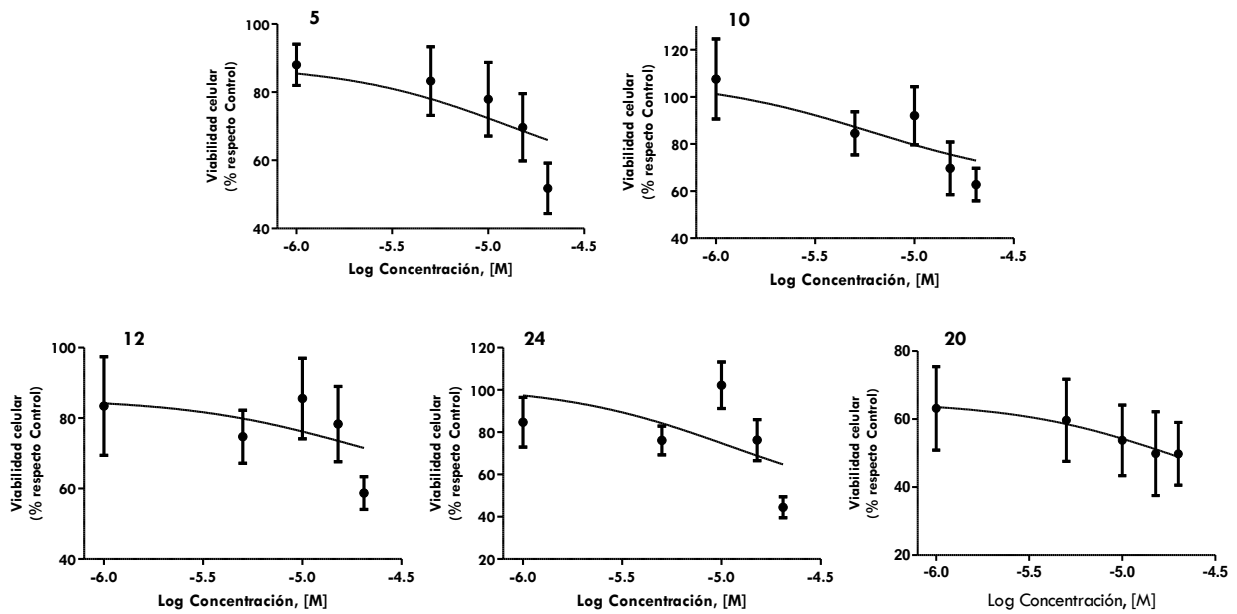


Figura 2.2.5. Curvas dosis-respuesta de los complejos $[\text{Au}(X)(\text{CN})]$ en células Caco-2 tumorales (5 d). Los datos se expresan como la media \pm EEM y $n \geq 12$ experimentos. Se utilizó un test ANOVA de 1 vía y un post-análisis de comparación múltiple Bonferroni para comparar los efectos de las diferentes concentraciones del compuesto respecto del control ($***p < 0.05$ para **12**, $**p < 0.05$ para **5, 20** y $*p < 0.05$ para **10, 24**).

No obstante, cabe destacar que algunos de estos complejos, también mostraron efecto citotóxico sobre células Caco-2 normales, tal y como se puede observar en sus curvas dosis-respuesta (Figura 2.2.6). En concreto, los compuestos **10, 12, 20, 23** y **26** afectaron a la viabilidad de las células Caco-2 normales, por lo que se descartaron para su aplicación como antitumorales. Por otro lado, los compuestos **1-9, 11, 13-19, 21-22, 25** y **27** no mostraron efecto sobre las células normales.

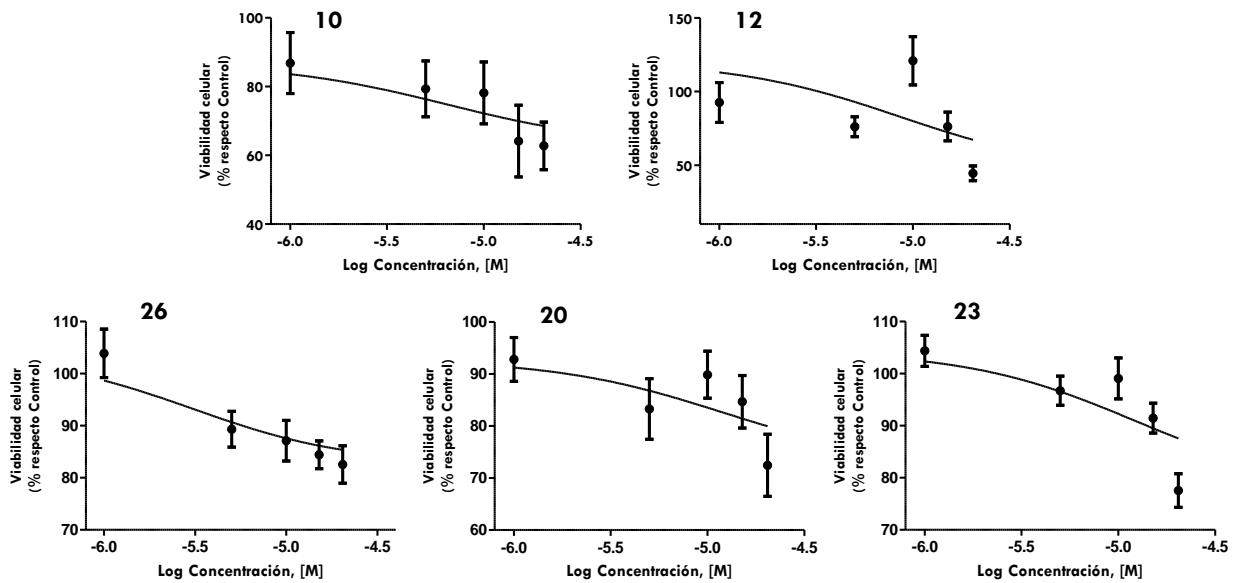


Figura 2.2.6. Curvas dosis-respuesta de los complejos $[\text{Au}(\text{X})(\text{CN})]$ en células Caco-2 normales (15 d). Los datos se expresan como la media \pm EEM y $n \geq 12$ experimentos. Se utilizó un test ANOVA de 1 vía y un post-análisis de comparación múltiple Bonferroni para comparar los efectos de las diferentes concentraciones del compuesto respecto del control (* $p < 0.01$ para **10** y **20**, y *** $p < 0.0001$ para **12**, **23** y **26**).

A partir de estas curvas dosis-respuesta, se pudo calcular el valor de IC_{50} (μM) para el estudio de viabilidad celular llevado a cabo en células tumorales y normales Caco-2 con los complejos de $\text{Au}(\text{III})$ sintetizados (Tablas 2.2.6 y 2.2.7)

Tabla 2.2.6. Valores de los complejos de $\text{Au}(\text{III})$ sintetizados en células Caco-2 tumorales.

Compuesto	IC_{50} (μM)					
	L=tpy	Código	L=ppy	Código	L=bzp	Código
AuCl_2HL		P1		P2		P3
$[\text{AuCl}_2\text{L}]$	Sin efecto	1	Sin efecto	2	Sin efecto	3
$[\text{Au}(\text{Spym})_2\text{L}]$	Sin efecto	4	13.21 ± 0.23	5	Sin efecto	6
$[\text{Au}(\text{S}(\text{Me})_2\text{pyrim})_2\text{L}]$	Sin efecto	7	Sin efecto	8	Sin efecto	9
$[\text{AuCl}(\text{2-Tiouracilo})\text{L}]$	6.03 ± 0.25	10	Sin efecto	11	11.07 ± 0.15	12
$[\text{Au}(\text{tiourea})_2\text{L}]$	Sin efecto	13	Sin efecto	14	Sin efecto	15
$[\text{Au}(\text{OAc})_2\text{L}]$	Sin efecto	16	Sin efecto	17	Sin efecto	18
$[\text{Au}(\text{fenilalanina})\text{L}]\text{Cl}$	Sin efecto	19	1.32 ± 0.12	20	Sin efecto	21
$[\text{Au}(\text{meteonina})\text{L}]\text{Cl}$	Sin efecto	22	Sin efecto	23		
$[\text{Au}(\text{p-etinil tolueno})_2\text{L}]$	18.66 ± 0.35	24	Sin efecto	25		
$[\text{Au}(\text{2-etinil piridina})_2\text{L}]$	Sin efecto	26	Sin efecto	27		

Los datos se expresan como la media \pm EEM y $n \geq 12$ experimentos.

Las casillas oscuras representan los complejos que no se han obtenido.

Tabla 2.2.7. Valores de IC₅₀ obtenidos para los complejos de Au(III) en células normales Caco-2.

IC ₅₀ (μM)						
	L=tpy	Código	L=ppy	Código	L=bzp	Código
[AuCl ₂ HL]		P1		P2		P3
[AuCl ₂ L]	Sin efecto	1	Sin efecto	2	Sin efecto	3
[Au(Spym) ₂ L]	Sin efecto	4	Sin efecto	5	Sin efecto	6
[Au(S(Me) ₂ pyrim) ₂ L]	Sin efecto	7	Sin efecto	8	Sin efecto	9
[AuCl(2-Tiouracilo)L]	6.46±0.34	10	Sin efecto	11	8.67±0.15	12
[Au(tiourea) ₂ L]	Sin efecto	13	Sin efecto	14	Sin efecto	15
[Au(OAc) ₂ L]	Sin efecto	16	Sin efecto	17	Sin efecto	18
[Au(fenilalanina)L]Cl	Sin efecto	19	11.96±0.23	20	Sin efecto	21
[Au(metionina)L]Cl	Sin efecto	22	12.17±0.12	23		
[Au(p-etinil tolueno) ₂ L]	Sin efecto	24	Sin efecto	25		
[Au(2-etinil piridina) ₂ L]	3.08±0.19	26	Sin efecto	27		

Los datos se expresan como la media ± EEM y n ≥ 12 experimentos.

Las casillas oscuras representan los complejos que no se han obtenido.

Como se puede observar, estos complejos quedan muy lejos de los valores de IC₅₀ que registraban los complejos de Au(I) anteriores. En un intento de explicar la diferente citotoxicidad de estos complejos, se realizó un ensayo de MTT también a los precursores de Au(III), [AuCl₃HL] **P1-3**. El motivo de este estudio se basa en que, aunque no está bien establecido, se cree que los complejos de Au(III) experimentan reacciones de reducción en el medio intracelular donde se genera la especie derivada de Au(I), que es la verdadera especie activa. Los complejos de Au(III) utilizados son derivados ciclometalados, por lo que la estabilidad de cara a esas posibles reducciones estaría desfavorecida, impidiendo el comportamiento de profármaco por mecanismos de reducción. Sin embargo, los estudios de viabilidad celular con los complejos [AuCl₃HL] L= tpy, ppy y bzp; no mostraron efecto estadísticamente significativo sobre la viabilidad de las células tumorales Caco-2.

RELACIÓN ESTRUCTURA-ACTIVIDAD: ESTUDIOS SAR

Con estos resultados se intentaron realizar estudios SAR para intentar conocer la parte activa de la molécula, aunque sin éxito, ya que en los cinco complejos citotóxicos para la línea celular Caco-2, se dan los tres ligandos HNC utilizados a lo largo de esta investigación (Figura 2.2.7). Asimismo, no sólo el estudio sobre el ligando no es concluyente, sino que tampoco lo es el estudio del grupo aniónico, puesto que, aunque tres de los complejos contienen unidades tiopirimidínicas (Figura 2.2.7. a-c), también hay complejos con residuos alquenilo o fenilalanina. La influencia sobre la citotoxicidad de la presencia de uno o dos átomos de cloro, o el carácter iónico o neutro del complejo, son factores que tampoco se han podido esclarecer.

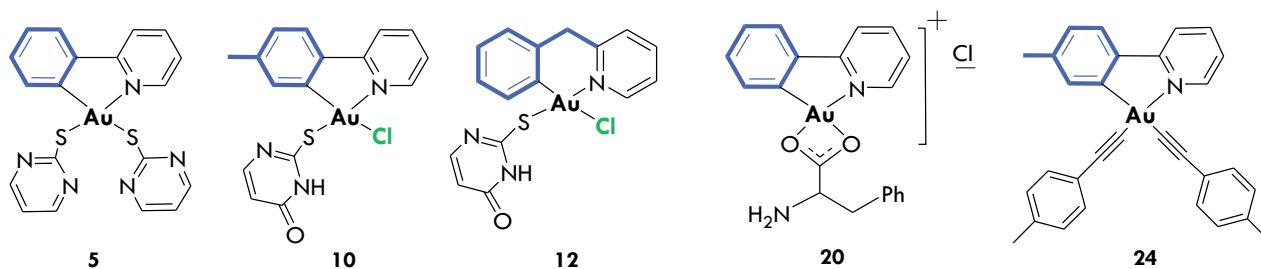


Figura 2.2.7. Estructuras de los complejos de Au(III) con actividad citotóxica en células Caco-2.

Los estudios de viabilidad celular y la determinación del IC_{50} han sido imprescindibles para poder realizar una primera selección de los complejos con interés biológico. Así, los complejos de Au(I) anteriormente mencionados se han seleccionado para estudiar el mecanismo de acción por el cual afectan a la viabilidad de las células tumorales Caco-2 y estos estudios se recogen a continuación.

ESTUDIOS DEL CICLO CELULAR Y APOPTOSIS

Un agente quimioterápico puede actuar mediante diferentes mecanismos de acción como puede ser la alquilación de ADN, la inhibición de la síntesis o acción de los ácidos nucleicos, la interferencia con metabolitos, por inhibición enzimática, o mediante la interrupción del ciclo celular, entre otros posibles procesos. Todos estos mecanismos de acción se basan en detener o, al menos ralentizar, la proliferación de las células tumorales, generalmente interrumpiendo el ciclo celular o induciendo la muerte celular programada (apoptosis).

ESTUDIO DEL CICLO CELULAR Y PROLIFERACIÓN CELULAR

Como se ha comentado en el capítulo 1, las células tumorales se caracterizan por su no respuesta a las señales de control de división y crecimiento celular, lo que implica una mayor velocidad de proliferación que las células sanas. Así, ser capaces de desarrollar fármacos capaces de interrumpir el ciclo celular de forma selectiva sobre las células tumorales parece una forma adecuada de controlar o incluso frenar la replicación de las mismas. Por ello, se decidió estudiar, en primer lugar, la influencia de los derivados de $[Au(X)(HMPT)]$ seleccionados sobre el ciclo celular.

El ciclo celular consiste en una secuencia de eventos que termina en la correcta duplicación de las células.¹⁴ Durante este ciclo se dan fases muy diferenciadas en función del proceso que la célula esté llevando a cabo (Figura 2.2.8.); así se distinguen:

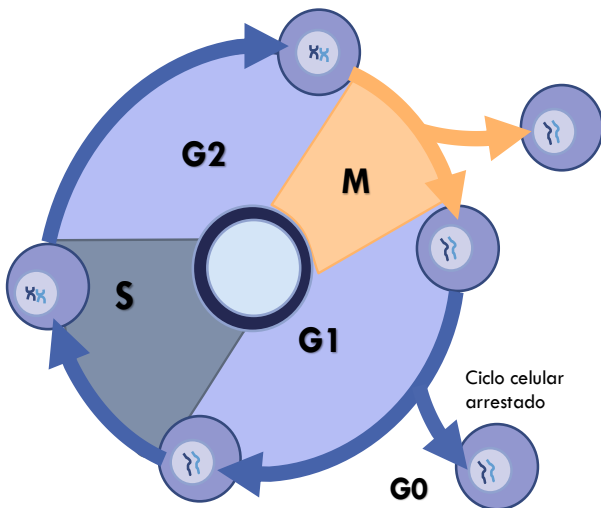


Figura 2.2.8. Fases del ciclo celular

- .. Fase M (mitosis), fase durante la cual las dos copias de ADN se distribuyen en dos núcleos hijos.
- .. Fase S (síntesis), donde la célula va a replicar su ADN.
- .. Fases G1 y G2 (gaps), son aquellas en las que la célula va a realizar la duplicación de los componentes celulares (proteínas, ribosomas, etc) entre las fases S y M. Las fases G1 y G2 se consideran fases de transición o *brecha*.

Las fases G1-S-G2 conforman la interfase o estado de no división, que engloba casi el 90% del ciclo.

Para que el ciclo se desarrolle correctamente hay una serie de puntos de control específicos durante las fases G1 y G2; así en el punto de control de G1, de detectarse alguna anomalía, la célula puede entrar en una fase de arresto denominada G0, asegurando que el ADN dañado no se replica. El objetivo del punto de control de G2 es la reparación de posibles daños en el ADN antes de que tenga lugar la mitosis de ese nuevo ADN anómalo.¹⁵

Todas estas etapas están controladas y reguladas por una familia de serina/treonina quinasas dependientes de ciclina, cuya misión es asegurar el orden correcto de cada uno de los eventos del ciclo celular. De esta forma, cuando el ADN se daña, el ciclo celular se detiene para proporcionar tiempo para la reparación. Un defecto en la regulación de alguno de estos mecanismos suele causar una inestabilidad genómica (adquisición y acumulación de alteraciones genéticas), que en última instancia pueden causar tumorigénesis.¹⁶ Fármacos utilizados como el *cis*-platino induce el arresto celular en G1 en la mayoría de los casos, aunque hay también evidencias de que actúa también en la fase S o en G2.¹⁷⁻¹⁹

El ciclo celular se puede estudiar mediante citometría de flujo usando el yoduro de propidio (PI), una sustancia fluorescente con tendencia a unirse al ADN. En este trabajo, se ha realizado el estudio del ciclo celular con la línea Caco-2 con células control y tratadas con los diferentes compuestos de Au durante 24 h a una concentración de 20 μM (Ver parte experimental).

El PI se une específicamente al ADN, intercalándose entre las bases en una proporción de 1 molécula de PI por cada 4-5 pares de bases. Al ser impermeable a la membrana, sólo puede penetrar en células muertas o en proceso de muerte celular, bien apoptótico o necrótico (cuando la membrana se encuentra alterada). Así, se va a poder identificar a las células muertas por medida de la fluorescencia resultante de la interacción del PI con el ADN.

El uso de la citometría de flujo combinada con la tinción del PI permite estimar la proliferación celular a través la cantidad cambiante de contenido de ADN celular asociado con cada una de las fases del ciclo. De esta forma, se podrían reconocer las cuatro fases distintas en una población de células en proliferación: G1, S, G2 y M. Sin embargo, y dado que el contenido en ADN en las fases G2 y M es el mismo, este parámetro no sirve para la distinción de ambas fases;²⁰ por ello los valores de población de estas dos fases se da conjuntamente.

Los valores encontrados a través de estos estudios, se recogen de una gran población de células y se representan como histogramas donde la fluorescencia relativa de PI se representa en el eje x, y el número de eventos en el eje y. El histograma muestra el número de células de una población con emisión relativa de fluorescencia de PI, que es proporcional a su contenido de ADN. Para una mejor comprensión de los valores obtenidos a partir de esta técnica se va a proceder a un breve comentario sobre las partes que componen el histograma, así como sobre el contenido en ADN en cada una de las fases del ciclo celular.

La fase G₀/G₁ es donde las células pasan la mayor parte de su vida, por lo que aproximadamente el 90% de las células de una muestra de tejido sano se encuentran en las fases G₀ y/o G₁. En esta fase, aparecen dos cromosomas homólogos, con una copia de ADN cada uno, en el núcleo de la célula, por lo que son células 2n. Durante la fase S se va a duplicar el ADN, ya que cuando la célula se divide, cada célula hija debe tener la misma cantidad de ADN que la célula original. Así, una vez que la célula ha terminado de sintetizar (duplicar) su ADN en cada cromosoma, tiene el doble de copias que la célula original, por lo que la célula es 4n. En la fase G₂/M se produce la mitosis o, lo que es lo mismo, la división celular, en la que se separan las cromátidas hermanas de cada cromosoma, por lo que las células hijas tienen sólo una molécula de ADN en cada cromosoma homólogo, son células 2n.

Conviene recordar que las células no realizan este ciclo de forma sincronizada, es decir que habrá unas células que se encuentren en G₀/G₁ mientras otras estén en S; de ahí que se obtenga una distribución de varios tipos de poblaciones. Para organizar y delimitar las diferentes fases, se utiliza un software especializado (The Beckman Coulter Kaluza Analysis Software) que puede calcular el porcentaje de células en cada una de las fases del ciclo celular del total de células vivas analizadas.

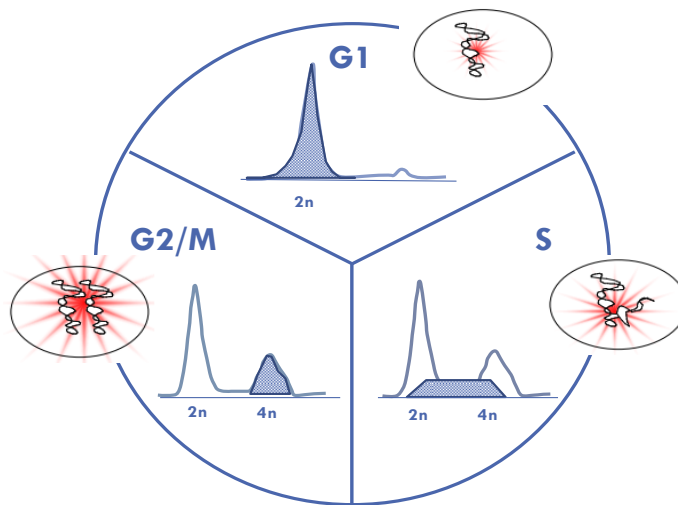


Figura 2.2.9. Fases del ciclo celular, su relación con el contenido en el ADN celular marcado con el PI y visualización de los resultados observados en el histograma de fluorescencia.

Se han estudiado las fases del ciclo celular en las que se encuentran las células Caco-2, tras ser tratadas con los compuestos sintetizados y se han comparado los datos obtenidos con los de las células sin tratar (control).

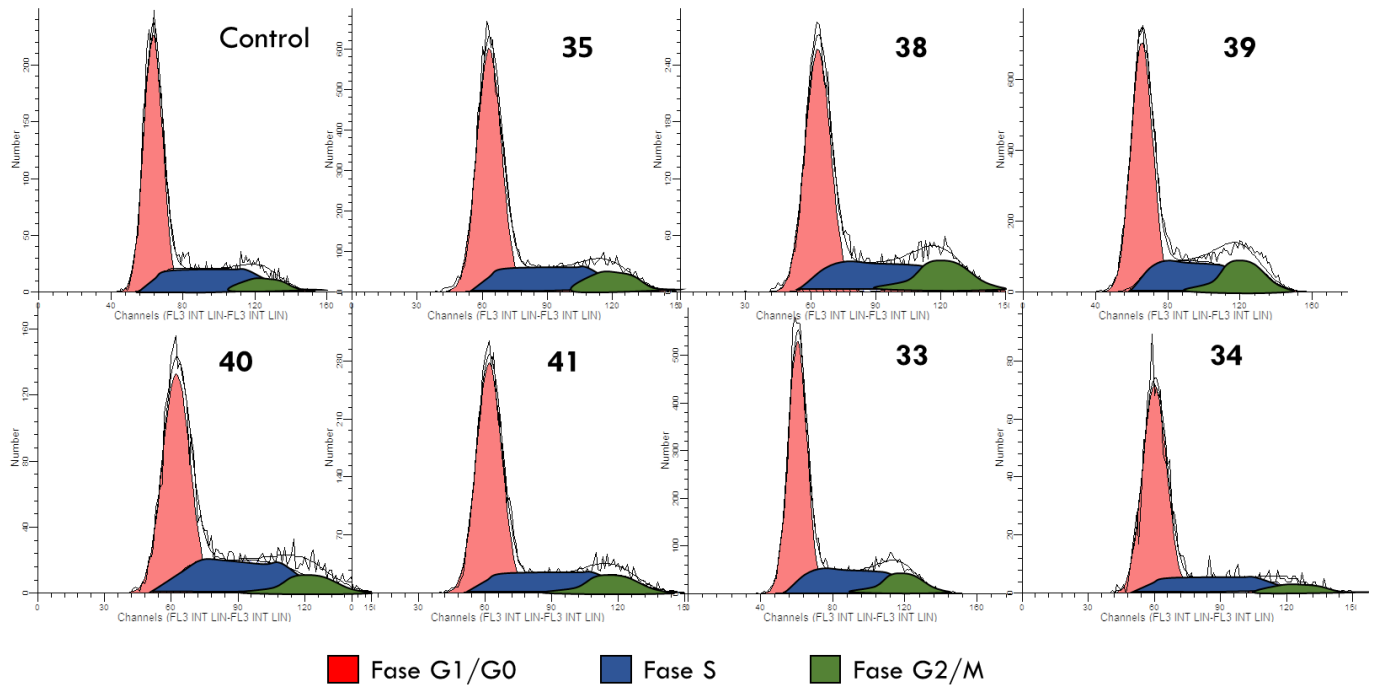


Figura 2.2.10. Histogramas de fluorescencia obtenidos para el estudio del ciclo celular en Caco-2 sin tratar y con el tratamiento con los complejos de Au(I): **35, 38-41, 33 y 34** (20 μ M, 24 h).

En la Tabla 2.2.8, se muestran los porcentajes de células de la población total de Caco-2 analizada que se encuentran en cada una de las fases del ciclo celular, tras ser tratadas éstas con los compuestos de Au. Como se puede observar en la Tabla, los complejos **38, 39, 40 y 41** son significativamente distintos en relación al control.

Tabla 2.2.8. Porcentaje de la población de células que se encuentran en las distintas fases del ciclo celular (G0/G1, G2/M y S) para los complejos **35, 38-41, 33 y 34** (20 μ M, 24 h).

Complejo	G0/G1	S	G2/M
Control	60.25 \pm 1.53	33.02 \pm 1.25	6.73 \pm 0.55
35	60.89 \pm 4.23	30.63 \pm 3.50	8.48 \pm 1.22
38	53.82 \pm 2.11*	36.42 \pm 3.32	9.76 \pm 1.38*
39	51.47 \pm 2.17**	38.50 \pm 3.32	10.03 \pm 1.38*
40	51.58 \pm 1.87**	39.18 \pm 1.69**	9.23 \pm 1.61
41	58.54 \pm 3.52	31.19 \pm 3.63	10.27 \pm 0.17***
33	62.49 \pm 1.19	31.82 \pm 2.37	5.68 \pm 1.22
34	59.51 \pm 4.42	34.67 \pm 4.39	5.05 \pm 0.49

Los resultados muestran los porcentajes de las distintas poblaciones celulares y se expresan como media \pm EEM (n \geq 4 experimentos). *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001 vs. control.

Tal y como se ha comentado, las fases G0/G1 son donde las células pasan la mayor parte de su vida, envueltas en procesos de crecimiento, así como copiando su contenido intracelular (orgánulos) que

necesitarán después. Este hecho queda reflejado en los resultados obtenidos para todas las muestras medidas, donde la mayor población celular se registra para estas fases.

Los estudios de citometría de flujo llevados a cabo muestran que al menos cuatro de los complejos de Au(I) testados son especies que alteran el ciclo celular normal. Así, los complejos **38**, **39** y **41** muestran un arresto en la fase G2/M ya que se puede observar un incremento significativo del número de células en estas fases, respecto de las células control. Asimismo, los dos primeros muestran además una reducción de la población de las fases G0/G1 (**41** también, aunque no es significativamente distinto). La reducción de la población en G0/G1 es coherente con el bloqueo del ciclo en G2/M, ya que esas células “secuestradas” no serán replicadas y, por tanto, no vuelven a realizar el ciclo.

El arresto en la fase G2/M es uno de los grandes objetivos de la comunidad científica ya que, la gran mayoría de células tumorales presentan defectos en el punto de control G0/G1. De esta forma, las células protumorales que contienen ADN dañado avanzan a la fase de síntesis y continuarían hasta llegar a la mitosis si no es por la acción del punto de control G2/M.²¹ Es este punto el que impide que las células dañadas se dividan y multipliquen; por ello, que los complejos **38**, **39** y **41** induzcan un bloqueo en la fase G2/M resulta muy positivo, puesto que se ejerce un control sobre la proliferación de las células mutadas provenientes de G0/G1 típicamente inactivado en células tumorales.

Cabe mencionar, que el secuestro del ciclo celular en la fase G2/M que se ha observado para estos derivados se ha observado también en fármacos antitumorales, como es el caso del *cis*-Pt.²²

El hecho de que estos los complejos **38** y **39** tengan el mismo efecto sobre el ciclo celular, y por lo tanto compartan mecanismo de acción, no resulta extraño puesto son dos complejos muy similares en cuanto a su estructura química, con la única diferencia de que el grupo halogenuro es Br en vez de Cl para **38** y **39**, respectivamente. Este hecho que, aunque sí ha resultado significativo para sus propiedades fisicoquímicas, no parece que influya sobre su mecanismo de acción.

El complejo **40** también actúa como secuestrador del ciclo celular, pero en este caso sobre la fase S, con el mismo descenso de la población G0/G1 que se había observado para los complejos **38** y **39**.

Está establecido que para que una célula avance desde G1 a S tiene que tener el ADN intacto. Sin embargo, dado que para la mayoría de los cánceres este punto de control es defectuoso, las células entran en la fase S de manera “forzada”, por lo que las células comienzan la replicación antes de haber realizado los procesos de G1. Así, la horquilla de replicación experimenta estrés de replicación y detiene sus células en fase S debido a la activación del punto de control de la fase intra-S. Este punto de control es ligeramente diferente de los otros puntos de control del ciclo celular, ya que no bloquea el progreso del ciclo, sólo reduce, sin detener por completo, la síntesis de ADN en presencia de ADN dañado durante la fase S. Esto requiere más tiempo que la propia síntesis de ADN, y como consecuencia se da una elongación de esta fase. Por ello, el complejo **40** produce un aumento de la población de células en fase S respecto del control.²³

ESTUDIO DE LA MUERTE CELULAR PROGRAMADA (APOPTOSIS)

Las células de organismos multicelulares forman parte de un conjunto perfectamente organizado y regulado, no sólo en cuanto a los procesos de división celular sino también a la tasa de muerte celular, de acuerdo con las necesidades del organismo. El equilibrio dinámico entre la proliferación y la muerte celular se conoce como homeostasis, cuyo mantenimiento es vital, pues de modificarse, pueden tener lugar diferentes procesos

patológicos, como la carcinogénesis. En los humanos, alrededor de cien mil células se forman cada segundo a través de la mitosis, mientras que un número similar es destruido por la apoptosis.²⁴

Cuando una célula concluye su función fisiológica o se detecta un daño, se desencadena un proceso fisiológico que induce su propia muerte. Este proceso se denomina muerte celular programa, comúnmente conocido como apoptosis, término que fue descrito por Kerr *et al.* en 1972.²⁵

Sin embargo, éste no es el único mecanismo a través del cual puede morir una célula (Figura 2.2.11) ya que aquellas que han sufrido una lesión aguda, generalmente se hinchan y estallan. De esta forma, todo su contenido celular es liberado provocando una respuesta inflamatoria potencialmente dañina. Este proceso se denomina necrosis celular, y difiere de la apoptosis en que en esta última, la célula es fagocitada sin expulsar su contenido.²⁶ Esto no solo evita las consecuencias perjudiciales de la necrosis, sino que también permite que los componentes orgánicos de la célula muerta sean reciclados por la célula que los ingiere. Asimismo, existe un tercer tipo de muerte celular conocido como autofagia durante el cual las proteínas y los orgánulos de larga vida son degradados por los lisosomas para mantener la homeostasis celular.²⁷ En la siguiente Figura se recogen los distintos tipos de muerte celular clasificados según recoge el comité de nomenclatura en muerte celular (NCCD):

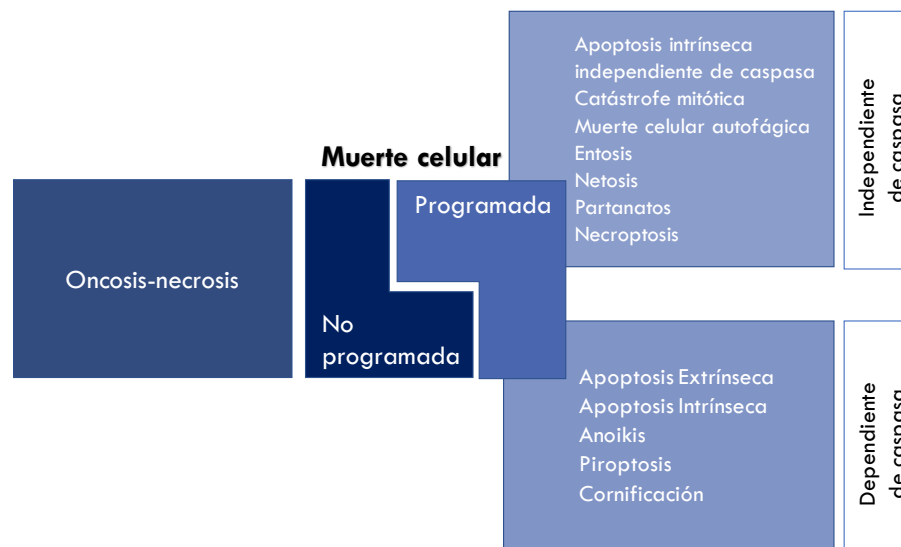


Figura 2.2.11. Clasificación de los diferentes tipos de muerte celular según el NCCD (modificado de Galluzi *et al.* 2012).

Según lo recogido anteriormente, el mecanismo de muerte celular adecuado para no generar procesos patológicos es la muerte celular programa (MCP), por lo que también constituye un mecanismo de defensa “*anti-cancer*”. Las señales que desencadenan el proceso apoptótico son varias: activación masiva de las caspasas, pérdida del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$), permeabilización completa de la membrana externa mitocondrial o exposición de residuos de fosfatidilserina (PS) fuera de la membrana. Asimismo, pueden darse varios mecanismos simultáneamente, aunque siempre prevalece el más eficaz de las cascadas operativas.

En este trabajo se han estudiado dos de los mecanismos implicados en la apoptosis: la externalización de PS a través de su interacción con Anexina V-FITC y la activación de la cascada de caspasas.

ESTUDIO DE MECANISMOS DE APOPTOSIS: FOSFATIDILSERINA

El primer mecanismo de apoptosis que se ha estudiado es la detección de fosfatidilserina (PS) en la superficie de la membrana de las células Caco-2 a través de su unión con anexina V.

La base de este ensayo es la reacción entre anexina V y PS, unión que sólo tiene lugar en células apoptóticas, ya que en células normales la PS se encuentra dispuesta hacia el interior celular.²⁸

Todas las células están separadas del medio extracelular por la presencia de la membrana plasmática constituida por una doble capa de fosfolípidos, cuya función es impedir la difusión de proteínas, iones y otras moléculas esenciales al espacio extracelular, así como constituir la estructura celular. La composición de esta membrana es diferente entre la capa externa o interna; mientras que la fosfatidilcolina y la esfingomielinina están presentes principalmente en la capa externa, la fosfatidilserina, el fosfatidilinositol y la fosfatidiletanolamina están restringidas a la interna.²⁹ Esta disposición se mantiene por la acción de enzimas dependientes de ATP llamadas flipasas y flopasas, que invierten la localización de los fosfolípidos y otras moléculas de la membrana externa a la interna, y viceversa.³⁰

La pérdida de asimetría en la disposición de los fosfolípidos, con la consiguiente exposición de la PS se observó por primera vez en linfocitos apoptóticos,³¹⁻³² para más tarde confirmarse para una gran variedad de células como líneas celulares tumorales, células de músculo liso vascular, etc.³³ Debido a esto, se acepta el cambio en la localización de la PS como una característica universal de células apoptóticas,³⁴ así como un marcador para ensayos de citometría de flujo utilizando anexina V marcada con un fluoróforo (FITC: isotiocianato de fluoresceína). La anexina V se une a PS en presencia de iones calcio.³⁵

Tal y como se recoge en la Figura 2.2.12, cuando la célula comienza el mecanismo de apoptosis, la PS se externaliza permitiendo la coordinación de la anexina V (en presencia de iones Ca^{2+}). La anexina V está marcada con FITC lo que hace posible la detección de la población de células que se encuentran en estados tempranos de apoptosis. Las células que se encuentran en fases más avanzadas de apoptosis se van a poder identificar por la presencia de 7-aminoactinomicina D (7-AAD).

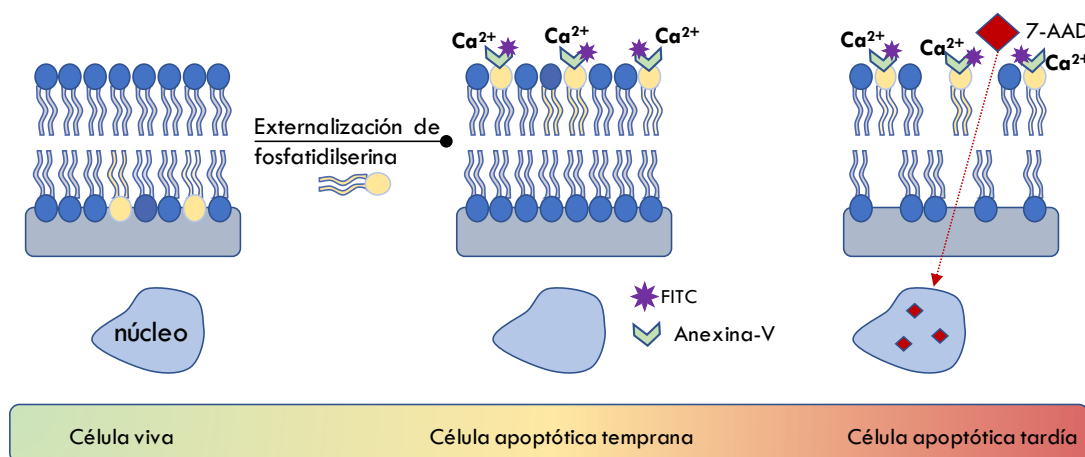


Figura 2.2.12. Mecanismo para la detección de PS en el exterior de la membrana celular plasmática. La coordinación de la PS con la anexina V-FITC se produce en presencia de iones calcio (Ca^{2+}). En células en apoptosis tardía, se dan defectos en la membrana que permiten al 7-AAD intercalarse con el ADN nuclear.

Con base en lo anteriormente comentado, se han tratado células Caco-2 con los compuestos de Au(I) a una concentración de 20 μM durante 24 h, y se ha estudiado la presencia de PS en la capa externa de la membrana plasmática mediante anexina V-FITC y 7-aminoactinomicina D (7-AAD). Este mismo procedimiento se llevó a cabo con células sin tratamiento, que constituyen el control de la técnica.

EL 7-AAD es una sustancia fluorescente que se intercala selectivamente en el ADN de células con defectos en la membrana celular, propiedad distintiva de células en procesos de muerte celular. Así, el uso de 7-AAD en combinación con la anexina V-FITC, va a permitir diferenciar entre poblaciones de células en apoptosis temprana o tardía,³⁶ ya que sólo las células en fases avanzadas de apoptosis muestran los defectos en la membrana necesarios para que el 7-AAD penetre hasta el núcleo celular y se asocie con las regiones GC del ADN.³⁷

En la Figura 2.2.13 se muestran algunos histogramas obtenidos para las células tratadas con los compuestos testados, así como para el control.

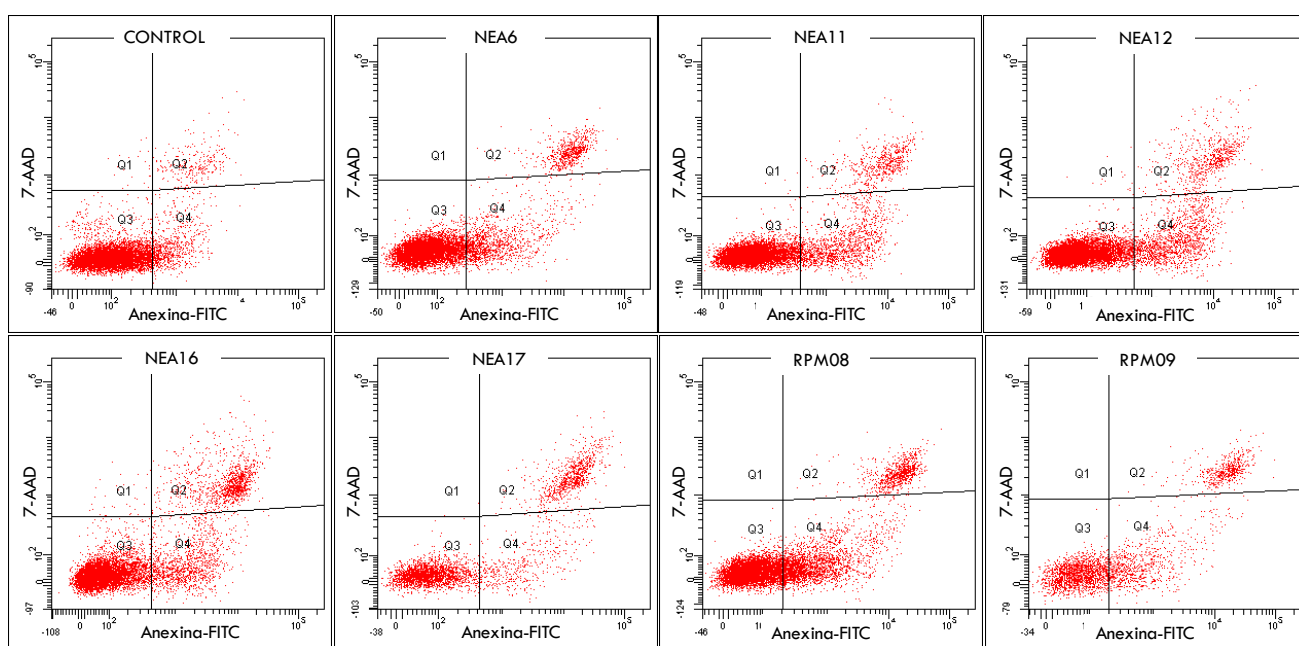


Figura 2.2.13. Histogramas de fluorescencia y análisis de la apoptosis inducida por los distintos complejos de Au(I) en células Caco-2.

Los porcentajes de células que mostraron procesos de apoptosis mediados por la PS oscilan entre el 11-27% en función del complejo de Au(I) utilizado, tal como puede observarse en la Figura 2.2.14. Los complejos **38**, **39**, **40** y **41** indujeron un incremento significativo de las células apoptóticas totales (tardía + temprana) respecto del control (Figura 2.2.14), por lo que se puede afirmar que, al menos, estos cuatro compuestos son inductores de apoptosis mediante un cambio en la morfología de la membrana celular. Los porcentajes de apoptosis inducidos por nuestros compuestos fueron similares o muy superiores a otros compuestos de Au testados por otros autores, como el $[\text{Au}(\text{Spy})(\text{PTA}-\text{R})]\text{Br}$, que presenta un $15.70 \pm 1.98 \%$, o el $[\text{Au}_2(5\text{-FU})(\text{PTA})_2]$ que presenta un $7.70 \pm 1.71 \%$ de apoptosis.³⁸⁻³⁹

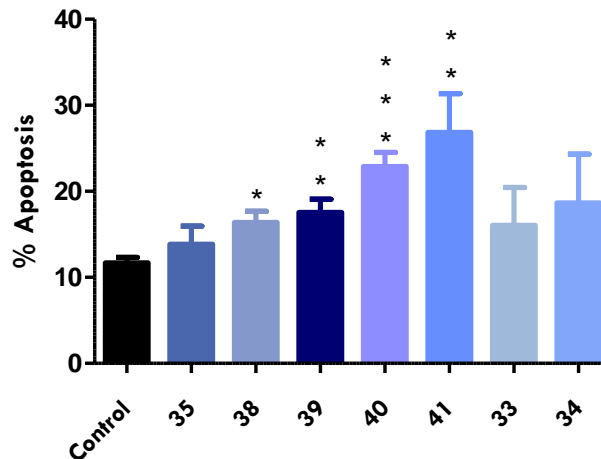


Figura 2.2.14. Valores de apoptosis (%) obtenidos en células Caco-2, tras ser tratadas con los complejos **35, 38-41, 33** y **34** (20 μ M, 24 h). Los resultados muestran el promedio del total de células en apoptosis (tardía+temprana) y las barras verticales indican los EEM ($n \geq 4$ experimentos). * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ vs. control.

Por otra parte, los resultados mostraron que los complejos testados no inducen necrosis de forma significativa, ya que en ninguno de los casos se han encontrado valores superiores a 0.3%, dándose valores próximos al 0 % en la mayoría de los casos (Tabla 2.2.8).

Tabla 2.2.9. Valores de necrosis (%) obtenidos en células Caco-2, tras ser tratadas con los complejos **35, 38-41, 33** y **34** (20 μ M, 24 h).

Control	35	38	39	40	41	33	34
0.19 \pm 0.048	0.04 \pm 0.024	0.06 \pm 0.024	0.12 \pm 0.037	0.22 \pm 0.058	0.04 \pm 0.024	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00

Los resultados se expresan como media \pm EEM ($n \geq 4$ experimentos).

ESTUDIO DE MECANISMOS DE APOPTOSIS: CASPASAS

Como se ha podido observar con base en lo anteriormente expuesto, los mecanismos de apoptosis son altamente complejos y exigentes, puesto que implican una cascada de procesos moleculares demandantes de energía. Según recoge la bibliografía, hay tres tipos de vías apoptóticas:⁴⁰

- .. Vía perforina/granzima
- .. Vía extrínseca o de la muerte
- .. Vía intrínseca o mitocondrial.

Mientras que la primera de ellas activa una vía paralela,⁴¹ las dos últimas vías parecen estar muy relacionadas, hasta el punto de que moléculas presentes en una pueden afectar a la otra.⁴² De hecho, tienen la misma vía de ejecución a través de la activación de cisteínas proteasas conocidas como caspasas.

La activación de las caspasas desencadena la fragmentación del ADN, degradación de proteínas citoesqueléticas y nucleares, la formación de los cuerpos apoptóticos, la expresión de ligandos para receptores de células fagocíticas y finalmente la captación por células fagocíticas.

La familia de las caspasas engloba un total de 14 enzimas, todas ellas cisteínas proteasas aspartato-específicas. Aunque presentan diferencias entre ellas, comparten una similitud estructural y funcional:⁴³

- .. Todas tienen un sitio activo pentapéptido 'QACXG' (Glu-Ala-Cys-X-Gly), donde X puede ser una Glu, Arg o Asp.
- .. Sus precursores son todos zimógenos conocidos como procaspasas, las cuales presentan un N-terminal necesario para su activación.
- .. Todas son capaces de autoactivarse, así como de activar a otras caspasas.

Con base en su composición y a la homología en sus secuencias de aminoácidos, las caspasas se dividen en tres subfamilias las cuales desempeñan a su vez diferentes funciones (Figura 2.2.15).

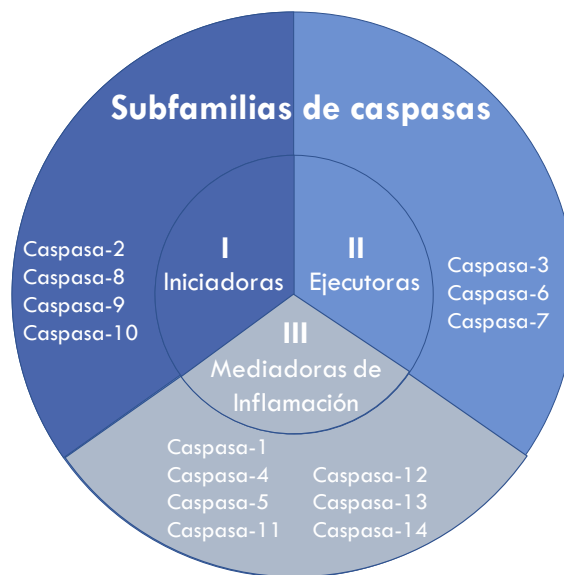


Figura 2.2.15. Diferentes subfamilias de caspasas y su función.

Asimismo, y como se ha comentado, hay dos vías por las que se activa la cascada de las caspasas, la mediada por receptores de muerte o la mediada por la mitocondria. La primera de ellas moviliza a las caspasas inactivas cuando los receptores de muerte se unen a su ligando, el factor de necrosis tumoral (TNF; factor de necrosis tumoral), y reclutan a una proteína adaptadora intracelular denominada proteína con región de muerte asociada a Fas (FADD; Fas-associated deathdomain). Mediante esta vía se activan las caspasas 8 y 10 que actúan como iniciadoras (Figura 2.2.16)

La muerte a nivel mitocondrial se inicia mediante la estimulación, aún no completamente definida, de la membrana mitocondrial, y continúa con la liberación de citocromo c y otros factores apoptogénicos del espacio intermembranoso de las mitocondrias. De esta forma se promueve el funcionamiento de la caspasa-9, que activa a la caspasa ejecutora 3 (Figura 2.2.16).⁴⁴

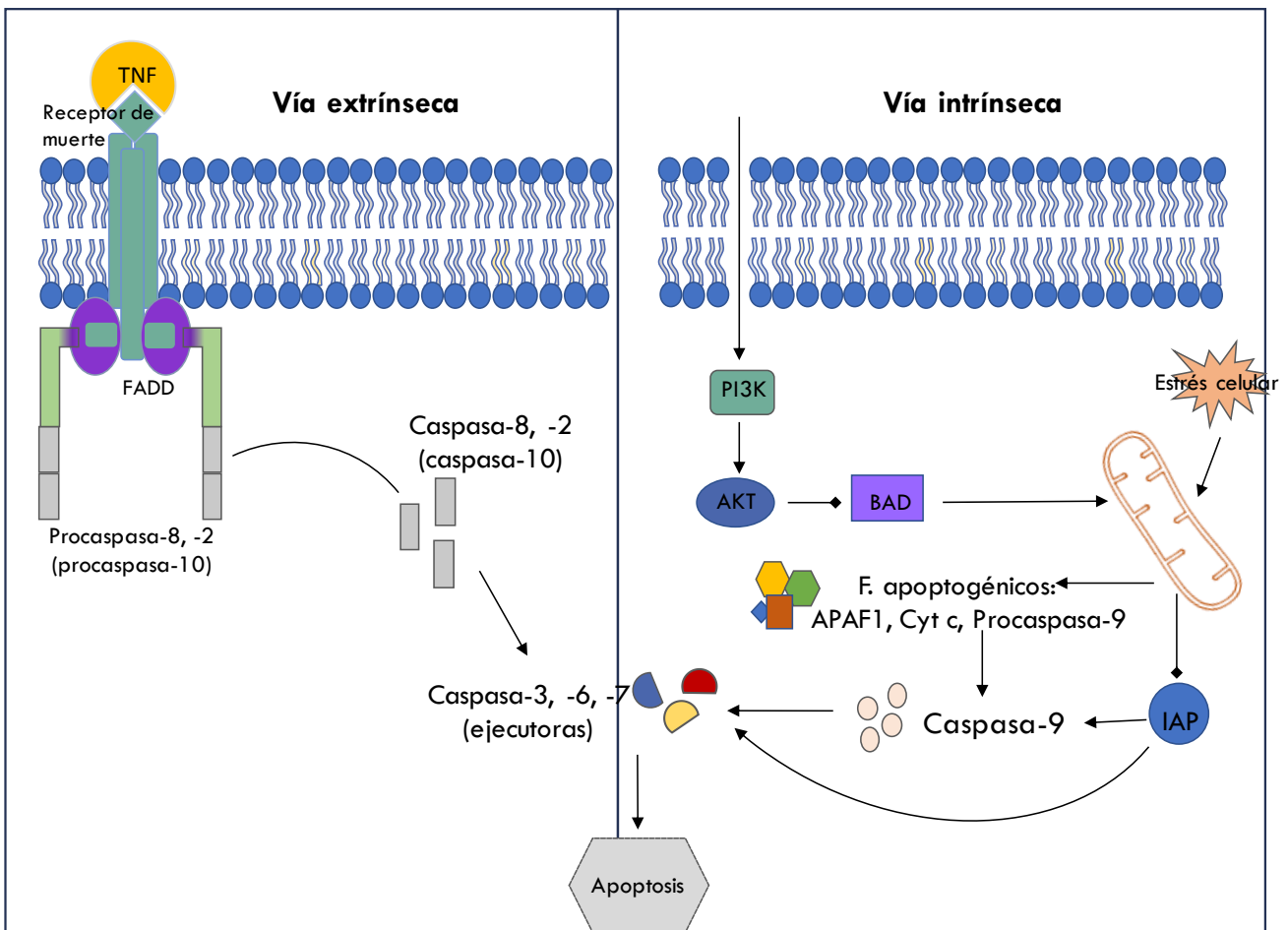


Figura 2.2.16. Vías de activación de la cascada de las caspasas.

En la vía extrínseca se activan las caspasas -3, -6 y -7 por activación de las caspasas-2, -8 y -10, activadas previamente por la unión del TNF (tumor necrosis factor) con FADD (Fas-associated death domain). En la vía intrínseca, las caspasas-3, -6 y -7 se activan por acción de la caspasa-9. Ésta se moviliza por liberación de citocromo c y otros factores apoptogénicos.

Así pues, y viendo que ambas vías confluyen en un mismo punto, la activación de las caspasas ejecutoras, se decidió estudiar la actividad de las caspasas-3 y -7 mediante luminiscencia.

Este ensayo se basa en la reacción entre un derivado de proluciferina luminogénico, que contiene la secuencia tetrapeptídica DEVD, específica para la acción de caspasa-3 y -7. Este reactivo provoca la lisis celular, seguida de la escisión del sustrato DEVD de la proluciferina mediante la acción de las caspasas-3/7, liberándolo y generando 6-amino-D-lucifereína que, en presencia de luciferasa y ATP, da como resultado la producción de luz (Figura 2.2.17).

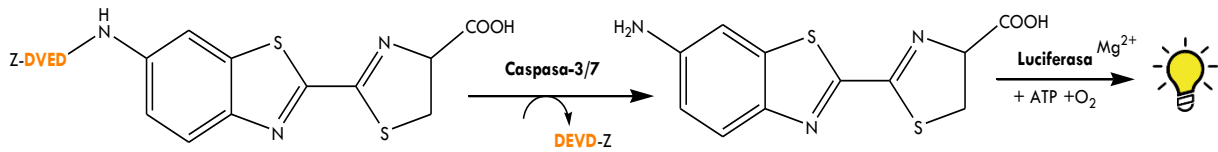


Figura 2.2.17. Mecanismo de reacción para la detección de la actividad de las caspasas 3/7.

La intensidad de la luminiscencia es, por tanto, proporcional a la cantidad de actividad de caspasa en la muestra, pudiendo comparar la actividad de las caspasas en células Caco-2 tratadas con los compuestos de Au(I) a una concentración 20 μM tras 24 h de incubación con la de las células control.

En la Figura 2.2.18, se puede observar que nuestros complejos inhiben la actividad de las caspasas 3/7, ya que los valores de actividad del control son significativamente mayores que los obtenidos con los compuestos testados. Estos resultados demuestran, por lo tanto, que la activación de las caspasas no parece ser el mecanismo apoptótico de muerte celular que está implicado en la actividad de nuestros complejos. Por otra parte, la inhibición de las caspasas se podría explicar por el hecho de que quizás los complejos de Au(I) han podido realizar algún enlace con los átomos de N o S del anillo tiazólico de las luciferasas,⁴⁵⁻⁴⁶ inhibiendo alguna de ellas e impidiendo la generación de luz a niveles similares a los del control.

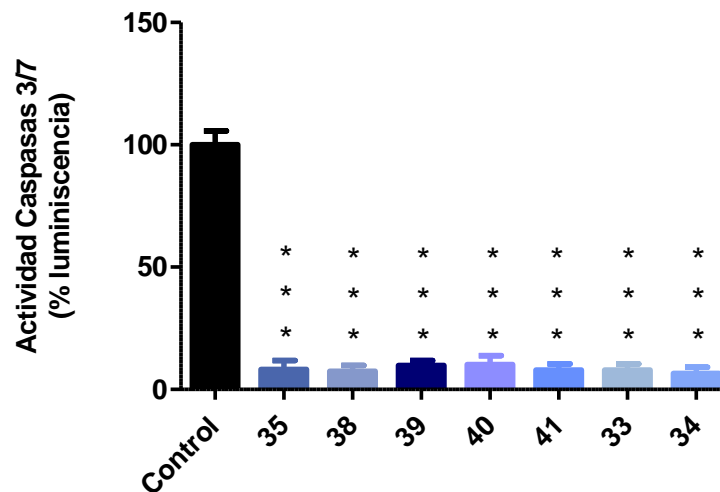


Figura 2.2.18. Actividad de caspasas 3/7 para los complejos 35, 38-41, 33 y 34 (20 μM , 24 h). Los resultados muestran el promedio de los valores de luminiscencia en porcentaje y las barras verticales indican los EEM ($n \geq 4$ experimentos). *** $P < 0.001$ vs. control.

MECANISMOS DE ACCIÓN: ESTRÉS OXIDATIVO

Como se ha visto en el apartado anterior, los complejos de Au(I) testados parecen ser buenos candidatos para su uso como quimioterápicos contra el cáncer ya que, además de tener valores de IC₅₀ inferiores al *cis*-Pt en la línea tumoral Caco-2, también inducen cambios en la composición de su membrana (exponen PS) para iniciar mecanismos apoptóticos. Ésta es la vía de muerte celular necesaria para la eliminación de células tumorales de forma controlada sin producir ni procesos inflamatorios ni liberación de material celular al medio extracelular. Así pues, y tras conocer el tipo de muerte celular que activan los complejos mencionados, se fijó como objetivo conocer el mecanismo de acción por el cual se activa la apoptosis en esta misma línea tumoral.

Está aceptado que el Au tiene un mecanismo de acción diferente al encontrado para el *cis*-Pt, por lo que el ADN no es su diana. De hecho, la mayoría de derivados de Au(I) manifiestan una elevada tendencia a coordinarse con proteínas con centros de azufre (SH) o selenio (SeH) principalmente. Este tipo de proteínas son bastante abundantes en el torrente sanguíneo y, la mayoría tienen como función mantener la homeostasis redox celular.

El equilibrio redox es fundamental para un correcto funcionamiento celular. Por ello, las células deben limitar la producción de especies reactivas mediante mecanismos antioxidantes para neutralizar estas especies o, mitigando el estrés oxidativo provocado por las mismas. Estas especies oxidantes se pueden clasificar en función del átomo principal implicado en las reacciones posteriores, distinguiéndose cuatro grandes grupos:

- .. ROS: especies reactivas de oxígeno.
- .. RNS: especies reactivas de nitrógeno.
- .. RSS: especies reactivas de azufre.
- .. RCS: especies reactivas de cloro.

De todas estas especies, las reactivas de oxígeno (ROS) son las más abundantes. Son moléculas altamente reactivas que se forman mediante varios procesos celulares, incluido el metabolismo oxidativo en las mitocondrias.⁴⁷ A niveles bajos, estas especies son beneficiosas para las células, ya que activan vías de señalización que promueven la proliferación, la supervivencia o la resistencia celular al estrés oxidativo.⁴⁸ Sin embargo, a niveles más altos, las ROS pueden dañar o matar a las células al oxidar proteínas, lípidos y ácidos nucleicos.⁴⁹ El daño que las ROS pueden causar a la célula no solo depende de su concentración intracelular sino también del equilibrio entre ellas y las especies antioxidantes endógenas. Es la pérdida de este equilibrio especies prooxidantes/antioxidante, la causante del denominado estrés oxidativo.

Desde el punto de vista biomédico, el estrés oxidativo es importante porque está relacionado con una amplia variedad de enfermedades, como enfermedades neurodegenerativas (p. Ej. Alzheimer, Parkinson y esclerosis lateral amiotrófica), enfermedades inflamatorias (p. Ej. Artritis reumatoide), enfermedades cardiovasculares (p. Ej. distrofia muscular), alergias, disfunciones del sistema inmunitario, diabetes, envejecimiento y cáncer.⁵⁰ De hecho, se sabe que las células inflamatorias liberan mediadores químicos de la inflamación, particularmente ROS, en el tejido inflamado, que también afecta a las células normales. Cuando se trata de un proceso crónico, los niveles extremadamente altos de ROS saturan los mecanismos de defensa celular (es decir, los antioxidantes endógenos) y las moléculas intracelulares se dañan gravemente, afectando a las células vecinas circundantes.

El daño que ROS infringe sobre biomoléculas tan importantes como los ácidos nucleicos, ha llevado a concluir que estas especies tienen un gran efecto sobre muchos aspectos del desarrollo y la progresión tumoral, especialmente durante la proliferación celular y a través de la evasión de la apoptosis.

Para mantener el equilibrio de especies prooxidantes/antioxidantes anteriormente mencionado, entran en juego un gran número de enzimas y sistemas redox que se pueden clasificar en diferentes grupos según sus propiedades: antioxidantes endógenos, antioxidantes naturales y antioxidantes sintéticos. Entre los antioxidantes endógenos se encuentran el glutatión, el ácido alfa-lipoico, la coenzima Q, la ferritina, el ácido úrico, la bilirrubina, la metalotioneína, la L-carnitina, la melatonina y las enzimas superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPX), tioredoxinas (Trx) y peroxirredoxinas (PRX). Son precisamente algunas de estas enzimas las que contienen grupos tiol, por lo que el oro presenta una gran tendencia a coordinarse con ellas (Figura 2.2.19). Este es el caso de la Trx, la glutatión reductasa (GR) o la cisteína proteasa, proteínas que además se sobreexpresan en células tumorales, constituyendo objetivos potenciales contra el cáncer para la terapia con complejos de oro.

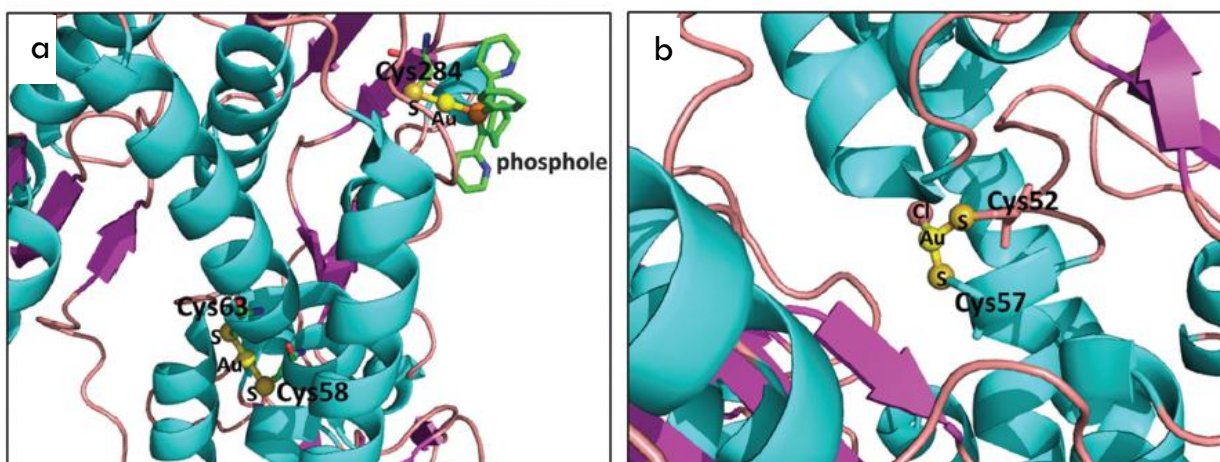


Figura 2.2.19. Estructuras cristalinas de aductos de Au-proteína: a) Adueto Au(I)-GR.⁵¹ (b) Adueto Au(I)-Trx.⁵²

La oxidación de las biomoléculas mencionadas por las ROS conlleva, en todos los casos, la alteración del correcto desarrollo celular; por ejemplo, estas especies reactivas provocan cambios en el ADN y un mal funcionamiento en el mecanismo de reparación del ADN. La oxidación del ADN por estas especies genera 8-hidroxil-2-desoxiguanosina, que es un producto capaz de generar mutaciones en el ADN en un proceso que promueve el envejecimiento y la carcinogénesis.⁵³

El efecto sobre la membrana es distinto, puesto que en este caso son los lípidos poliinsaturados presentes los que son susceptibles a la oxidación. Las ROS desencadenan reacciones de peroxidación lipídica que aumentan la permeabilidad de la membrana celular lo que, según algunos estudios, podría conducir a la muerte celular.⁵⁴ En lo que se refiere a las proteínas, éstas sufren la generación y acumulación de grupos carbonilo y grupos tiol que pueden convertirse en radicales reactivos con azufre.⁵⁵ Debido a esta modificación inducida por la oxidación, hay una alteración en la estructura de la proteína y, en consecuencia, cambios o pérdida de la función de la proteína oxidada. Por tanto, todas estas alteraciones generan mutaciones (oxidación sobre ADN), inducen la muerte celular (oxidación sobre lípidos) o disfunción proteica (oxidación sobre proteínas) responsables de procesos tumorales. Por todo esto, se ha decidido evaluar el estrés oxidativo en las células tumorales Caco-2.

Existen diferentes métodos para evaluar el estrés oxidativo:⁵⁶

- .. Medición de las ROS
- .. Detección de ADN y lípidos o proteínas oxidados
- .. Cuantificación de antioxidantes

En este trabajo se ha optado por el segundo de los métodos citados, con el fin de evaluar el efecto localizado del estrés oxidativo sobre las biomoléculas que componen las células, y cuya estructura es fundamental para el óptimo desarrollo de las funciones celulares.

EVALUACIÓN DE LA OXIDACIÓN PROTEÍCA

La oxidación de proteínas se define como la modificación de una proteína por las especies ROS o, de forma indirecta, por la reacción con subproductos secundarios del estrés oxidativo (Figura 2.2.20). Esta modificación puede inducirse por diferentes agentes prooxidantes, y está íntimamente relacionada con el envejecimiento celular y con ciertas enfermedades. De hecho, niveles altos de carbonilación de proteínas se han relacionado con enfermedades como el Alzheimer, la diabetes, las enfermedades autoinmunes, la artritis, la sepsis y la dificultad respiratoria.⁵⁷

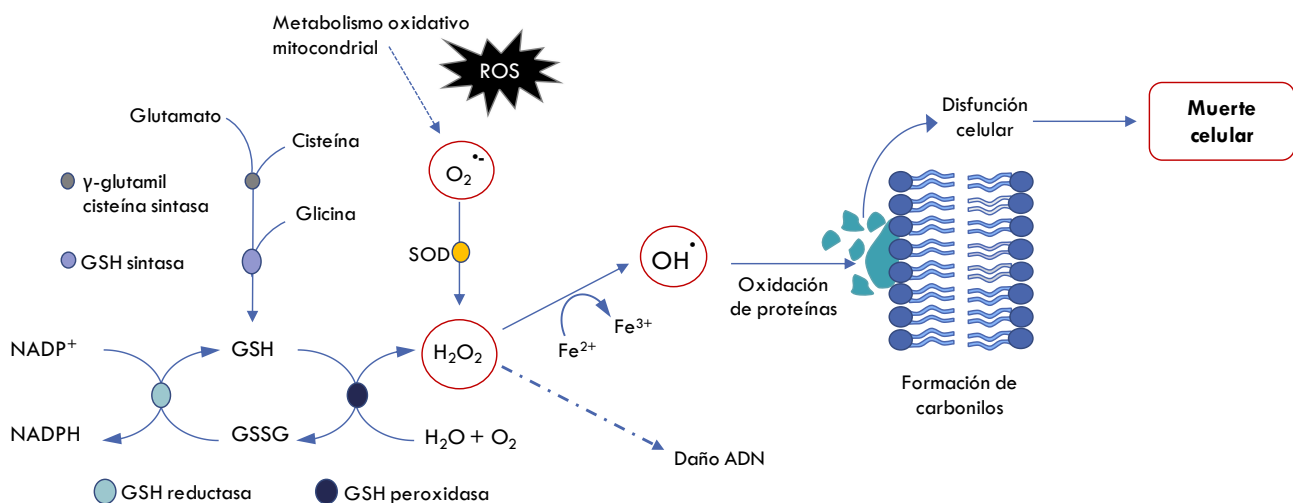


Figura 2.2.20. Procesos de formación de ROS implicados en la oxidación de proteínas para formar grupos carbonilos.

Las proteínas son biomoléculas muy sensibles a cambios en su estructura, por tanto, cambios oxidativos en éstas conlleva importantes consecuencias funcionales, como la inhibición de las actividades enzimáticas y de unión, una mayor susceptibilidad a la agregación y la proteólisis, un aumento o disminución de la absorción por las células y una inmunogenicidad alterada.

Como se ha mencionado anteriormente, el resultado de la oxidación de proteínas suele ser la acumulación de grupos carbonilos o tiol; por ello, tal y como se puede observar en la Tabla 2.2.9, se conocen diferentes biomarcadores para cuantificar el estrés oxidativo en proteínas. Sin embargo, el indicador de oxidación de proteínas más medido en muestras biológicas son los carbonilos protéicos,⁵⁸ ya que estos productos son químicamente estables, lo que es útil tanto para su detección como para su almacenamiento.

Tabla 2.2.10. Biomarcadores comunes en el estudio de estrés oxidativo sobre proteínas.⁵⁹

Biomarcador	Indicador de...
<i>Carbonilación de proteínas</i>	Oxidación en proteínas
<i>Carbamilación de proteínas</i>	Modificación de proteínas
<i>Oxidación de grupos SH en proteínas</i>	Oxidación en proteínas
<i>Modificación de 3-nitrotirosina</i>	Nitración de proteínas
<i>Modificación de 3-clorotirosina</i>	Oxidación en proteínas
<i>Formación de ditirosina</i>	Oxidación en proteínas
<i>Acumulación de productos de glicación avanzada (AGE)</i>	Glicación de proteínas
<i>Producción de productos de oxidación proteica avanzada (AOPP)</i>	Oxidación en proteínas

La carbonilación de proteínas puede detectarse y medirse a través de varios métodos directos o indirectos. Entre los métodos directos destaca la detección de carbonilos mediante el enlace de los grupos carbonilo existentes, con una molécula de detección; siendo la más común el dinitrofenol, que se detecta por reacción con un anticuerpo. En lo que se refiere a métodos indirectos, hay un amplio abanico de posibilidades entre las que cabe mencionar:

- .. Reducción del grupo carbonilo a un alcohol con borohidruro tritiado.
- .. Reacción del grupo carbonilo con 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) para formar la 2,4-dinitrofenilhidrazona.
- .. Reacción del carbonilo con fluoresceína tiosemicarbazida para formar la tiosemicarbazona.
- .. Reacción del grupo carbonilo con aminofluoresceína para formar una base de Schiff, para posteriormente reducir a la amina secundaria con cianoborohidruro.

El segundo de los métodos indirectos mencionados ha sido el utilizado a lo largo de este trabajo por su simplicidad, ya que la reacción entre DNPH y el carbonilo genera 2,4-dinitrofenilhidrazona (Figura 2.2.21), un producto estable que puede detectarse por una técnica tan sencilla como es la espectrofotometría UV. El grupo DNP absorbe luz ultravioleta a 370 nm con un coeficiente de extinción molar de 22.000 M⁻¹ cm⁻¹, permitiendo calcular el contenido de carbonilo total de una proteína o mezcla de proteínas por medida de la absorbancia a 375 nm.

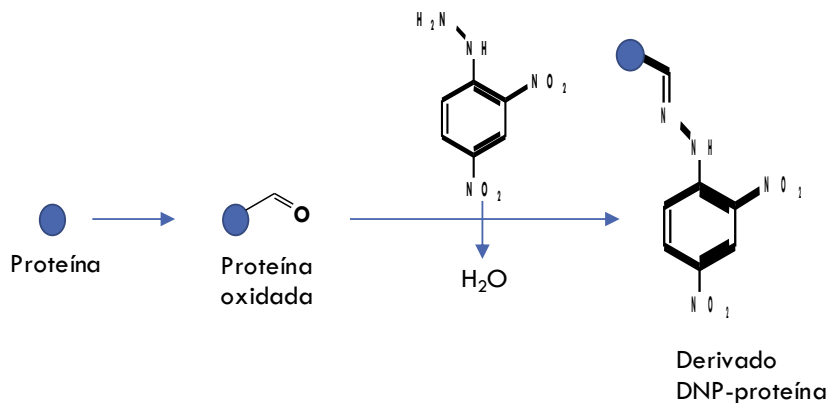


Figura 2.2.21. Mecanismo de reacción para la evaluación de contenido de proteína oxidada con DNPH.

En la Figura 2.2.22 se muestran los niveles de proteínas carboniladas obtenidos en las células Caco-2 tratadas con los complejos de Au(I) respecto de su control. Sorprendentemente, según los análisis realizados, los valores de proteína carbonilada en las células tratadas con los derivados de Au(I) no son significativamente distintos de los valores control. Conviene recordar que valores pequeños de proteína oxidada es normal en un correcto ciclo celular, ya que también constituyen un control sobre la supervivencia y proliferación celular. Así, se puede concluir que los productos testados no aumentan el daño oxidativo sobre las proteínas, por lo que tampoco incrementan la muerte celular a través de este mecanismo.

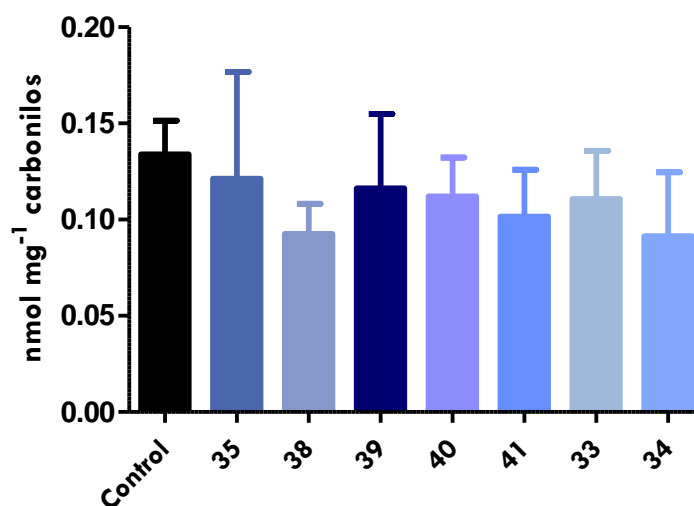


Figura 2.2.22. Niveles de carbonilos proteicos en células Caco-2 tras su incubación con los compuestos de Au(I) sintetizados (20 μ M, 24 h). Los resultados muestran el promedio de la concentración de carbonilos (nmol mg⁻¹ proteína) y las barras verticales indican los EEM (n \geq 6 experimentos).

EVALUACIÓN DE OXIDACIÓN LIPÍDICA

Al igual que ocurría en las proteínas, la peroxidación lipídica es uno de los principales resultados del daño mediado por ROS en los tejidos. Los componentes de membrana más susceptibles de oxidación son los fosfolípidos, lo que conlleva importantes cambios en las propiedades fisicoquímicas de la bicapa lipídica.⁶⁰ De hecho, según recogen estudios realizados por Nigam y Schewe, la peroxidación de los lípidos puede alterar el ensamblaje de la membrana, provocando cambios en la fluidez y la permeabilidad, alteraciones del transporte de iones e inhibición de los procesos metabólicos.⁶¹ Junto con estos cambios, la oxidación de ácidos grasos de membrana presenta una problemática adicional, ya que conlleva a la formación de radicales libres responsables de la propagación del daño celular a través de reacciones en cadena.⁶² Entre estos radicales destaca el radical lipoperóxido (LOO•), que reacciona con un lípido para producir un lípido radical y un hidroperóxido lipídico (LOOH). Los radicales LOOH son inestables y generan nuevos radicales peróxido y alcoxi, que se descomponen en productos secundarios. Algunos de los radicales libres producidos durante la peroxidación lipídica tienen efectos muy locales, debido a su corta vida; pero los productos de descomposición de los peróxidos lipídicos pueden servir como "segundos mensajeros de estrés oxidativo", debido a su vida media prolongada y su capacidad de difundirse desde su sitio.⁶³

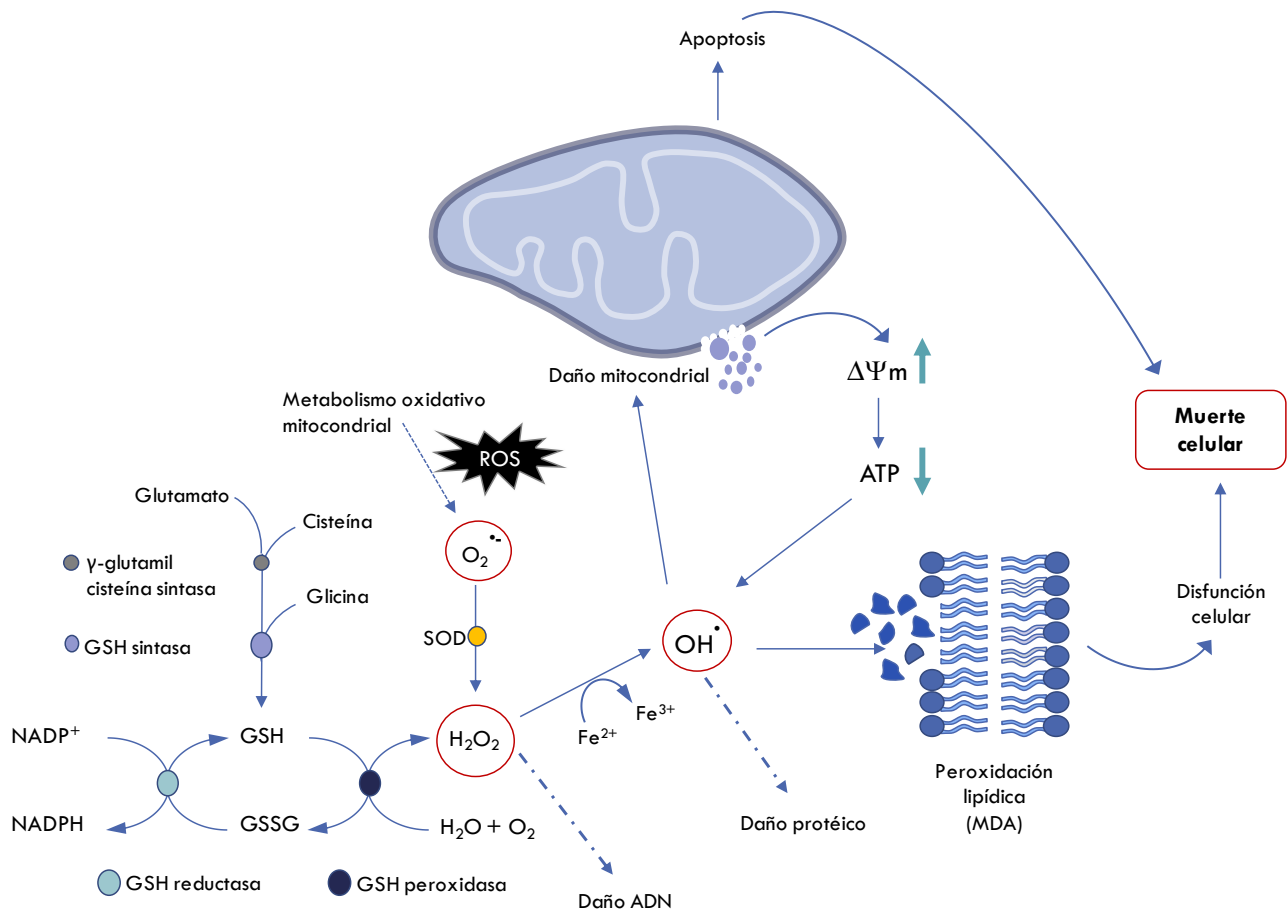


Figura 2.2.23. Mecanismos de formación de ROS para la oxidación lipídica.

Los subproductos de degradación que se forman son en su mayoría aldehídos (malonaldehído) e hidroxiderivados (4-HDA o 4-HNE), los cuales van a poder ser utilizados como biomarcadores para evaluar la oxidación de los lípidos de membrana, tal y como se recoge en la Tabla 2.2.10.

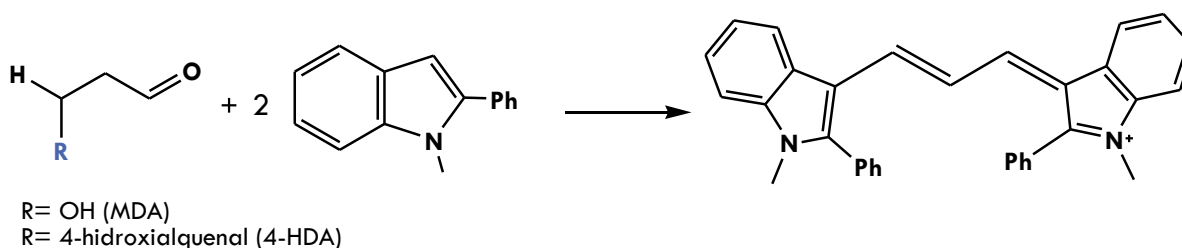
Tabla 2.2.11. Biomarcadores comunes en el estudio de estrés oxidativo sobre lípidos.⁵⁹

<i>Biomarcador</i>	<i>Indicador de...</i>
<i>Malonilaldehído (MDA)</i>	Peroxidación lipídica
<i>4-Hidroxinonenal (4-HNE)</i>	Peroxidación lipídica
<i>Oxidación de 8-isoprostaglandina</i>	Peroxidación lipídica
<i>8-iso-Prostaglandina F2α (8-isoprostano)</i>	Peroxidación lipídica
<i>Especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS)</i>	Peroxidación lipídica
<i>Lipoproteínas de alta densidad (HDL) oxidadas</i>	Oxidación lipídica
<i>Lipoproteínas de baja densidad (LDL) oxidadas</i>	Oxidación lipídica

Aunque todavía hay cierta controversia, resultados experimentales demuestran que los productos de peroxidación lipídica, MDA y 4-HNE, se ven incrementados en tejidos de cáncer colorrectal.⁶⁴ Asimismo, también aumentan significativamente los niveles de estas especies conforme la enfermedad evoluciona a estadios más avanzados.⁶⁵

Por estos motivos, además del hecho de que el MDA constituye un factor mutagénico del ADN, se ha decidido estudiar la evaluación de la peroxidación lipídica a través de la cuantificación conjunta de MDA y 4-HDA en células de la línea Caco-2 tras su incubación con los complejos de Au(I) 20 μM durante 24 h.

En lo que se refiere a la determinación de la concentración de MDA+4-HDA, se ha utilizado el método Gerard-Monnier,⁶⁶ el cual se basa en la reacción de un reactivo cromógeno, N-metil-2-fenilindol, con MDA o con 4-HDA, a una temperatura de 45°C. La condensación de una molécula de MDA o 4-HDA con dos moléculas de N-metil-2-fenilindol produce un cromóforo estable que absorbe a 586 nm (ver Figura 2.2.24).

**Figura 2.2.24.** Esquema de reacción para la detección de MDA y 4-HDA

El empleo de esta longitud de onda y de la temperatura de incubación (45°C), minimiza las interferencias presentes en otros métodos para determinar aldehídos derivados del proceso de peroxidación lipídica.

De esta forma, la concentración de MDA y 4-HDA se determina interpolando la absorbancia medida de las muestras en la curva patrón de MDA, la cual se determina paralelamente en cada ensayo. Los resultados muestran que todos los complejos testados inducen un aumento de los niveles de MDA+4-HDA en las células, tal y como se recoge en la Figura 2.2.25.

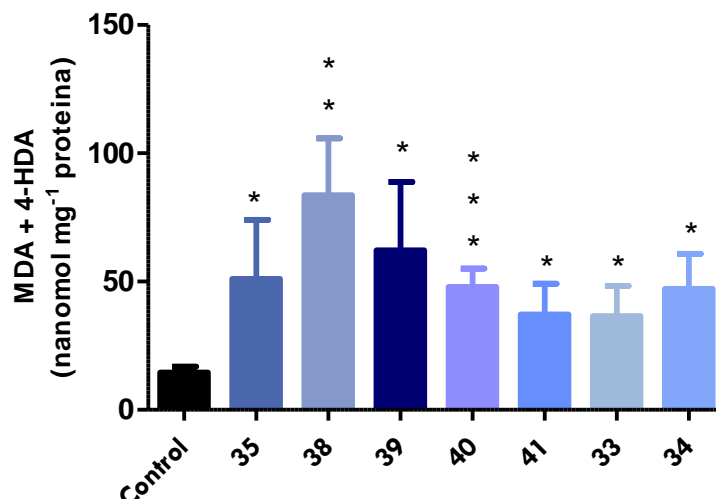


Figura 2.2.25. Niveles de MDA (malonaldehído) + 4-HDA (hidroxialquenos) en células Caco-2 tras su incubación con los compuestos de Au(I) sintetizados (20 μ M, 24 horas). Los resultados muestran el promedio de la concentración de MDA+4-HDA (nmol/mg proteína) y las barras verticales indican los EEM ($n \geq 6$ experimentos). * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ vs. control.

Como se ha descrito anteriormente, un aumento en los niveles de peroxidación lipídica va a producir un mal funcionamiento de los procesos celulares que conducen a una muerte celular programada. Es decir, que según este ensayo se puede concluir que los complejos testados inducen una muerte celular programada por una pérdida en la homeostasis redox en la bicapa lipídica. Asimismo, y dado que el MDA es un mutágeno comprobado del ADN, no se descarta que el proceso apoptótico se desencadene también por mutaciones en el ADN. Además, conviene recordar que no sólo el MDA puede causar modificaciones en el ADN, sino que las ROS pueden oxidar el ADN generando 8-hidroxi-2-deoxiguanosina.⁵³ De esta forma, y con un correcto funcionamiento del sistema de reparación del ADN, se activaría la cascada apoptótica para impedir la replicación de este ADN mutado, así como la proliferación de la célula tumoral.

ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD DE LA TIORREDOXINA REDUCTASA (TrxR)

Con base en los resultados obtenidos durante la evaluación de la peroxidación lipídica, en los que se constata elevados niveles de los marcadores MDA+4-HDA en los lípidos de membrana, se decidió estudiar el mecanismo por el cual se pierde ese equilibrio prooxidante/antioxidante que permite esta peroxidación. En el apartado anterior ya se ha comentado, que existen diferentes mecanismos antioxidantes para neutralizar las ROS o mitigar el estrés oxidativo. Estos mecanismos se pueden clasificar en:

•• Antioxidantes enzimáticos:⁶⁷⁻⁶⁸

Las enzimas antioxidantes más importantes son la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT), la glutatión peroxidasa (GPx), las tiorredoxinas (Trx) y peroxirredoxinas (PRxs). Estas enzimas trabajan juntas para neutralizar las ROS en un sistema perfectamente coordinado; por ejemplo, SOD puede convertir O_2^- en O_2 o H_2O_2 . Ésta última se transformará en H_2O y O_2 por acción de la catalasa y la glutatión peroxidasa (Figura 2.2.26).

•• Antioxidantes no enzimáticos:⁶⁹⁻⁷⁰

En esta categoría se encuentran las proteínas y metabolitos producidos por las células, como el glutati6n (GSH) o nicotinamida adenina dinucle6tido fosfato (NADPH); o provenientes de la dieta como son las vitaminas A, C y E, el selenio y el β-caroteno.

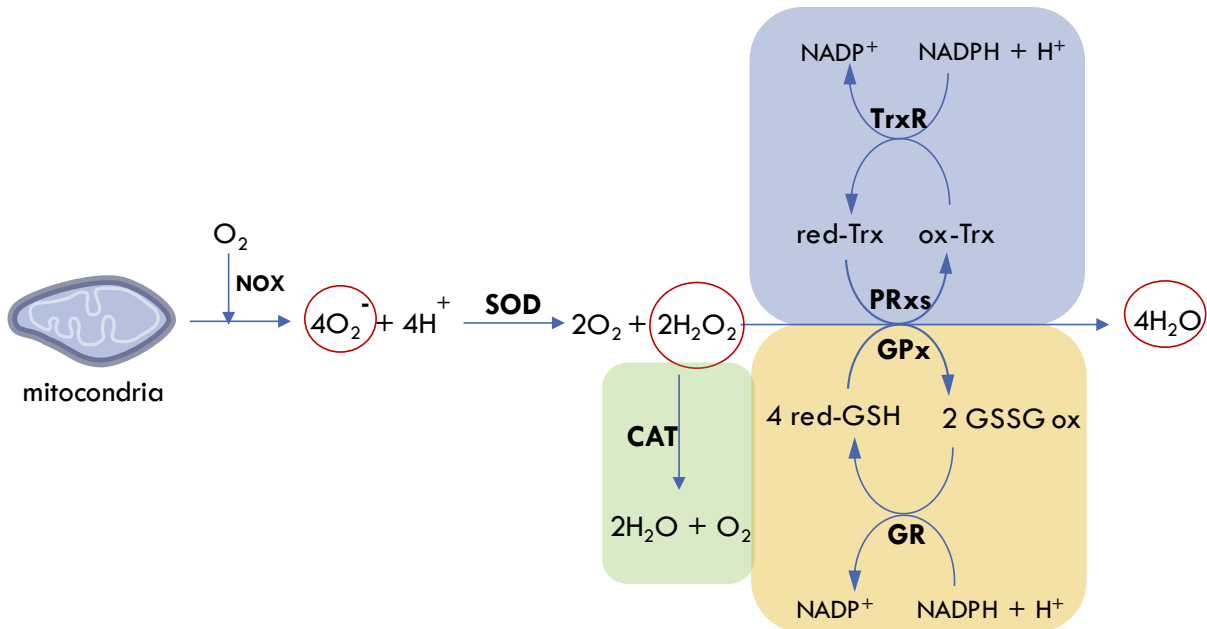


Figura 2.2.26. Mecanismo antioxidante end6geno.

Se desatacan tres v6as principales: catalasa (verde), tiorredoxina (azul) y glutati6n peroxidasa (naranja). GR, glutati6n reductasa; red-GSH, glutati6n reducido; ox-GSSG, glutati6n oxidado; red-Trx, tiorredoxina reducida; ox-Trx, tiorredoxina oxidada.

Como se recoge en la Figura anterior, las tiorredoxinas y el glutati6n suministran a las peroxidasa los electrones necesarios para convertir el H_2O_2 en H_2O (Figura 2.2.26). Por lo tanto, pueden regenerarse a partir de sus formas disulfuro oxidadas, usando NADPH como dador de electrones. Cabe destacar que estas especies, no s6lo participan de esta reacci6n, si no que “transportan” este potencial reductor a diversas enzimas y reacciones.

Los antioxidantes enzimáticos tienen efectos protectores m6s efectivos contra el ataque oxidativo debido a la capacidad de descomponer las ROS; de hecho, SOD y CAT son los mejores antioxidantes *in vivo*.⁷¹ Las otras dos v6as recogidas en la Figura 2.2.26, son las de los sistemas Trx y GSH. Ambos tienen en com6n que son antioxidantes con unidades tiol, por lo que su capacidad antioxidante reside en el 6tomo de azufre, el cual puede f6cilmente perder un electr6n sin generar problemas de estabilidad. Adem6s, ambas enzimas desempeñan un papel clave en la regulaci6n redox de procesos celulares importantes, como la s6ntesis de ADN, la transcripci6n, el crecimiento celular y la resistencia a los f6rmacos.

El GSH es el principal antioxidante soluble en todos los compartimentos celulares. El GSH desintoxica de per6xido de hidr6geno y de los per6xidos lip6dicos a trav6s de la acci6n de GSH-Px. GSH dona su electr6n al H_2O_2 para reducirlo a H_2O y O_2 . El GSSG se reduce nuevamente a GSH mediante la reductasa GSH

(GR) que usa NADPH como donador de electrones. GSH es tan abundante e importante en la defensa antioxidante, que la relación GSH-red / GSSG-ox es un indicador de medida del estrés oxidativo. Aunque, los niveles de tioredoxina son mucho menores que los de GSH; Trx y GSH pueden tener funciones superpuestas y compartimentadas en la activación y regulación de factores de transcripción.

El sistema Trx tiene una función en la reparación del ADN y las proteínas, al reducir la ribonucleótido reductasa y la metionina sulfóxido reductasa. Además, se ha encontrado que los sistemas Trx están involucrados en la respuesta inmunitaria.⁷² La Trx, además de dos unidades tiol cisteína, también contiene selenocisteína en sus sitios activos. La Trx se sobreexpresa en algunas células tumorales, lo que sugiere un papel potencial en la resistencia y proliferación tumoral; asimismo, la inhibición química o genética de Trx da como resultado una detención del ciclo celular y citotoxicidad, que se potencia cuando se combina con varios agentes anticancerosos. Por todos estos factores, se ha sugerido que tiene un papel importante en condiciones fisiológicas como patológicas, como la apoptosis,⁷³ el cáncer,⁷⁴ la inflamación crónica, las enfermedades autoinmunes o los trastornos neurodegenerativos.

De esta forma, la inhibición del sistema Trx, y más especialmente su especie reducida, se ha convertido en un objetivo clínico importante. De hecho, se ha demostrado que los inhibidores de TrxR tienen actividad antimalárica y esquistosomida,⁷⁵ y que pueden inhibir la proliferación de células tumorales en cultivo.⁷⁶ Hasta la fecha, varios de los fármacos usados se ha demostrado que son inhibidores de la TrxR, entre los que destacan compuestos de Au(I) como son el aurotiomalato o el auranofin (tratamientos de la artritis reumatoide).

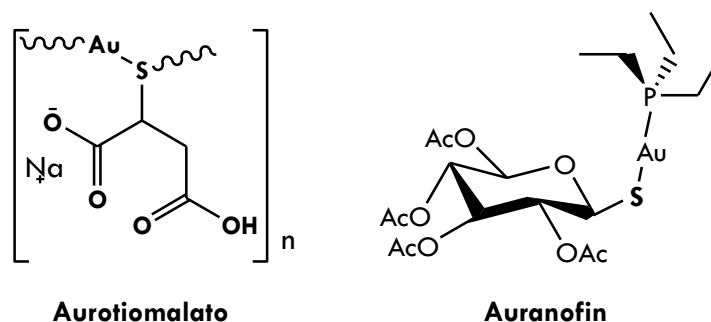


Figura 2.2.27. Estructura de aurotiomalato y auranofin, inhibidores de TrxR.

El hecho de que el sistema Trx esté tan íntimamente relacionado con procesos tumorales, así como la presencia de inhibidores demostrados de Au(I), planteó el interrogante de si los derivados de Au(I) utilizados a lo largo de esta investigación podrían haber inhibido la actividad enzimática de la TrxR. Esto habría provocado un aumento de ROS, lo que podría explicar la peroxidación lipídica encontrada en los estudios anteriores.

Para conocer si el tratamiento de las células tumorales Caco-2 con algunos de los diferentes complejos de Au(I) previamente sintetizados afectaba la actividad del sistema antioxidante TrxR, se realizó un experimento basado en la reacción recogida en la Figura 2.2.28. Se trata de la reducción del ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB) con NADPH al ácido 5-tio-2-nitrobenzoico (TNB), que presenta un color amarillo intenso y puede detectarse por absorbancia a 412 nm.

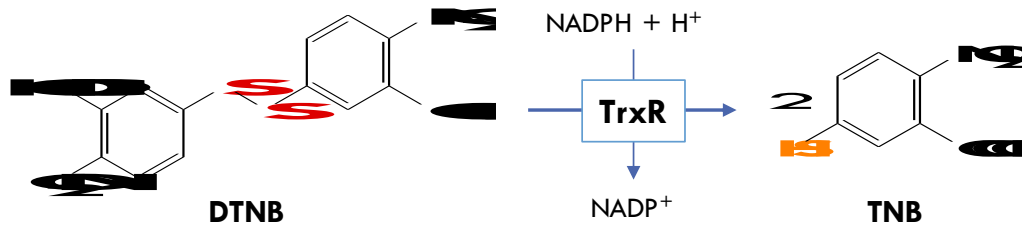


Figura 2.2.28. Reacción química para la evaluación de la actividad enzimática de la TrxR.

Sin embargo, tal y como se ha comentado con anterioridad, en el organismo existen otras enzimas que también podrían llevar a cabo esta reacción, como la glutatión reductasa y la glutatión peroxidasa. Por ello, para determinar la reducción del DNTB debida exclusivamente a la TrxR se llevan a cabo dos medidas paralelas:

- Medida de la reducción total del DTNB por la muestra
- Medida de la reducción del DTNB por la muestra en presencia de un inhibidor comercial de TrxR.

Así, la diferencia entre las dos medidas de absorbancia, es la debida a la reducción de DTNB mediada exclusivamente por la TrxR.

Para este experimento, las células Caco-2 se incubaron con los complejos de Au(I) mencionados a una concentración 20 μM durante 24 h. Así se calcularon los valores de la actividad enzimática primero, y luego la actividad específica de la TrxR que presentaban las células de cada una de las muestras tratadas con los complejos (Figura 2.2.29).

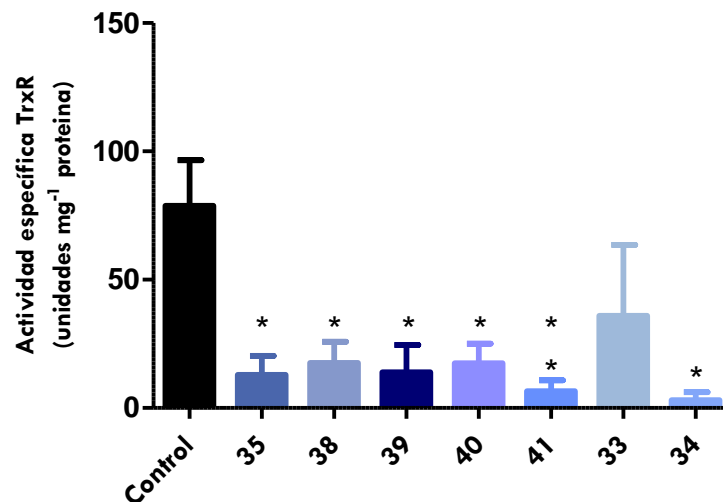


Figura 2.2.29. Actividad específica de la TrxR en células Caco-2 tras el tratamiento con los compuestos de Au(I) sintetizados (20 μ , 24 horas). Los resultados muestran el promedio de la actividad específica de la TrxR (unidades/mg proteína) y las barras verticales indican los EEM ($n \geq 4$ experimentos). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. control.

Los resultados obtenidos muestran una fuerte inhibición de la TrxR por la mayoría de los complejos testados. Cabe mencionar que el complejo **33** también apunta a una inhibición del sistema redox; sin embargo, debida a la variabilidad de los resultados obtenidos durante la reproducción del protocolo, los resultados no son significativos.

La inhibición observada es coherente con la peroxidación lipídica encontrada con todos los productos de Au(I) probados, pues al inactivar la TrxR se bloquea el ciclo Trx-PRx. De esta forma, se daría un aumento en los niveles de H₂O₂, que de no ser asumidos por GSH o CAT produciría un aumento del estrés oxidativo, y sus consecuencias.

ESTUDIOS CON CULTIVOS PRIMARIOS DE TUMORES DE RATÓN

Durante la evolución del tumor, así como a lo largo de su tratamiento, existen una serie de factores exógenos que pueden inducir un elevado número de alteraciones genotípicas y fenotípicas. Por esta razón, los cultivos celulares no son suficientes para un estudio completo y minucioso, ya que éstos, sólo representan una etapa de la progresión tumoral. Además, en función de las características del tejido del que se han derivado o, debido a la inestabilidad genética y los pasajes, ya no se parecen al tejido de origen. Sin embargo, los cultivos primarios pueden reflejar una respuesta más real de los tumores en ciertas etapas de desarrollo a nutrientes, factores de crecimiento o agentes antitumorales.⁷⁷ De esta forma, y tras los estudios *in vitro* realizados, se decidió realizar el estudio de la externalización de PS en células tumorales de colon de ratón.

Trabajar con cultivos primarios presenta una gran ventaja sobre las líneas celulares, pero también conlleva desventajas entre las que destaca su extrema sensibilidad.⁷⁸ Requieren nutrientes adicionales a los que suelen incorporar los medios de cultivo habituales, y varían en función del tipo de célula; una célula endotelial, por ejemplo, tiene requisitos nutricionales muy diferentes que una célula epitelial o una neurona, y por lo tanto requiere un medio específico.

Tabla 2.2.12. Diferencias entre las células de cultivos primarios y las provenientes de línea celular.⁷⁹

Propiedades	Células de cultivos primarios	Células de línea celular establecida
<i>Duración y proliferación celular</i>	Es finito (es decir, se limita a un número menor de divisiones celulares)	Es infinito cuando se maneja correctamente (es decir, durante un período prolongado, aproximadamente 30 divisiones celulares)
<i>Homogeneidad</i>	La variabilidad existe entre los donantes y los preparativos	Variabilidad mínima
<i>Integridad genética</i>	Retiene la composición genética del tejido <i>in vivo</i> a través de duplicaciones celulares	Sujeto a la deriva genética a medida que las células se dividen (conjunto indefinido de mutaciones)
<i>Relevancia biológica</i>	Simula más estrechamente la fisiología de las células <i>in vivo</i>	La relevancia puede derivar con el tiempo a medida que las células se dividen (relevancia biológica mínima)
<i>Facilidad de manejo (congelación-descongelación y uso)</i>	Necesita condiciones de cultivo optimizadas y un manejo cuidadoso	Existen condiciones bien establecidas y protocolos robustos
<i>Uso</i>	Necesita más tiempo y menos abundancia de células	Necesita menos tiempo y más abundancia de células

La técnica de un cultivo primario consiste en extirpar un tejido animal y cultivarlo *in vitro* como cultivo de explante, suspensión o como monocapa. Este tejido se somete a un tratamiento enzimático para obtener células disociadas que se cultivan. Las células derivadas de cultivos primarios no se transforman, lo que permite una simulación más cercana a un modelo *in vivo*,⁸⁰⁻⁸¹ proporcionando resultados más consistentes en referencia al tumor vivo. Es por esto por lo que se decidió estudiar la presencia del marcador de apoptosis, fosfatidilserina, sobre células de cáncer de colon provenientes de cáncer de colon de ratón.

Para ello se ha utilizado un modelo murino de cáncer de colon asociado a inflamación, basado en la administración de azoximetano y dextrano sulfato de sodio (DSS)

Algunos de los ratones no superaron los ciclos de DSS o fallecieron antes de poder realizar el estudio, por lo que la población de ratones inicial que finalmente desarrolló cáncer de colon se vio disminuida. En concreto, se pudieron extraer tumores de colon de un total de 10 ratones. Los ratones presentaron una media de 3.25 ± 0.47 tumores/ratón, e incluso en uno de los animales se pudo observar metástasis en órganos peritoneales. El tamaño de los tumores variaba de un ratón a otro, desde 3-4 mm hasta 1-1.5 cm, siendo la media de 2.49 ± 0.34 mm de diámetro (Figura 2.2.30).



Figura 2.2.30. Fotografías del colon de ratones con presencia de tumores de tamaño variable.

Los tumores de colon se sometieron a un proceso de digestión enzimática y las células tumorales se sembraron en placas de 96 pocillos. El protocolo para la detección de fosfatidilserina seguido es el mismo que el recogido para las células Caco-2, pero en este caso el tratamiento se puso tras 7 días de la siembra de las células tumorales, pues se observó que estas células primarias necesitaban mayor tiempo para adherirse a la superficie de la placa que las Caco-2. En la Figura 2.2.31 puede observarse la morfología de las células tumorales de colon de ratón a los 7 días post-siembra.

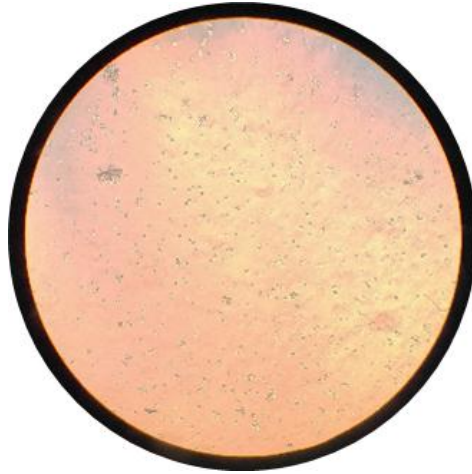


Figura 2.2.31. Células tumorales de colon de ratón tras 7 días de siembra.

Las células primarias de tumores de colon de ratón se trataron con los compuestos de Au(I) a una concentración $20 \mu\text{M}$, dejando pocillos sin tratar para tenerlos como control de la técnica. A las 24 h, se recogieron las células, se marcaron con anexina V-FITC y 7-AAD, y se analizaron por citometría de flujo obteniendo los siguientes resultados:

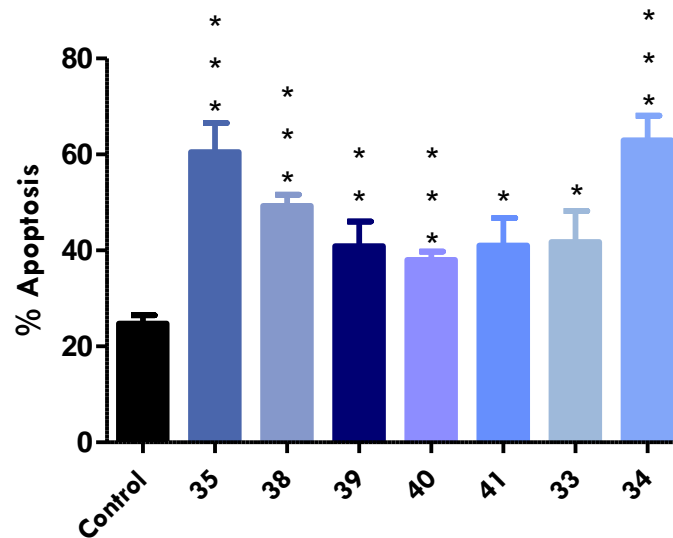


Figura 2.2.32. Niveles de apoptosis (%) detectados en células primarias de cáncer de colon de ratón tras su tratamiento con los complejos **35**, **38-41**, **33** y **34** ($20 \mu\text{M}$, 24 h). Los resultados muestran el promedio total de apoptosis (tardía+temprana) en porcentaje y las barras verticales indican los EEM ($n \geq 3$ experimentos). * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ vs. control.

Gracias al estudio de detección de PS en cultivos primarios de células tumorales de colon, se ha podido comprobar como todos los compuestos testados son inductores de apoptosis por cambio en la simetría de la

composición de la membrana, incluidos los compuestos **35**, **33** y **34**, que no parecían inducir apoptosis de una manera significativamente distinta del control en el estudio con células Caco-2. Los resultados de este estudio muestran que los tumores reales, formados por varios tipos de células y con muchas interacciones moleculares entre ellas, son más sensibles a los complejos de Au(I) sintetizados que las células epiteliales de carcinoma de colon humano. Aunque son necesarios estudios adicionales, estos resultados muestran que los compuestos de Au testados podrían ser útiles en el tratamiento del cáncer de colon.

Al igual que ocurría en el estudio sobre las Caco-2, también se analizaron los porcentajes de necrosis inducidos por los compuestos, y en ninguno de los casos se registraron valores superiores al 3.9%.

Tabla 2.2.13. Niveles (%) de necrosis encontrados en células primarias de colon de ratón tras su tratamiento con los complejos de Au(I): **35**, **38-41**, **33** y **34** (20 μ M, 24 h).

Control	35	38	39	40	41	33	34
3.85 \pm 0.71	2.10 \pm 0.40	3.72 \pm 1.11	2.95 \pm 0.83	1.35 \pm 0.28	2.20 \pm 0.27	2.27 \pm 0.19	3.10 \pm 0.68

Los resultados se expresan como la media \pm EEM ($n \geq 3$ experimentos).

BIBLIOGRAFÍA

1. Fogh, J.; Wright, W. C.; Loveless, J. D., Absence of HeLa cell contamination in 169 cell lines derived from human tumors. *J Natl Cancer Inst* **1977**, *58* (2), 209-14.
2. Turco, L.; Catone, T.; Caloni, F.; Di Consiglio, E.; Testai, E.; Stamatii, A., Caco-2/TC7 cell line characterization for intestinal absorption: how reliable is this in vitro model for the prediction of the oral dose fraction absorbed in human? *Toxicol In Vitro* **2011**, *25* (1), 13-20.
3. Briske-Anderson, M. J.; Finley, J. W.; Newman, S. M., The influence of culture time and passage number on the morphological and physiological development of Caco-2 cells. *Proc Soc Exp Biol Med* **1997**, *214* (3), 248-57.
4. Delie, F.; Rubas, W., A human colonic cell line sharing similarities with enterocytes as a model to examine oral absorption: advantages and limitations of the Caco-2 model. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* **1997**, *14* (3), 221-86.
5. Pinto, M.; Robine-Leon, S.; Appay, M. D.; Kedinger, M.; Triadou, N.; Dussaulx, E.; Lacroix, B.; Simon-Assmann, P.; Haffen, K.; Fogh, J.; Zweibaum, A., Enterocyte-like differentiation and polarization of the human-colon carcinoma cell-line Caco-2 in culture. *Biol Cell* **1983**, *47*, 7.
6. Pradines, B.; Lievin-Le Moal, V.; Vauthier, C.; Ponchel, G.; Loiseau, P. M.; Bouchemal, K., Cell line-dependent cytotoxicity of poly(isobutylcyanoacrylate) nanoparticles coated with chitosan and thiolated chitosan: Insights from cultured human epithelial HeLa, Caco2/TC7 and HT-29/MTX cells. *Int J Pharm* **2015**, *491* (1-2), 17-20.
7. Sambuy, Y.; De Angelis, I.; Ranaldi, G.; Scarino, M. L.; Stamatii, A.; Zucco, F., The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics. *Cell Biol Toxicol* **2005**, *21* (1), 1-26.
8. Hidalgo, I. J.; Raub, T. J.; Borchardt, R. T., Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability. *Gastroenterology* **1989**, *96* (3), 736-49.
9. Mosmann, T., Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* **1983**, *65* (1-2), 55-63.
10. Berridge, M. V.; Tan, A. S., Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. *Arch Biochem Biophys* **1993**, *303* (2), 474-82.
11. Berners-Price, S. J.; Filipovska, A., Gold compounds as therapeutic agents for human diseases. *Metallomics* **2011**, *3* (9), 863-73.
12. Simon, T. M.; Kunishima, D. H.; Vibert, G. J.; Lorber, A., Screening trial with the coordinated gold compound auranofin using mouse lymphocyte leukemia P388. *Cancer Res* **1981**, *41* (1), 94-7.
13. Thomas, G., *Medicinal Chemistry: An Introduction*. Wiley: 2008; p 646.
14. Csikasz-Nagy, A., Computational systems biology of the cell cycle. *Brief Bioinform* **2009**, *10* (4), 424-34.
15. DeGrendele, H., Cell-cycle inhibitors as novel therapies for lung cancer. *Clin Lung Cancer* **2002**, *4* (2), 80-2.
16. Yao, Y.; Dai, W., Genomic Instability and Cancer. *J Carcinog Mutagen* **2014**, *5*.
17. Wang, D.; Lippard, S. J., Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nat Rev Drug Discov* **2005**, *4* (4), 307-20.
18. Attardi, L. D.; de Vries, A.; Jacks, T., Activation of the p53-dependent G1 checkpoint response in mouse embryo fibroblasts depends on the specific DNA damage inducer. *Oncogene* **2004**, *23* (4), 973-80.
19. Sorenson, C. M.; Eastman, A., Influence of cis-diamminedichloroplatinum(II) on DNA synthesis and cell cycle progression in excision repair proficient and deficient Chinese hamster ovary cells. *Cancer Res* **1988**, *48* (23), 6703-7.
20. Nunez, R., DNA measurement and cell cycle analysis by flow cytometry. *Curr Issues Mol Biol* **2001**, *3* (3), 67-70.

21. DiPaola, R. S., To arrest or not to G(2)-M Cell-cycle arrest : commentary re: A. K. Tyagi et al., Silibinin strongly synergizes human prostate carcinoma DU145 cells to doxorubicin-induced growth inhibition, G(2)-M arrest, and apoptosis. *Clin. cancer res.*, 8: 3512-3519, 2002. *Clin Cancer Res* **2002**, 8 (11), 3311-4.
22. Hromas, R. A.; North, J. A.; Burns, C. P., Decreased cisplatin uptake by resistant L1210 leukemia cells. *Cancer Lett* **1987**, 36 (2), 197-201.
23. Willis, N.; Rhind, N., Regulation of DNA replication by the S-phase DNA damage checkpoint. *Cell Div* **2009**, 4, 13.
24. Vaux, D. L.; Korsmeyer, S. J., Cell death in development. *Cell* **1999**, 96 (2), 245-54.
25. Kerr, J. F.; Wyllie, A. H.; Currie, A. R., Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* **1972**, 26 (4), 239-57.
26. Alberts, B.; Johnson, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Walter, P., *Molecular Biology of the Cell*. Garland Science: 2002.
27. Klionsky, D. J., Autophagy: from phenomenology to molecular understanding in less than a decade. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2007**, 8 (11), 931-7.
28. Fadok, V. A.; de Cathelineau, A.; Daleke, D. L.; Henson, P. M.; Bratton, D. L., Loss of phospholipid asymmetry and surface exposure of phosphatidylserine is required for phagocytosis of apoptotic cells by macrophages and fibroblasts. *J Biol Chem* **2001**, 276 (2), 1071-7.
29. Marino, G.; Kroemer, G., Mechanisms of apoptotic phosphatidylserine exposure. *Cell Res* **2013**, 23 (11), 1247-8.
30. Leventis, P. A.; Grinstein, S., The distribution and function of phosphatidylserine in cellular membranes. *Annu Rev Biophys* **2010**, 39, 407-27.
31. Fadok, V. A.; Voelker, D. R.; Campbell, P. A.; Cohen, J. J.; Bratton, D. L.; Henson, P. M., Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J Immunol* **1992**, 148 (7), 2207-16.
32. Mower, D. A., Jr.; Peckham, D. W.; Illera, V. A.; Fishbaugh, J. K.; Stunz, L. L.; Ashman, R. F., Decreased membrane phospholipid packing and decreased cell size precede DNA cleavage in mature mouse B cell apoptosis. *J Immunol* **1994**, 152 (10), 4832-42.
33. Bennett, M. R.; Gibson, D. F.; Schwartz, S. M.; Tait, J. F., Binding and phagocytosis of apoptotic vascular smooth muscle cells is mediated in part by exposure of phosphatidylserine. *Circ Res* **1995**, 77 (6), 1136-42.
34. Fadok, V. A.; Bratton, D. L.; Frasch, S. C.; Warner, M. L.; Henson, P. M., The role of phosphatidylserine in recognition of apoptotic cells by phagocytes. *Cell Death Differ* **1998**, 5 (7), 551-62.
35. Meers, P.; Mealy, T., Calcium-dependent annexin V binding to phospholipids: stoichiometry, specificity, and the role of negative charge. *Biochemistry* **1993**, 32 (43), 11711-21.
36. Zembruski, N. C.; Stache, V.; Haefeli, W. E.; Weiss, J., 7-Aminoactinomycin D for apoptosis staining in flow cytometry. *Anal Biochem* **2012**, 429 (1), 79-81.
37. Modest, E. J.; Sengupta, S. K., 7-Substituted actinomycin D (NSC-3053) analogs as fluorescent DNA-binding and experimental antitumor agents. *Cancer Chemother Rep* **1974**, 58 (1), 35-48.
38. Atrian-Blasco, E.; Gascon, S.; Rodri Guez-Yoldi, M. J.; Laguna, M.; Cerrada, E., Novel Gold(II) Thiolate Derivatives Synergistic with 5-Fluorouracil as Potential Selective Anticancer Agents in Colon Cancer. *Inorg Chem* **2017**, 56 (14), 8562-8579.
39. Vergara, E.; Cerrada, E.; Clavel, C.; Casini, A.; Laguna, M., Thiolato gold(II) complexes containing water-soluble phosphane ligands: a characterization of their chemical and biological properties. *Dalton Trans* **2011**, 40 (41), 10927-35.
40. Elmore, S., Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* **2007**, 35 (4), 495-516.
41. Martinvalet, D.; Zhu, P.; Lieberman, J., Granzyme A induces caspase-independent mitochondrial damage, a required first step for apoptosis. *Immunity* **2005**, 22 (3), 355-70.
42. Igney, F. H.; Krammer, P. H., Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat Rev Cancer* **2002**, 2 (4), 277-88.

43. Launay, S.; Hermine, O.; Fontenay, M.; Kroemer, G.; Solary, E.; Garrido, C., Vital functions for lethal caspases. *Oncogene* **2005**, *24* (33), 5137-48.
44. Kuranaga, E., Beyond apoptosis: caspase regulatory mechanisms and functions in vivo. *Genes Cells* **2012**, *17* (2), 83-97.
45. Cronje, S.; Raubenheimer, H. G.; Spies, H. S. C.; Esterhuysen, C.; Schmidbaur, H.; Schierb, A.; Kruger, G. J., Synthesis and characterisation of N-coordinated pentafluorophenyl gold(I) thiazole-derived complexes and an unusual self-assembly to form a tetrameric gold(I) complex. *Dalton Trans.* **2003**, *0*, 7.
46. de Jongh, L.; Dobrzańska, L.; Strasser, C., Imine-coordinated 2-Aminoazole Complexes of Au(I): Complicating Reactions and Verification of Products by Crystal Structure Determination. *Zeitschrift für Naturforschung B* **2015**, *69* (11-12), 14.
47. Gill, J. G.; Piskounova, E.; Morrison, S. J., Cancer, Oxidative Stress, and Metastasis. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **2016**, *81*, 163-175.
48. Schieber, M.; Chandel, N. S., ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Curr Biol* **2014**, *24* (10), R453-62.
49. Veskokoukis, A. S.; Tsatsakis, A. M.; Kouretas, D., Dietary oxidative stress and antioxidant defense with an emphasis on plant extract administration. *Cell Stress Chaperones* **2012**, *17* (1), 11-21.
50. Sosa, V.; Moline, T.; Somoza, R.; Paciucci, R.; Kondoh, H.; ME, L. L., Oxidative stress and cancer: an overview. *Ageing Res Rev* **2013**, *12* (1), 376-90.
51. Urig, S.; Fritz-Wolf, K.; Réau, R.; Herold-Mende, C.; Tóth, K.; Davioud-Charvet, E.; Becker, K., Undressing of phosphine gold(I) complexes as irreversible inhibitors of human disulfide reductases. *Angew Chem Int Ed Engl.* **2006**, *45* (12), 5.
52. Ilari, A.; Baiocco, P.; Messori, L.; Fiorillo, A.; Boffi, A.; Gramiccia, M.; Di Muccio, T.; Colotti, G., A gold-containing drug against parasitic polyamine metabolism: the X-ray structure of trypanothione reductase from *Leishmania infantum* in complex with auranofin reveals a dual mechanism of enzyme inhibition. *Amino Acids* **2012**, *42* (2-3), 803-11.
53. Matsui, A.; Ikeda, T.; Enomoto, K.; Hosoda, K.; Nakashima, H.; Omae, K.; Watanabe, M.; Hibi, T.; Kitajima, M., Increased formation of oxidative DNA damage, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, in human breast cancer tissue and its relationship to GSTP1 and COMT genotypes. *Cancer Lett* **2000**, *151* (1), 87-95.
54. Halliwell, B.; Chirico, S., Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *Am J Clin Nutr* **1993**, *57* (5 Suppl), 715S-724S; discussion 724S-725S.
55. Levine, R. L., Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging, and disease. *Free Radic Biol Med* **2002**, *32* (9), 790-6.
56. Noda, N.; Wakasugi, H., Cancer and Oxidative Stress. *Japan Medical Association Journal* **2001**, *44* (12).
57. Dalle-Donne, I.; Giustarini, D.; Colombo, R.; Rossi, R.; Milzani, A., Protein carbonylation in human diseases. *Trends Mol Med* **2003**, *9* (4), 169-76.
58. Shacter, E., Protein oxidative damage. *Methods Enzymol* **2000**, *319*, 428-36.
59. Babusikova, E.; Evinova, A.; Hatok, J.; Dobrota, D.; Jurecekova, J., Oxidative Changes and Possible Effects of Polymorphism of Antioxidant Enzymes in Neurodegenerative Disease. In *Neurodegenerative Diseases*, Kishore, U., Ed. 2013.
60. Dix, T. A.; Aikens, J., Mechanisms and biological relevance of lipid peroxidation initiation. *Chem Res Toxicol* **1993**, *6* (1), 2-18.
61. Nigam, S.; Schewe, T., Phospholipase A(2)s and lipid peroxidation. *Biochim Biophys Acta* **2000**, *1488* (1-2), 167-81.
62. Catala, A., An overview of lipid peroxidation with emphasis in outer segments of photoreceptors and the chemiluminescence assay. *Int J Biochem Cell Biol* **2006**, *38* (9), 1482-95.
63. Barrera, G., Oxidative stress and lipid peroxidation products in cancer progression and therapy. *ISRN Oncol* **2012**, *2012*, 137289.
64. Skrzydlewska, E.; Stankiewicz, A.; Sulkowska, M.; Sulkowski, S.; Kasacka, I., Antioxidant status and lipid peroxidation in colorectal cancer. *J Toxicol Environ Health A* **2001**, *64* (3), 213-22.

65. Skrzydlewska, E.; Sulkowski, S.; Koda, M.; Zalewski, B.; Kanczuga-Koda, L.; Sulkowska, M., Lipid peroxidation and antioxidant status in colorectal cancer. *World J Gastroenterol* **2005**, *11* (3), 403-6.
66. Gerard-Monnier, D.; Erdelmeier, I.; Regnard, K.; Moze-Henry, N.; Yadan, J. C.; Chaudiere, J., Reactions of 1-methyl-2-phenylindole with malondialdehyde and 4-hydroxyalkenals. Analytical applications to a colorimetric assay of lipid peroxidation. *Chem Res Toxicol* **1998**, *11* (10), 1176-83.
67. He, L.; He, T.; Farrar, S.; Ji, L.; Liu, T.; Ma, X., Antioxidants Maintain Cellular Redox Homeostasis by Elimination of Reactive Oxygen Species. *Cell Physiol Biochem* **2017**, *44* (2), 532-553.
68. Gough, D. R.; Cotter, T. G., Hydrogen peroxide: a Jekyll and Hyde signalling molecule. *Cell Death Dis* **2011**, *2*, e213.
69. Kurutas, E. B., The importance of antioxidants which play the role in cellular response against oxidative/nitrosative stress: current state. *Nutr J* **2016**, *15* (1), 71.
70. Birben, E.; Sahiner, U. M.; Sackesen, C.; Erzurum, S.; Kalayci, O., Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organ J* **2012**, *5* (1), 9-19.
71. Christofidou-Solomidou, M.; Muzykantov, V. R., Antioxidant strategies in respiratory medicine. *Treat Respir Med* **2006**, *5* (1), 47-78.
72. Lu, J.; Holmgren, A., The thioredoxin antioxidant system. *Free Radic Biol Med* **2014**, *66*, 75-87.
73. Tonissen, K. F.; Di Trapani, G., Thioredoxin system inhibitors as mediators of apoptosis for cancer therapy. *Mol Nutr Food Res* **2009**, *53* (1), 87-103.
74. Selenius, M.; Rundlof, A. K.; Olm, E.; Fernandes, A. P.; Bjornstedt, M., Selenium and the selenoprotein thioredoxin reductase in the prevention, treatment and diagnostics of cancer. *Antioxid Redox Signal* **2010**, *12* (7), 867-80.
75. Sannella, A. R.; Casini, A.; Gabbiani, C.; Messori, L.; Bilia, A. R.; Vincieri, F. F.; Majori, G.; Severini, C., New uses for old drugs. Auranofin, a clinically established antiarthritic metallodrug, exhibits potent antimalarial effects in vitro: Mechanistic and pharmacological implications. *FEBS Lett* **2008**, *582* (6), 844-7.
76. Angelucci, F.; Miele, A. E.; Boumis, G.; Brunori, M.; Dimastrogiovanni, D.; Bellelli, A., Macromolecular bases of antischistosomal therapy. *Curr Top Med Chem* **2011**, *11* (16), 2012-28.
77. Tong, W. M.; Bises, G.; Sheinin, Y.; Ellinger, A.; Genser, D.; Potzi, R.; Wrba, F.; Wenzl, E.; Roka, R.; Neuhold, N.; Peterlik, M.; Cross, H. S., Establishment of primary cultures from human colonic tissue during tumor progression: vitamin-D responses and vitamin-D-receptor expression. *Int J Cancer* **1998**, *75* (3), 467-72.
78. Welsch-Alves, J. The Advantages and Difficulties of Working with Primary Cells.
79. Aldrich, S. Primary Cell Culture. <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/primary-cell-culture.html>.
80. Pan, C.; Kumar, C.; Bohl, S.; Klingmueller, U.; Mann, M., Comparative proteomic phenotyping of cell lines and primary cells to assess preservation of cell type-specific functions. *Mol Cell Proteomics* **2009**, *8* (3), 443-50.
81. Alge, C. S.; Hauck, S. M.; Priglinger, S. G.; Kampik, A.; Ueffing, M., Differential protein profiling of primary versus immortalized human RPE cells identifies expression patterns associated with cytoskeletal remodeling and cell survival. *J Proteome Res* **2006**, *5* (4), 862-78.

ESTUDIOS FARMACOCINÉTICOS

La farmacocinética es la ciencia que estudia la absorción, la distribución, el metabolismo y la eliminación de los fármacos;¹ estudios necesarios para confirmar la bondad de un compuesto para la aplicación en medicina. De hecho, optimizar las propiedades fisicoquímicas es uno de los retos del diseño y desarrollo de un fármaco. Hoy en día, al conjunto de propiedades a estudiar durante los ensayos farmacocinéticos es lo que se conoce como propiedades ADME-tox. Tal y como se mencionó en el Capítulo 2 (Parte I), las propiedades farmacológicas que hacen de una molécula un medicamento potencial: solubilidad, absorción, permeación y difusión; acompañado de buena estabilidad y baja toxicidad. Por ello, en esta sección se recogen los diferentes ensayos realizados para intentar conocer a qué procesos somete el organismo a los compuestos sintetizados; y así poder evaluar su idoneidad para su uso como quimioterápico.

Reglas como la ya mencionada Regla de Lipinski, han favorecido la investigación sobre el desarrollo de compuestos con aplicación en medicina, gracias a la elaboración de directrices empíricas sobre los parámetros a optimizar en la elaboración de un posible fármaco. A nivel académico, ha permitido también estudiar las propiedades ADME-tox para buscar un equilibrio entre actividad y propiedades fisicoquímicas.

Todos los complejos descritos en este trabajo, y cuya actividad antitumoral ya ha sido evaluada, han sido diseñados para lograr compuestos con características óptimas que los harían buenos candidatos para aplicaciones biológicas. Cada una de las partes de los complejos van a influir notablemente en las prestaciones finales del compuesto; por ello, no sólo el metal elegido es un factor clave para una buena actividad biológica, sino también es necesario elegir cuidadosamente ligandos que proporcionen estabilidad, solubilidad, un equilibrio óptimo entre hidrofiliidad y lipofilia, etc. Son precisamente en estas propiedades en las que se ha centrado esta investigación para determinar si la molécula sintetizada cumple con los requisitos necesarios para ser utilizado como fármaco.

La solubilidad en agua de los diferentes complejos de Au(III) y Au(I) ya se ha recogido en el capítulo anterior, donde se observó que las solubilidades en agua no eran demasiado elevadas. Cheng y Merz establecieron la relación entre la solubilidad y la aplicación como fármacos mediante el cálculo del parámetro $\text{Log}(S_w)$.²

Tabla 2.3.1. Relación entre el $\text{Log}S_w$ del complejo y su aplicación como fármaco

Ranking	Valor Solubilidad	Aplicabilidad del fármaco
0	$\text{Log}(S_w) < -8$	No, imposible
1	$-8 < \text{Log}(S_w) < -6$	No, pero no imposible
2	$-6 < \text{Log}(S_w) < -4$	Sí, baja
3	$-4 < \text{Log}(S_w) < -2$	Sí, buena
4	$-2 < \text{Log}(S_w) < 0$	Sí, óptima
5	$0 < \text{Log}(S_w)$	No, muy soluble

Este estudio ha permitido comprobar que todos los complejos recogidos en este trabajo se encuentran en el rango de lo observado para una buena aplicación de fármacos, tal y como se recoge en la siguiente Tabla.

Tabla 2.3.2. Valores de Log(S_w) calculados para los complejos sintetizados.

Compuesto de Au(III)				Compuesto de Au(I)	
	tpy	ppy	bzp		
[Au(Spym) ₂ L]	-3.85	-3.88	-3.77	[AuCl(HMPT)]	-2.90
[Au(S(Me) ₂ pym) ₂ L]	-3.93	-3.96	-3.83	[Au(Spy) HMPT]	-3.66
[AuCl(2-Tiouracilo)L]	-3.86	-3.85	-3.87	[Au(Spym) HMPT]	-3.42
[Au(tiourea) ₂ L]	-3.54	-3.50	-3.60	[Au(S(Me) ₂ pym) HMPT]	-3.05
[Au(p-etinil tolueno) ₂ L]	-3.77	-3.61		[Au(2-Sbenzotiazol) HMPT]	-3.57
[Au(2-etinil piridina) ₂ L]	-3.46	-3.40		[Au(2-Stiazolina) HMPT]	-3.19
[Au(OAc) ₂ L]	-3.06	-2.81	-2.61	[Au(2-Sbenzimidazol) HMPT]	-3.46
[Au(fenilalanina)L]Cl	-3.52	-3.59	-3.40	[Au(2-Tiouracilo) HMPT]	-3.17
[Au(metionina)L]Cl	-3.30	-3.33		[Au(Fenilacetileno)HMPT]	-3.49
				[Au(Tolilacetileno) HMPT]	-3.54
				[Au(4-OMe-facetileno) HMPT]	-3.39
				[Au(4-Br-fenilacetileno) HMPT]	-3.75
				[Au(4-Cl-fenilacetileno) HMPT]	-3.69
				[Au(2-etinilpiridina) HMPT]	-3.29
				[Au(3-etinilpiridina) HMPT]	-3.22

***tpy:** 2-tolil piridina, **ppy:** 2-fenil piridina, **bzp:** 2-bencil piridina.
Los cuadros oscuros representan complejos no obtenidos

COEFICIENTE DE REPARTO OCTANOL/AGUA: LogP_{ow}

Los resultados de solubilidad en agua son relevantes y un factor a tener en cuenta, ya que puede influir en la absorción y distribución de la molécula. Pero si bien es importante, más lo es aún la evaluación del coeficiente de reparto. El cálculo de este parámetro arroja información sobre el equilibrio en la lipofilia y hidrofiliidad del complejo; una valiosa información pues, el equilibrio de estas dos propiedades va a ser determinante para la correcta biodistribución del compuesto. La lipofilia de un compuesto está directamente relacionada con su difusión y penetración en la membrana bicapa lipídica de las células, lo que no sólo va a determinar su actividad citotóxica, sino también va a condicionar su toxicidad sobre los tejidos sanos. Además, está directamente relacionado con la unión a proteínas plasmáticas y el metabolismo del fármaco.³

Para el cálculo del coeficiente de reparto suele utilizarse el sistema agua/octanol porque es el que tiene una mayor cantidad de estudios realizados y por ello, una mayor base de datos. Sin embargo, la fase orgánica debería de elegirse en función de la zona donde el fármaco va a realizar su actividad biológica; así, el n-octanol es el indicado para estudios sobre el sistema gastrointestinal, el aceite de oliva para estudios sobre la membrana sangre-cerebro, y el cloroformo para los tejidos bucales.⁴ De esta forma, la fase orgánica seleccionada es n-octanol. En lo referente a la fase acuosa, en un intento por simular más estrictamente las condiciones fisiológicas se ha reemplazado el agua por un tampón a pH=7.4 de naturaleza acuosa, PBS (Phosphate-buffered Saline)

El coeficiente de reparto diferencia de complejos neutros donde se denomina logP_{pH}, de moléculas ionizables donde se trata como logD_{pH}. En ambos casos, el cálculo se ha realizado según la siguiente ecuación:

$$\log P/D_{7.4} = \log \frac{[\text{complejo}]_{F. \text{ orgánica}}}{[\text{complejo}]_{F. \text{ acuosa}}}$$

Ecuación 2.3.1. Fórmula para el cálculo de LogP/D_{pH}.

A pesar de que Lipinski estableció que para un fármaco el valor del LogP debía ser inferior a 5, los rangos ideales de lipofilidad son más restrictivos; siendo $-1 \leq \log P \leq 3$ para una mayor aplicabilidad, aunque para absorción oral o intestinal el valor ideal oscila entre 1.35-1.80.⁵

La medida del LogP en este trabajo se realizó mediante el método *shake flask*, o lo que es lo mismo el método del matraz agitado; no sólo por la robustez del método sino también por su simplicidad (ver Parte Experimental: Estudios farmacocinéticos).⁶ De esta forma, se han calculado los valores de logP para los complejos de Au(III) y Au(I).

Tabla 2.3.3. Valores de logP de los complejos de Au(I).

Compuesto	Log P _{7.4}	Código
Cisplatino	-0.53	
Auranofin	-2.53	
[Au(2-Mercaptopiridina)HMPT]	0.93	28
[Au(2-Mercaptopirimidina)HMPT]	1.20	29
[Au(2-Mercapto-4,6-Dimetilpirimidina)HMPT]	1.30	30
[Au(2-Mercaptobenzotiazol)HMPT]	0.98	31
[Au(2-Mercaptotiazolina)HMPT]	0.74	32
[Au(2-Mercaptobenzimidazol)HMPT]	0.89	33
[Au(2-Tiouracil)HMPT]	0.66	34
[Au(Fenilacetileno)HMPT]	0.63	35
[Au(Tolilacetileno)HMPT]	1.33	36
[Au(4-Br-fenilacetileno)HMPT]	0.91	38
[Au(4-Cl-fenilacetileno)HMPT]	1.03	39
[Au(2-etinilpiridina)HMPT]	1.24	40
[Au(3-etinilpiridina)HMPT]	1.20	41

Con estos resultados se puede concluir que, aunque todos los compuestos de Au(I) tienen valores muy adecuados de logP, cabe mencionar que los que incorporan unidades tiol muestran en general valores ligeramente más pequeños que los que poseen unidades acetiluro. Como era de esperar, los compuestos [Au(Tolilacetileno)HMPT] **36** y [Au(2-Mercapto-4,6-Dimetilpirimidina)HMPT] **30** muestran un mayor carácter lipófilo que sus análogos sin grupos metilo, pues este grupo favorece la lipofilidad. El aumento del carácter hidrófobo se hace más evidente en el complejo **36**, ya que en el caso del complejo **30** también contiene átomos de N capaces de realizar enlaces de hidrógeno capaces de compensar ese aumento de lipofilidad (Figura 2.3.1).

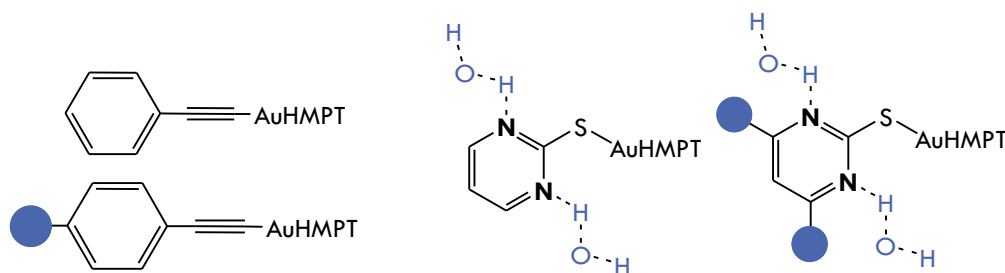


Figura 2.3.1. Estructuras sintetizadas para el estudio de la influencia de grupos Me.

Sin embargo, no sólo los grupos Me disminuyen la hidrofiliidad de un compuesto, también muestran este efecto los anillos aromáticos tal y como se ha comprobado mediante la determinación de logP con las estructuras [Au(2-Mercaptobenzotiazol)HMPT] **31** y [Au(2-Mercaptotiazolina)HMPT] **32**. Éste último presenta una mayor solubilidad en agua que su análogo con un anillo bencénico fusionado. Asimismo, como ya se ha mencionado en los derivados con pirimidina, la presencia de un átomo dador o aceptor de enlaces de hidrógeno también contribuye positivamente a un aumento de la solubilidad en agua, tendencia que se demuestra al reemplazar el átomo de S en la unidad benzotiazol por NH en el benzoimidazol. A pesar de que el átomo de S también puede generar enlaces de H, éstos son mucho más débiles que los que forma el N; por ello, aunque el anillo bencénico sigue aumentando la lipofiliidad, la presencia de ese grupo amina en el benzoimidazol equilibra en cierta medida el carácter lipófilo/hidrófilo.

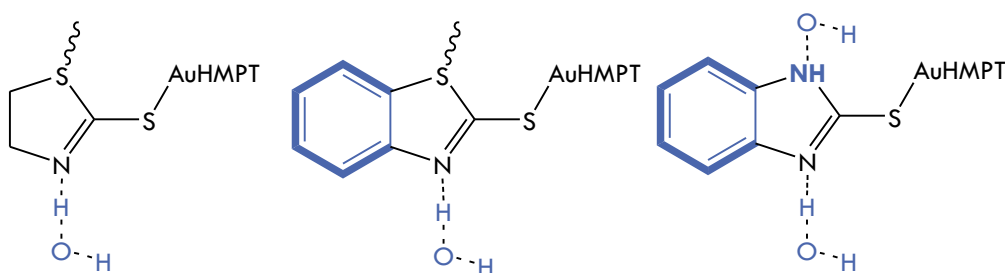


Figura 2.3.3. Estructuras sintetizadas para el estudio de la influencia de anillos aromáticos y enlaces de hidrógeno.

En un intento por relacionar los valores de logP medidos con los valores de IC₅₀ para la línea tumoral Caco-2, se observa como valores más próximos a la unidad de logP, es decir un ligero predominio del carácter lipófilo es positivo para una mayor citotoxicidad. Esto podría ser debido a que esta propiedad es decisiva para la permeabilidad del complejo en la bicapa lipídica, primera de las barreras que se va a encontrar el fármaco para desempeñar su función antitumoral.

Tabla 2.3.4. Valores de logP e IC₅₀.

Compuesto	Log P _{7.4}	IC ₅₀	Código
[Au(2-Mercaptopiridina)HMPT]	0.93	3.87±0.15	28
[Au(2-Mercaptopirimidina)HMPT]	1.20	3.08±0.14	29
[Au(2-Mercapto-4,6-Dimetilpirimidina)HMPT]	1.30	3.17±0.10	30
[Au(2-Mercaptobenzotiazol)HMPT]	0.98	3.16±0.20	31
[Au(2-Mercaptotiazolina)HMPT]	0.74	7.40±0.10	32
[Au(2-Mercaptobenzimidazol)HMPT]	0.89	4.50±0.10	33
[Au(2-Tiouracil)HMPT]	0.66	4.55±0.11	34

Esta tendencia no es clara ya que, en el caso de los complejos con la unidad pirimidínica, el carácter lipófilo del complejo con los grupos Me es superior, a pesar de que la actividad citotóxica es ligeramente inferior.

En lo que respecta a los derivados de Au(III) con enlace Au-S, los logP calculados indican un marcado carácter lipófilo salvo en el caso de los complejos con unidades tiourea. Este hecho parece indicar que el impedimento estérico del ligando aniónico es más determinante que los factores mencionados en el estudio sobre los derivados de Au(I)-S. Por supuesto, la presencia de dos grupos amina en la tiourea son también claves en la mayor hidrofiliidad de los complejos.

Tabla 2.3.5. Valores de logP de los complejos de Au(III).

Compuesto	tpy	Código	ppy	Código	bzp	Código
1 [AuCl ₃ (HL)]	0.67	P1	1.08	P1	0.78	P1
2 [AuCl ₂ L]	1.88	1	3.73	1	1.23	1
3 [Au(Spym) ₂ L]	2.04	4	0.61	4	0.44	4
4 [Au(S(Me) ₂ pyrim) ₂ L]	0.92	7	1.66	7	1.14	7
5 [AuCl(2-Tiouracilo)L]	0.57	10	0.85	10	1.60	10
6 [Au(tiourea) ₂ L]	-0.18	13	-0.30	13	0.005	13
7 [Au(OAc) ₂ L]	2.03	16	0.69	16	0.56	16
8 [Au(fenilalanina)L]Cl	0.34	19	0.47	19	0.87	19
9 [Au(metionina)L]Cl	0.47	22	0.58	22	-	22
10 [Au(p-etinil tolueno) ₂ L]	1.05	24	1.14	24	-	24
11 [Au(2-etinil piridina) ₂ L]	0.78	26	1.09	26	-	26

Según los valores de LogP determinados experimentalmente para los complejos de Au(III), se puede observar como todos los complejos sintetizados poseen un LogP dentro del rango de idoneidad; de hecho, la mayoría de los casos se encuentran entre 0-1, lo que implica un equilibrio óptimo entre las propiedades de lipofiliidad e hidrosolubilidad. Mención especial merecen los derivados con unidades tiourea (Tabla 2.3.5, entrada 6), puesto que son los únicos complejos de los estudiados con mayor carácter hidrófilo que hidrófobo, aunque con estos complejos se ha conseguido compensar perfectamente sendas propiedades. Así, el complejo [Au(tiourea)₂bzp] consigue un valor de LogP muy próximo a 0.

Es importante mencionar también, que el complejo ciclometalado es mucho más hidrófobo que su precursor [AuCl₃(HL)] (Tabla 2.3.5, entradas 1 y 2 respectivamente), lo que confirma que la rigidez del sistema disminuye notoriamente la solubilidad en agua de los complejos.

Este estudio ha sido sumamente útil, no sólo para entender la baja actividad de los complejos de Au(III), sino también para poder acotar los complejos con verdadero potencial; algo que, de cara a futuras investigaciones, constituye un punto de partida ya optimizado. Puesto que sí que se puede concluir que el ligando neutro fenilpiridina (ppy), es el que logP más lejanos a 0 genera.

ESTABILIDAD EN CONDICIONES FISIOLÓGICAS

Todo compuesto al que se le pretende una aplicación médica debe ser estable en disolución, o lo que es lo mismo, no debe modificar su estructura o composición por reacción con los componentes presentes en el medio intracelular, ya que esto podría comprometer su actividad. Sin embargo, reacciones como la hidrólisis en las que se va a producir la sustitución de un ligando por un grupo OH, suelen ser comunes en condiciones fisiológicas. Asimismo, también pueden tener lugar procesos redox del centro metálico o de los ligandos. Este tipo de transformaciones pueden derivar a dos tipos de situaciones:

- .. Disminución de la actividad por modificación del compuesto: problemas relacionados con la estabilidad química reducen la concentración de los compuestos en la solución llevando a una aparente pérdida de actividad.
- .. Aumento de la actividad: lo que implica que se requiere de la activación *in situ* del complejo en el medio fisiológico. Esto es lo que sucede en el caso de que el complejo constituya un profármaco.

El segundo de los casos es más común de lo que podría esperarse, de hecho, el *cis*-platino se ha confirmado que a través de procesos de hidrólisis genera la especie activa: $[\text{Pt}(\text{H}_2\text{O})_2(\text{NH}_3)_2]$.

Estos cambios en la estructura química pueden ser catalizados por el pH propio de la disolución o la temperatura del ensayo que, para experimentos biológicos, debe ser de pH=7.4 y una temperatura de 37 °C. En cualquiera de los casos, conviene estudiar la estabilidad de los complejos en estas condiciones para poder comprender mejor su actividad; y de ser necesario, corregir su estructura.

En esta investigación se ha realizado el estudio de estabilidad a través de medidas de UV-vis en condiciones fisiológicas. Estas condiciones se han simulado utilizando, como en el estudio del coeficiente de reparto, el tampón PBS y un baño termostático para mantener la temperatura a 37°C de forma constante. El tampón PBS no sólo mantiene el pH=7.4, si no que a su vez logra una osmolaridad similar a la presente en el cuerpo humano por su contenido en NaCl y KCl.

Dado que los complejos utilizados no son demasiado solubles en agua, todos los ensayos biológicos se han realizado previa disolución en DMSO (20 mM), y a continuación se ha llevado a un volumen final de 15 ml con PBS, para tener una concentración final de $5 \cdot 10^{-5}$ M. Así, la concentración final de DMSO en la cubeta de medida es 0.5%. La medida se realiza en el rango de $\lambda=200-800$ nm durante 24h.

ESTABILIDAD DE LOS COMPLEJOS DE Au(I)

En el caso de los complejos de Au(I) con residuos tiol encontramos dos casos diferenciados que se resumen con los espectros recogidos en la Figura 2.3.4. Así mientras complejos como [Au(2-Mercaptopirimidina)HMPT] no presenta cambios a lo largo de las 24h, demostrando una buena estabilidad en las condiciones fisiológicas; otros complejos como el complejo [Au(2-Mercaptotiazolina)HMPT] muestra una disminución de la intensidad de absorbancia transcurridas las primeras 4h, para luego ya estabilizarse. Una de cosas sobre las que prestar atención es la formación de Au(0), ya que se podría bioacumular especialmente en el riñón con efectos muy negativos. Este hecho no se ha observado en ninguno de los casos, puesto que no se ha encontrado ninguna banda a $\lambda=550$ nm.

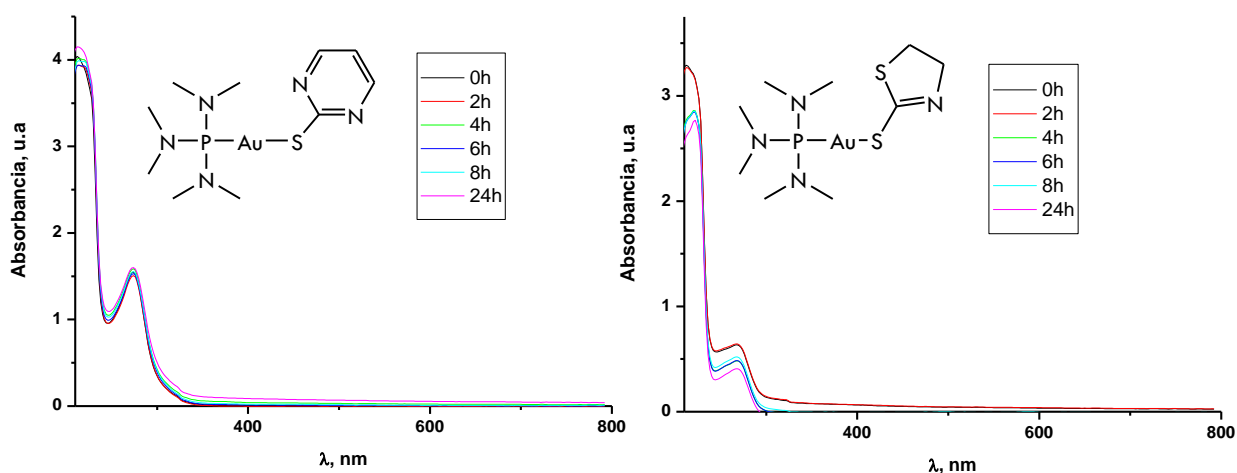


Figura 2.3.4. Espectros de UV-vis de los complejos [Au(2-Mercaptopirimidina)HMPT] **29** (izq.) y [Au(2-Mercaptotiazolina)HMPT] **32** (drcha.) durante 24 horas.

En los complejos con residuos acetiluro no se detectaron modificaciones significativas en la posición y/o intensidad de las bandas más allá de las 24 h, lo que indica la gran estabilidad de estos compuestos. La variación de absorbancia no parece significativamente distinta; lo que indicaría que esa variabilidad se debe a la incertidumbre inherente a la medida. Aunque estas pequeñas modificaciones también podrían deberse a una hidrólisis parcial del complejo, se descarta por la ausencia de desplazamientos de las bandas o por la formación de nuevas.

Los anillos bencénicos monosustituídos tienen por norma general cuatro bandas, aunque una de ellas la transición $n \rightarrow \pi^*$ suele presentarse con muy baja intensidad.

Tabla 2.3.6. Intervalos típicos de bencenos sustituidos.

	Transición	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	ϵ
	$\pi \rightarrow \pi^*$ (permitida)	180-230	2000-10000
	$\pi \rightarrow \pi^*$ (prohibida)	250-290	100-2000
	$\pi \rightarrow \pi^*$	220-250	10000-30000
	(sustituyente conjugado con el anillo: banda K)		
	$n \rightarrow \pi^*$	275-350	10-100
	(sustituyente con pares de e^- sin compartir: banda R)		

El benceno, por sí sólo, solamente va a presentar las bandas $\pi \rightarrow \pi^*$ (permitida y prohibida), las cuales van a experimentar desplazamientos batocrómicos en función del sustituyente; es decir, que respecto del anillo bencénico sin sustituir (Tabla 2.3.6. entrada 1), las bandas $\pi \rightarrow \pi^*$ se van a desplazar a mayores longitudes de onda, tal y como se recoge en la Tabla 2.3.7.

Tabla 2.3.7. Ejemplos de la influencia del sustituyente del anillo bencénico en el espectro de UV-vis.⁷

	Sustituyente R	$\pi \rightarrow \pi^*$ (permitida)	$\pi \rightarrow \pi^*$ (prohibida)	$\pi \rightarrow \pi^*$ (Banda K)	$n \rightarrow \pi^*$ (Banda R)
1	-H	198 ($\epsilon=8000$)	255 ($\epsilon=230$)		
2	-CH ₃	208 ($\epsilon=7900$)	262 ($\epsilon=230$)		
3	-Cl	210 ($\epsilon=7500$)	257 ($\epsilon=170$)		
4	-C=CH		278 ($\epsilon=650$)	236 ($\epsilon=12500$)	
5	-NH ₂	230 ($\epsilon=8600$)	280 ($\epsilon=1430$)		

En el caso del fenilacetileno se observan dos bandas, 235 y 246 nm, siendo las bandas K y la transición $\pi \rightarrow \pi^*$ permitida, ya que son de intensidades muy similares. La banda $\pi \rightarrow \pi^*$ prohibida queda embebida entre estas dos bandas ya que son muy intensas y cercanas en desplazamiento.

Una vez conocidas las señales del ligando presente en la molécula, se procede a realizar la asignación de las bandas presentes en el espectro de UV-vis del complejo de Au(I) sintetizado. En el espectro, se pueden observar dos bandas, a 210 y 270 nm aproximadamente (Figura 2.3.5); así, para una asignación más precisa se ha realizado el cálculo teórico del desplazamiento esperado para la transición $\pi \rightarrow \pi^*$ permitida para benceno polisustituidos (Tabla 2.2.2.8)

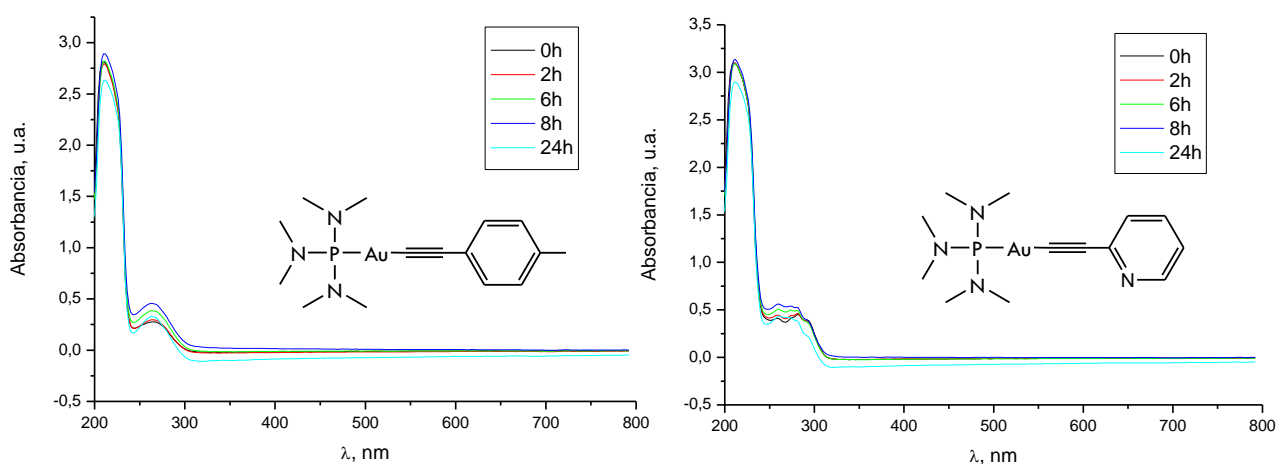


Figura 2.3.5. Espectros de UV-vis de los complejos [Au(Tolilacetileno)HMPT] **36** (izq.) y [Au(2-etinilpiridina)HMPT] **40** (drcha.) durante 24 horas.

Tabla 2.3.8. Cálculo de la posición de la transición $\pi \rightarrow \pi^*$ permitida para benceno polisustituidos.⁷

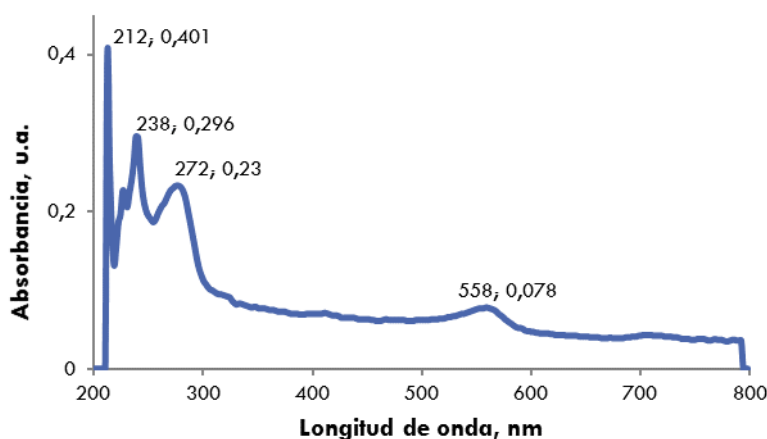
Sustituyente R	Incremento	Valor teórico	Valor experimental
Valor ref: 203.5			
-CH₃	3.0	206.5	209
-Cl	6.0	209.5	210
-Br	6.5	210	210

Con base en estos desplazamientos, se ha podido concluir que la señal más intensa es la debida a la transición $\pi \rightarrow \pi^*$ permitida, mientras que la menos intensa se atribuye a la $\pi \rightarrow \pi^*$ prohibida.

Por otro lado, cabe destacar que, como ocurría con los derivados tiolato, tampoco se dan bandas que indiquen la formación de Au metálico.

No obstante, y dado que los estudios *in vitro* se han realizado en medio DMEM suplementado (ver Parte Experimental), se decidió realizar medidas en PBS con el medio de cultivo al 20% (v/v). Este estudio pretende conocer si los complejos siguen siendo estables a estas condiciones, para determinar si la especie activa es o no, el complejo sintetizado.

El espectro va a cambiar drásticamente al trabajar con PBS al que se le ha añadido medio completo, ya que ahora el propio medio de disolución presenta cuatro bandas, tal y como se puede observar en el espectro siguiente:

**Figura 2.3.6.** Espectro de absorción de PBS+20% de medio completo.

Esas cuatro bandas se van a mantener en la mayoría de los casos, aunque con variaciones en lo que respecta a desplazamiento e intensidad. Asimismo, aparecerán las bandas propias de los complejos de Au(I).

El comportamiento de los complejos en estas condiciones, fue similar al observado en PBS, aunque casos como en el del complejo **35** se observaron cambios drásticos de intensidad coherentes con procesos de hidrólisis, o como consecuencia de la interacción del complejo con proteínas u otros componentes del medio.⁸

De entre todos los complejos testados, los complejos **40** y **41** son los que menores variaciones presentan a lo largo de las 24h; si bien es cierto que la intensidad es muy poco variable, las bandas muestran un

desplazamiento a mayores longitudes de onda (batocrómico) con el tiempo. Este tipo de desplazamiento lo suele producir grupos que poseen pares de electrones libres, como es el caso de los grupos hidróxilo; lo que podría significar que se están dando procesos de hidrólisis. En el caso del complejo **40**, la intensidad de absorbancia se podría considerar constante durante las 24h; sin embargo, **41** experimenta un desplazamiento hipercrómico a lo largo de las primeras cuatro horas, para después disminuir su intensidad (hipsocrómico). Estudios realizados con complejos de Au(III), Casini *et al.* proponen que ese efecto hipercrómico se puede atribuir a la formación de enlaces Au-O.⁸

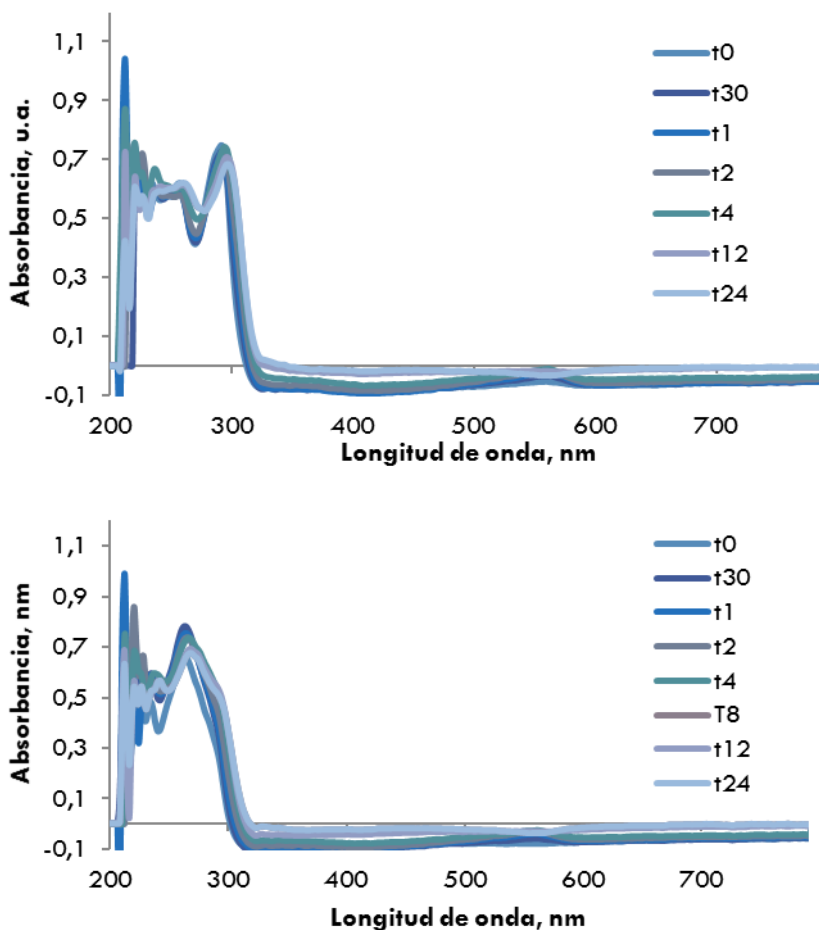


Figura 2.3.7. Espectros de absorbancia durante 24h de los complejos **40** (arriba) y **41** (abajo).

El resto de los complejos de Au(I) no exhiben una tendencia clara, aunque sí parece evidente que experimentan algún tipo de reacción lateral ya que se dan cambios importantes en la intensidad de la absorbancia, así como variaciones en el desplazamiento de las bandas propias del complejo (ver anexos).

Así pues, se puede concluir que los compuestos los complejos de Au(I) presentan buena estabilidad en el medio acuoso PBS; pero que al utilizar un medio más complejo como el PBS+20% de medio de cultivo, complejos como el **41** parece mostrar cambios indicativos de procesos de hidrólisis, así como procesos de descomposición como el caso de **34**. Cabe destacar, que el complejo **40** muestra una buena estabilidad en los dos medios testados, esto es importante puesto que permite deducir que no hay cambios en su estructura y que, por tanto, la especie activa es la especie sintetizada.

ESTABILIDAD DE LOS COMPLEJOS DE Au(III)

Al igual que en el caso de los complejos de Au(I), las medidas de estabilidad en condiciones fisiológicas de los derivados de Au(III) se ha restringido a los complejos potencialmente aplicables a su uso en el tratamiento para el cáncer, dando especial importancia a los valores de logP calculados en el apartado anterior. De esta forma se han realizado las medidas de UV-vis siguiendo el mismo procedimiento que con los complejos de Au(I), con los complejos $[AuX_2L]$ donde X=tiourea.

Estos complejos exhiben en todos los casos un efecto hipocrómico especialmente marcado tras la primera hora, aunque después de ese punto, se da poca variación en la intensidad de absorbancia. El complejo **14** presenta una menor variación con el tiempo (ver Figura 2.3.8), lo que se podría explicar por la rigidez del sistema. Mientras que los ligandos tpy y bzp contienen un grupo metilo y metileno, respectivamente; el ligando ppy genera un ciclo de 5 miembros con el átomo de Au, y no presenta ningún otro sustituyente, lo que le confiere una estabilidad extra en comparación con el resto de los derivados con unidades tiourea.

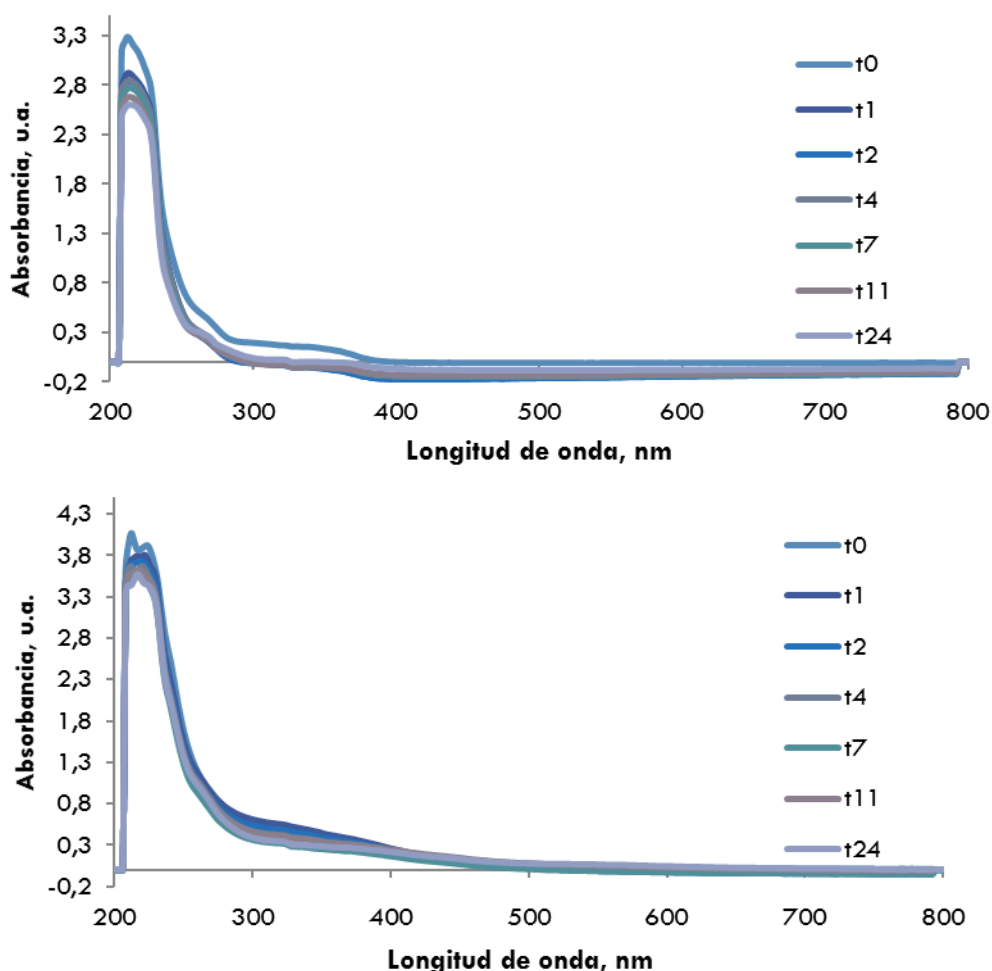


Figura 2.3.8. Espectro de absorción registrado durante 24h del complejo **13** (arriba) y **14** (abajo).

Al igual que se ha procedido con los complejos de Au(I), se han realizado estos mismos estudios de estabilidad utilizando como disolvente PBS con medio de cultivo al 20%. En el caso del complejo **13**, se observa un aumento progresivo de la intensidad de absorbanza de las bandas registradas a $\lambda=242$ y 322 nm; así como un leve desplazamiento hacia el rojo (desplazamiento batocrómico). Ese aumento de la intensidad se puede atribuir a la sustitución de los ligandos tiourea para la formación de un nuevo complejo cuyo coeficiente de extinción molar (ϵ) sea mayor que el del producto con tiourea.

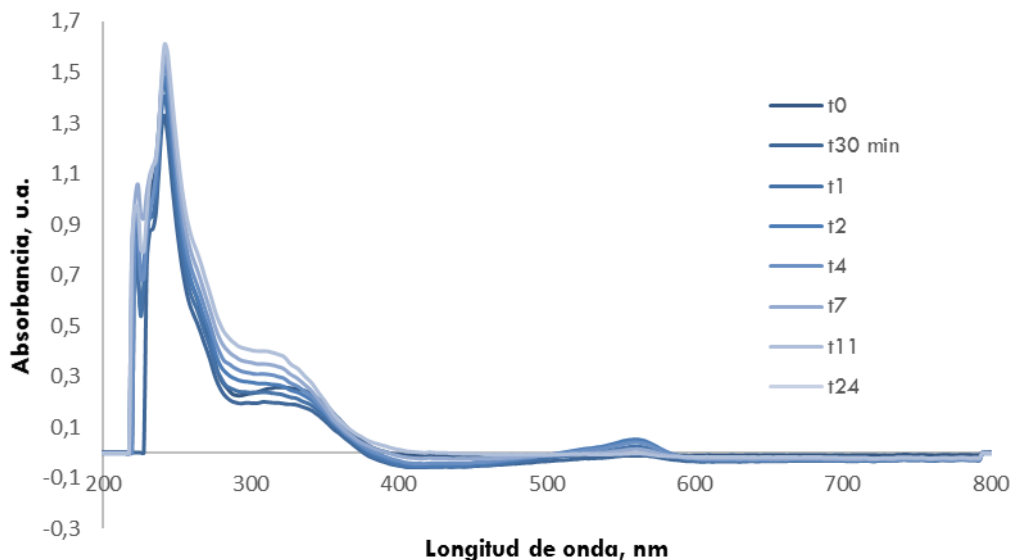


Figura 2.3.9. Espectro de absorción registrado durante 24h del complejo **13** en PBS+20% medio completo.

En lo que respecta a los análogos **14** y **15**, ambos exhiben un comportamiento similar puesto que durante las primeras 11 horas de incubación muestran un ligero incremento de su intensidad de absorbanza, que se estabiliza a las 24 h. Este hecho se atribuye a la formación de un nuevo complejo resultado de la sustitución de la tiourea por ligandos O-dadores.⁸

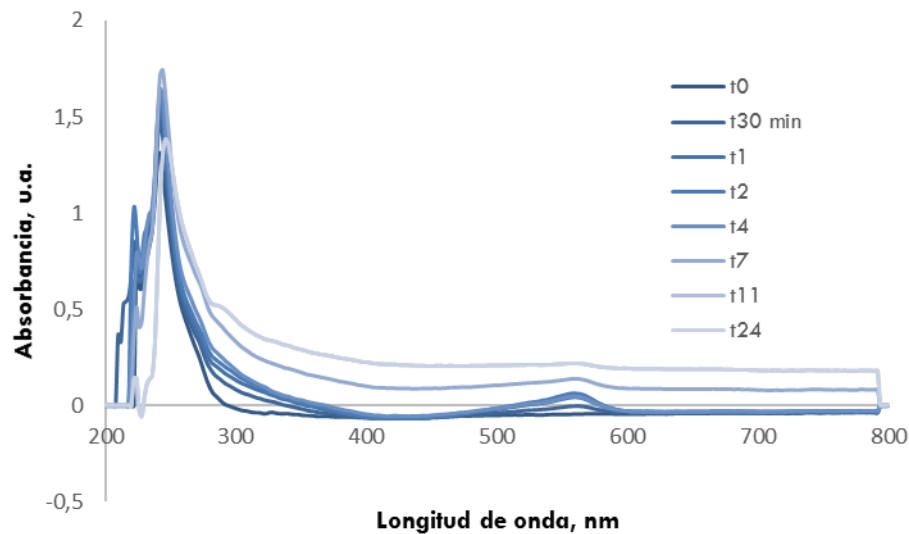


Figura 2.3.10. Espectros de absorción durante 24 h del complejo **15** en PBS+20% medio completo.

INTERACCIÓN CON PROTEÍNAS DE TRANSPORTE: ASB

Como se ha comentado en el apartado anterior, la estructura de un fármaco es determinante para sus propiedades ADME-tox, así se sabe que la distribución de medicamentos en el cuerpo está controlada por la permeabilidad a través de las membranas tisulares.⁹ Por ejemplo, el tracto gastrointestinal y la barrera hematoencefálica proporcionan barreras eficientes a la permeabilidad de los fármacos.¹⁰ Características intrínsecas del complejo, especialmente la lipofilia influyen en gran parte el grado de absorción; de hecho, la lipofilia se considera generalmente como un factor clave en el grado de absorción del fármaco, el transporte hepático y la penetración del cerebro. Sin embargo, la correcta biodistribución del compuesto no depende únicamente de sus propiedades puesto que la contribución de las proteínas de transporte es un parámetro importante en este proceso.

La interacción de un fármaco con proteínas de transporte puede tener dos resultados distintos:¹¹

- .. Interacción sustrato-proteína con la finalidad de transporte a través de las membranas.
- .. Interacción sustrato-proteína que inhibe la proteína bloqueando el transporte y, en consecuencia, modulando la acción del transportador de proteína.¹²

Esta investigación se ha centrado en el primero de los casos puesto que el objetivo es la evaluación de la interacción complejo-albúmina sérica (AS); ya que cuando el complejo es administrado al organismo, éste se transporta y distribuye al líquido intersticial de los tejidos a través del plasma. El componente principal del plasma es la albúmina sérica humana (ASH), siendo aproximadamente al 60% de la masa de proteínas plasmáticas con una concentración de 0.05 g/l. Se conoce que ASH es el transportador de diversas sustancias endógenas (hormonas, vitaminas...), pero también exógenas como fármacos.¹³ Otro aspecto a destacar de la ASH es que se da en una mayor concentración en células tumorales, constituyendo una importante diana para

quimioterápicos; de hecho, medicamentos aprobados como el paclitaxel y la doxorubicina, interactúan con ASH para transportarse de manera eficiente a las células cancerosas.¹⁴⁻¹⁵

Todos estos factores secundan la importancia de realizar estudios para conocer la interacción de las moléculas del fármaco con ASH para comprender el proceso de transporte del fármaco.

Para estos estudios, en la mayoría de los casos se ha utilizado la albúmina sérica bovina (ASB), en parte debido a su homología estructural con la ASH (ver Figura 2.2.2.11),¹⁶ pero también por la mayor disponibilidad comercial y estabilidad de la ASB. Su estructura tiene forma de corazón y está compuesta por tres dominios homólogos específicos I, II y III,¹⁷ que están organizados linealmente. Cada dominio tiene subdominios A y B. Las principales regiones de los sitios de unión de moléculas endógenas y exógenas, con la albúmina, se localizan en las cavidades hidrofóbicas en los subdominios IIA y IIIA.¹⁸ El sitio I (ubicado en el subdominio IIA) es un sitio de unión selectivo para aniones heterocíclicos, mientras que el sitio II (ubicado en el subdominio IIIA) se selecciona mediante carboxilatos aromáticos. Asimismo, la ASB contiene un total de 583 aminoácidos con veinte residuos de tirosilo (Tyr) y dos residuos de triptófano (Trp134: que se encuentra en la superficie del subdominio IB; y Trp212: ubicado dentro del bolsillo de unión hidrofóbica del subdominio IIA).¹⁹ Son precisamente estos residuos Try y Trp, junto con unidades de fenilalanina, los que confieren a la albúmina propiedades fluorescentes.

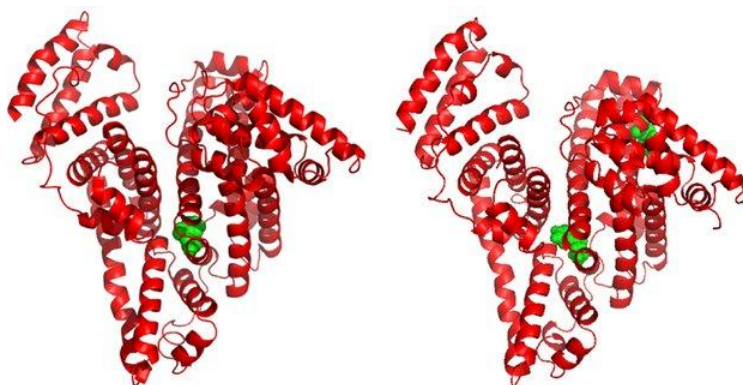


Figura 2.3.11. Estructura tridimensional de la ASH (izq.) y ASB (drcha.) con los residuos Trp en verde.

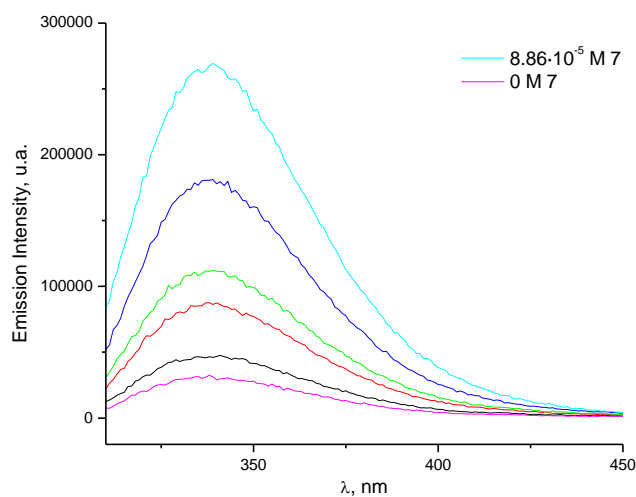
Esta propiedad es importante, porque de entre otros métodos para la evaluación de la interacción proteína-fármaco, las técnicas de fluorescencia son excelentes ayudas en el estudio de las interacciones entre los fármacos y la AS debido a su alta sensibilidad a cambios en el microambiente de las proteínas,²⁰ rapidez y facilidad de implementación. Dado que el estudio se va a realizar mediante espectroscopia de fluorescencia, la ASB presenta una ventaja adicional sobre la ASH, y es que la ASH posee un sólo residuo de triptófano (Trp214), frente a los dos ya mencionados que contiene la ASB.

El fundamento de este método indirecto se basa en que cuando la ASB interacciona con otro compuesto, su fluorescencia intrínseca cambia con la concentración del complejo. De esta forma se va a monitorizar el cambio de la fluorescencia de ésta (fluoróforo) en ausencia y presencia de los diferentes complejos de Au(I) y Au(II) seleccionados con base en sus propiedades farmacodinámicas y farmacocinéticas hasta ahora estudiadas (Tabla 2.3.9). Para estos estudios, se mantiene la concentración de ASB a 50 μ M, y se van adicionando alícuotas de la disolución de los complejos en DMSO.

Tabla 2.3.9. Complejos de Au seleccionados para este estudio y sus propiedades.

Complejo	IC ₅₀ (μM)	LogP
13	Sin efecto	-0.18
14	Sin efecto	-0.30
15	Sin efecto	0.005
35	3.72±0.08	0.63
38	5.25±0.21	0.91
39	6.14±0.14	1.03
40	2.33±0.10	1.24
41	6.26±0.15	1.20
33	4.50±0.10	0.87
34	4.55±0.11	0.66

En todos los casos se ha observado la misma tendencia, una disminución (quenching) de la intensidad de la fluorescencia (véase Figura 2.3.12), por lo que los complejos se comportan como quenchers. Según se encuentra recogido en la bibliografía, la mayoría de los complejos de Au(I) interaccionan con la ASB mediante la unión al residuo de cisteína Cys34 aunque, también se han dado casos donde la parte orgánica del complejo presenta afinidad por otros sitios de unión de la proteína, especialmente cuando hay restos lipófilos tales como grupos fenol.²¹

**Figura 2.3.12.** Espectro de emisión de fluorescencia de ASB con concentraciones crecientes del compuesto **40**.

Mecanismo de quenching de ASB mediado por derivados de Au

Toda desactivación de la fluorescencia se produce por la interacción molecular entre el fluoróforo y el quencher. Este proceso puede ser de tipo estático, dinámico o darse ambos simultáneamente, y se van a poder distinguir por su diferente dependencia de la temperatura y la viscosidad. El quenching estático implica la formación de complejos no fluorescentes con el quencher, cuya estabilidad disminuye al aumentar la temperatura; y, por lo tanto, la constante de quenching (K_q) va a disminuir. El quenching dinámico, por otro lado, hace alusión a la difusión del quencher al fluoróforo durante la vida del estado excitado; así, por contacto con el quencher, el fluoróforo vuelve al estado fundamental sin emisión de fotones. Dado que las temperaturas más altas dan como resultado grandes coeficientes de difusión, en este tipo de quenching, la k_q aumenta al aumentar la temperatura.

De esta forma, y para determinar que mecanismo de desactivación opera en cada uno de los complejos, se ha realizado un análisis de los valores de intensidad de fluorescencia mediante la ecuación de Stern-Volmer (Ecuación 2.3.2).

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{sv}[Q] = 1 + k_q \tau_0 [Q]$$

Ecuación 2.3.2. Relación de la Intensidad de fluorescencia y la concentración del quencher (Ecuación Stern-Volmer).

Para poder evaluar la desactivación de la luminiscencia mediante esta ecuación, se representa el cociente de la intensidad intrínseca de ASB (F_0) entre el valor alcanzado con la adición del complejo (F), frente a la concentración del quencher ($[Q]$, M). El resultado es una recta cuya ordenada en el origen es la unidad, mientras que la pendiente equivale a K_{sv} (constante de Stern-Volmer, M^{-1}). Asimismo, la pendiente también permite calcular el parámetro de la constante bimolecular de quenching (k_q , $M^{-1}s^{-1}$), puesto que también es equivalente al producto entre el tiempo de vida del fluoróforo (τ_0), que se considera 10^{-8} s, y k_q .

En los casos de quenching estático y dinámico, la dependencia de F_0/F con la concentración es lineal; pero en el caso de que no sea lineal suele indicar que ambos mecanismos operan en la desactivación de la luminiscencia. Cuando esto sucede la ecuación de Stern-Volmer se ajusta mejor a la siguiente ecuación cuadrática:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + (K_D + K_S)[Q] + K_D K_S [Q]^2$$

Ecuación 2.3.3. Ecuación de Stern-Volmer para casos de dos tipos de quenching.²²

ESTUDIOS DE QUENCHING CON DERIVADOS DE Au(I)

De esta forma se analizaron los resultados de los complejos de Au(I), representando $\frac{F_0}{F}$ frente a $[Q]$. En todos los casos se han observado tendencias lineales que indican que el quenching operativo es predominantemente estático.²³ Sin embargo, el complejo **40** se ajusta a una curva polinómica de segundo grado, que no lineal, lo

que parece indicar que con este compuesto en concreto no sólo opera un tipo de quenching, sino ambos (ver Figura 2.3.13). No obstante, sí se puede hablar de una tendencia lineal a concentraciones bajas (hasta 44 μM) pudiendo aplicar en este rango de concentraciones la Ecuación Stern-Volmer para un solo tipo de quenching, que como es lineal, en ese rango de concentraciones parece ser estático.

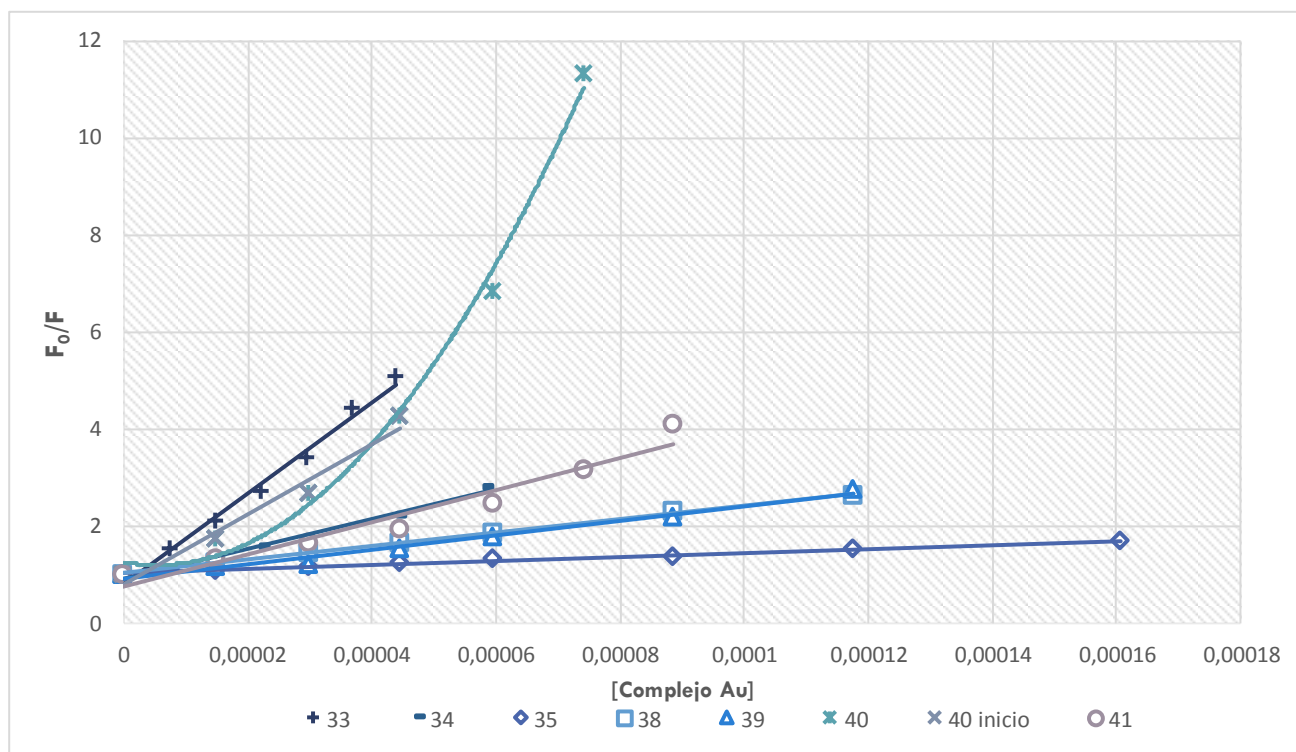


Figura 2.3.13. Representación de la ecuación de Stern-Volmer para los complejos de Au(I) seleccionados.

Mediante el uso de Ecuación 2.3.2, se han calculado los valores de las constantes K_{SV} y k_q para los derivados de Au(I), lo que va a permitir conocer el tipo de quenching implicado puesto que cuando el valor de k_q es mayor que el valor máximo de la constante de velocidad de difusión para el quenching dinámico ($2.0 \cdot 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$), suele indicar que el quenching estático está implicado. Según los valores de k_q calculados, todo parece indicar que el quenching estático es el operante en todos los casos.

Tabla 2.3.10. Valores de las constantes K_{SV} y k_q calculadas para los complejos de Au(I) a 298K.

	35	38	39	40	41	33	34
$K_{SV} (\text{M}^{-1})$	$4.21 \cdot 10^3$	$1.39 \cdot 10^4$	$1.50 \cdot 10^4$	$7.19 \cdot 10^4$	$3.32 \cdot 10^4$	$9.40 \cdot 10^4$	$3.10 \cdot 10^4$
$k_q (\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1})$	$4.21 \cdot 10^{12}$	$1.39 \cdot 10^{12}$	$1.50 \cdot 10^{12}$	$7.19 \cdot 10^{12}$	$3.32 \cdot 10^{12}$	$9.40 \cdot 10^{12}$	$3.10 \cdot 10^{12}$

Sin embargo, el estudio de la constante biomolecular no es la única forma de elucidar qué tipo de quenching es el responsable de la disminución de la fluorescencia intrínseca de la ASB; también se puede analizar por el estudio del efecto de la temperatura (relacionado con la viscosidad), o por el estudio del tiempo de vida. En

lo que se refiere al tiempo de vida, éste no se va a ver alterado en casos de quenching estático, pero sí cuando se trata de quenching dinámico.

El efecto de la temperatura es una forma sencilla y eficaz de conocer el quenching implicado ya que, como se ha comentado con anterioridad, un aumento de la temperatura conduce a una difusión más rápida y a más colisiones, incrementando el quenching dinámico. Por el contrario, los complejos débilmente unidos van a poder disociarse a temperaturas elevadas, con la consiguiente disminución de quenching estático (Figura 2.3.14).

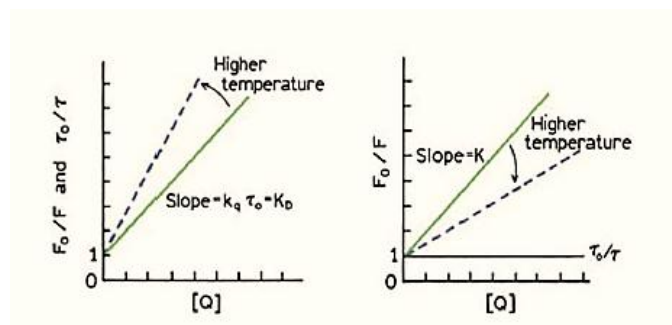


Figura 2.3.14. Efecto de la temperatura sobre el quenching dinámico (izq.) y estático (drcha.).

De esta forma, se ha realizado el mismo estudio que el expuesto anteriormente, pero a diferentes temperaturas, 305 y 310 K. A modo de ejemplo se recoge los valores obtenidos para los complejos **33** y **34**, donde se confirma el quenching estático predicho por el estudio de sus constantes k_q .

Tabla 2.3.11. Valores de K_{sv} ($10^3, M^{-1}$) y k_q ($10^{12}, M^{-1}s^{-1}$) a diferentes temperaturas.

T (K)	33		34	
	K_{sv}	k_q	K_{sv}	k_q
298	94.0	9.40	31.0	3.10
305	34.1	3.41	22.8	2.28
310	24.6	2.46	13.6	1.36

ESTUDIOS DE QUENCHING CON DERIVADOS DE Au(III)

En lo que respecta a los derivados de Au(III), los complejos seleccionados son los que incorporan las unidades tiourea puesto que son los que mejores propiedades farmacocinéticas presentan.

Se ha realizado el estudio del Stern-Volmer de la misma forma que en el caso de los complejos de Au(I), observándose un comportamiento muy similar; puesto que en todos los casos se da una desactivación de la luminiscencia. De nuevo, los datos obtenidos se han estudiado por el tratamiento de Stern-Volmer:

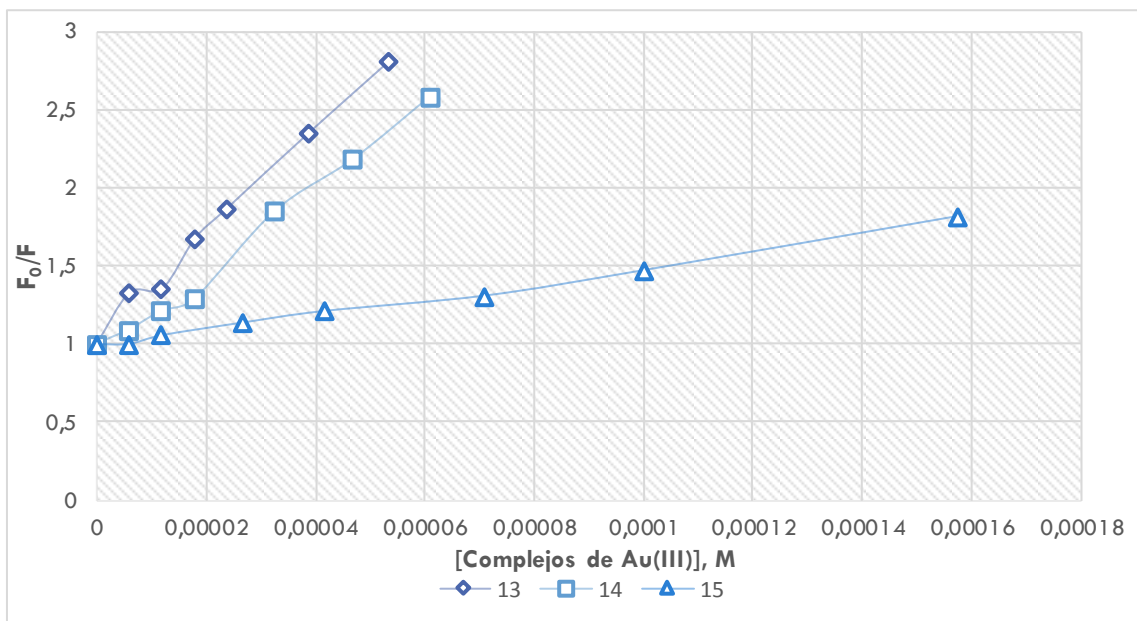


Figura 2.3.15. Representación de la ecuación de Stern-Volmer para los complejos de Au(III) seleccionados.

Los valores de K_{sv} y k_q para los complejos de Au(III) testados son muy similares a los encontrados para los derivados de Au(I), ya que en sendos casos los valores oscilan en los mismos órdenes de magnitud. Así, y dado que el tipo de quenching se puede deducir del valor de k_q ; los derivados de Au(III) también quenchean la fluorescencia intrínseca de la ASB a través de un mecanismo estático.

Tabla 2.3.12. Valores de las constantes K_{sv} y k_q calculados a 298K.

	13	14	15
$K_{sv} (M^{-1})$	$3.35 \cdot 10^4$	$2.70 \cdot 10^4$	$5.09 \cdot 10^3$
$k_q (M^{-1} s^{-1})$	$3.35 \cdot 10^{12}$	$2.70 \cdot 10^{12}$	$5.09 \cdot 10^{11}$

Esta conclusión es extensible a todas las temperaturas ensayadas (298, 305 y 310K), ya que también k_q muestra valores superiores al valor máximo de la constante de velocidad de difusión para el quenching dinámico ($2.0 \cdot 10^{10} M^{-1} s^{-1}$). Ahora bien, el estudio de la influencia de la intensidad de la fluorescencia respecto de la temperatura no es concluyente ya que no se observa una tendencia al aumentar este parámetro.

Tabla 2.3.13. Valores de $K_{sv} (M^{-1})$ y $k_q (M^{-1} s^{-1})$ a diferentes temperaturas

T (K)	13		14		15	
	K_{sv}	k_q	K_{sv}	k_q	K_{sv}	k_q
298	$3.35 \cdot 10^4$	$3.35 \cdot 10^{12}$	$2.70 \cdot 10^4$	$2.70 \cdot 10^{12}$	$5.09 \cdot 10^3$	$5.09 \cdot 10^{11}$
305	$6.98 \cdot 10^4$	$6.98 \cdot 10^{12}$	$2.39 \cdot 10^4$	$2.39 \cdot 10^{12}$	$5.13 \cdot 10^3$	$5.13 \cdot 10^{11}$
310	$3.54 \cdot 10^4$	$3.54 \cdot 10^{12}$	$2.45 \cdot 10^4$	$2.45 \cdot 10^{12}$	$4.79 \cdot 10^3$	$4.79 \cdot 10^{11}$

Parámetros de enlace e identificación del sitio de unión ASB-complejo Au

Como ya se ha comentado, la ASB contiene tres dominios (I, II, III) con sus correspondientes subdominios con diferente composición química, por lo que la interacción observada de los complejos de Au sintetizados con la ASB no va a ser homogénea, sino que se va a dar en sitios concretos, así como con una fortaleza diferente en función del complejo involucrado.

Para poder determinar la fortaleza del enlace ASB-complejo así como el número de sitios que presentan esta interacción se ha utilizado la Ecuación de Stern-Volmer modificada:

$$\log \frac{F_0 - F}{F} = \log K_b + n \log [Q]$$

Ecuación 2.3.4. Ecuación de Stern-Volmer modificada

Estudio de la interacción ASB-Complejo de Au(I)

Los parámetros necesarios para este estudio son los mismos que los utilizados en el caso anterior, pero ahora al representar $\log \frac{F_0 - F}{F}$ frente a $\log [Q]$ se puede calcular el parámetro K_b (constante de unión) y n (número de sitios de unión por molécula de ASB).

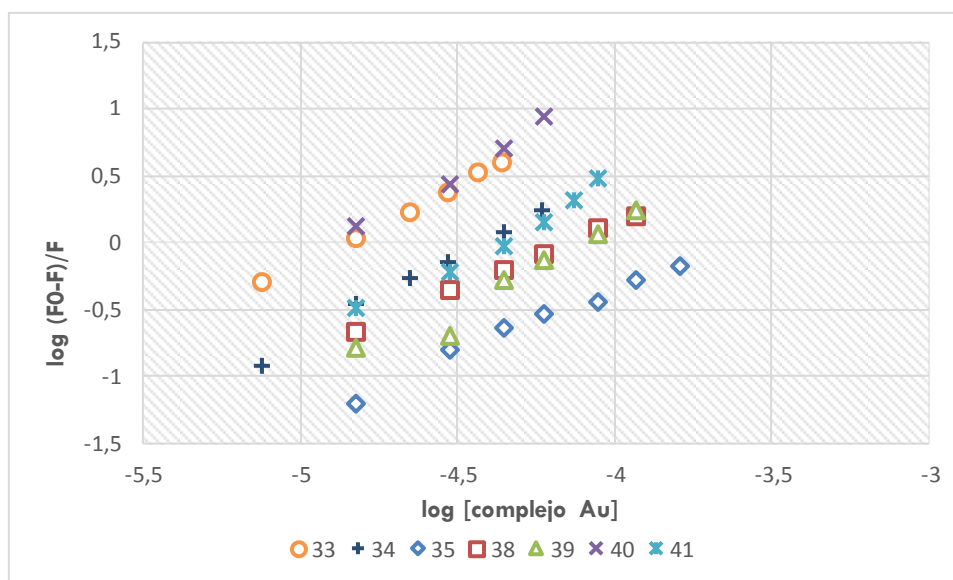


Figura 2.3.16. Representación de la ecuación de Stern-Volmer modificada.

Aunque con alguna desviación, las tendencias pueden considerarse lineales y ser estudiadas mediante la ecuación anterior, y así obtener los siguientes resultados:

Tabla 2.3.14. Valores calculados de K_b y n para los complejos de Au(I) a 298K.

	35	38	39	40	41	33	35
n	0.95 (1)	0.97 (1)	1.22(1)	1.34 (1)	1.24 (1)	1.18 (1)	1.28 (1)
K_b (M^{-1})	$2.97 \cdot 10^3$	$1.12 \cdot 10^4$	$1.01 \cdot 10^5$	$3.68 \cdot 10^6$	$2.68 \cdot 10^5$	$5.35 \cdot 10^5$	$4.65 \cdot 10^5$

Los valores de n para ASB son, en todos los casos, aproximadamente iguales a uno, lo que indica que hay un único sitio de unión en ASB para los complejos testados. Aunque esto es importante, la fortaleza del enlace entre el complejo y la ASB es el factor principal a conocer ya que pone de manifiesto la capacidad del fármaco para ser difundido desde el sistema circulatorio hasta la diana.²⁴ La mayoría de los complejos muestran valores de K_b superior a $10^5 M^{-1}$, lo que indica una fuerte interacción ASB-complejo.

El complejo **38** tiene un valor de K_b de $1.12 \cdot 10^4 M^{-1}$, por lo que el complejo ASB-**38** es ligeramente más débil. Este hecho demuestra lo necesario de un buen diseño del fármaco, ya que el simple cambio del halogenuro que sustituye el anillo aromático (Br, **38**; Cl, **39**) influye notablemente en la interacción con la ASB y por tanto en su biodistribución.

El complejo **35** se une mucho más débilmente que el resto de los derivados sintetizados, sin embargo, esto no supone un problema para su aplicabilidad ya que su K_b es mayor que la encontrada para el complejo ASH-cisPt ($8.52 \cdot 10^2 M^{-1}$).²⁵

Estudio de la interacción ASB-Complejo de Au(III)

En lo que respecta a los complejos de Au(III), se ha procedido de la misma forma para calcular los valores de K_b y n , que permitan evaluar la interacción de éstos con ASB.

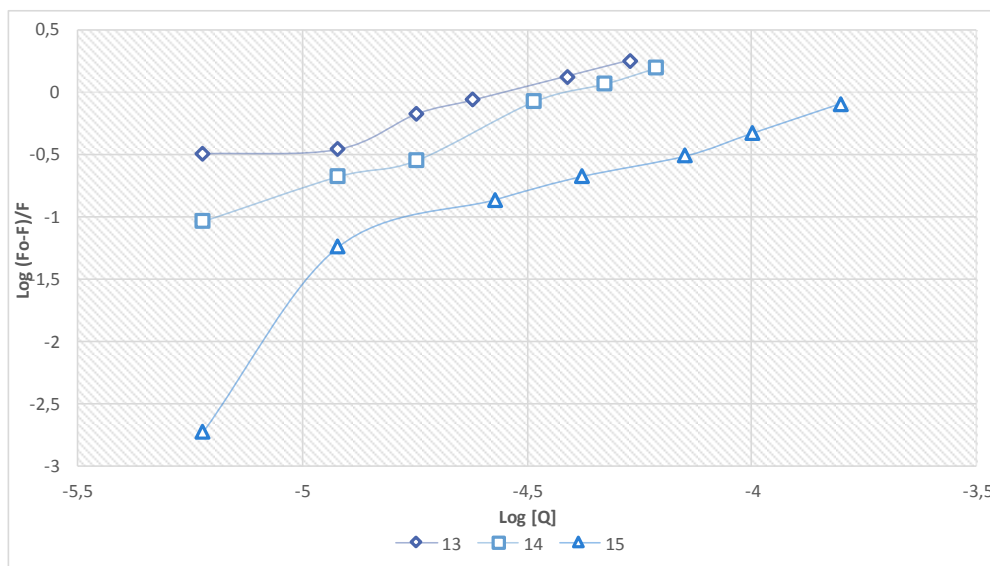


Figura 2.3.17. Representación de la ecuación de Stern-Volmer modificada.

Así del ajuste lineal de la representación de la Ecuación de Stern-Volmer modificada se han obtenido los siguientes valores:

Tabla 2.3.15. Valores calculados de K_b y n para los complejos de Au(III) a 298K.

	13	14	15
n	0.85 (1)	1.26 (1)	1.60 (2)
$K_b (M^{-1})$	$7.35 \cdot 10^3$	$3.21 \cdot 10^5$	$1.55 \cdot 10^6$

Los parámetros de enlace de los complejos de Au(III) y ASB presentan pequeñas diferencias entre ellos, así mientras **13** y **14** parecen unirse a un único sitio activo de la ASB; todo apunta a que el complejo **15**-ASB incorpora dos moléculas del fármaco por molécula de ASB. Asimismo, es este derivado el que tiene una constante de enlace (K_b) mayor que los otros complejos de Au(III), lo que indica que interacciona con la ASB mucho más fuertemente (mil veces más fuerte que **13**).

Si bien con los complejos de Au(I) se había visto la influencia que tenía en estos parámetros la sustitución de un átomo de Cl en vez de Br; con estos complejos, la estructura parece ser aún más determinante si cabe, ya que la simple presencia de un grupo Me hace que la fortaleza del complejo ASB-[Au] sea de hasta 100 veces superior (**13** respecto de **14**).

Parámetros termodinámicos y fuerzas de unión ASB-complejo Au

El complejo que se forma entre la ASB y el derivado de Au es importante que sea robusto para una correcta distribución por el organismo hasta llegar a la diana, pero también debe ser reversible para así regenerar la ASB libre que continúe con el transporte tanto del fármaco, como del resto de sustancias biológicamente necesarias.

Las moléculas pequeñas, como los fármacos, se unen a la proteína con fuerzas interactivas como enlaces de hidrógeno, interacciones hidrófobas, electrostáticas o de van der Waals. Para cuantificar la fuerza del enlace ya se ha calculado K_b , pero es necesario establecer la fuerza interactiva entre ASB y los complejos, así los parámetros termodinámicos tales como ΔH° , ΔS° y ΔG° . Suponiendo que el cambio en la entalpía (ΔH) pueda mantenerse constante, el cambio de energía libre (ΔG), el cambio de entalpía (ΔH) y el cambio de entropía (ΔS) se pueden calcular de acuerdo con las ecuaciones siguientes:

$$\ln \frac{K_{b2}}{K_{b1}} = \left[\frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2} \right] \times \frac{\Delta H^\circ}{R} \qquad \Delta G^\circ = -RT \ln K_b = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ$$

Ecuación 2.3.5. Ecuación de van't Hoff (izq.) y de Energía libre de Gibbs (drcha.).

Según exponen Ross y Subramanian,²⁶ los valores de ΔH y ΔS muestran una tendencia en función del tipo de interacción que se da entre el complejo y la proteína; así, cuando ΔH° y ΔS° son negativos, la fuerza principal es de van der Waals o enlace de hidrógeno. Sin embargo, si ΔH° y ΔS° son positivos, la fuerza de interacción principal es una interacción hidrofóbica. El caso de una interacción de tipo electrostática suele darse cuando el valor de ΔH° es próximo a cero y ΔS° es positivo.

Para el cálculo de ΔH° se han introducido los valores de K_b para las temperaturas 298 y 310K, para después determinar el valor de ΔG° para una temperatura fija y poder finalmente conocer ΔS° .²⁷

Estudios termodinámicos con derivados de Au(I)

Tabla 2.3.16. Parámetros termodinámicos para la unión ASB-complejo Au(I).

	35	38	39	40	41	33	34
ΔH° (KJ mol ⁻¹)	-205.90	-78.02	-130.72	100.16	44.84	85.8	52.73
ΔS° (KJ mol ⁻¹)	-0.62	-0.18	-0.34	0.45	0.25	-28.37	-23.58
ΔG° (KJ mol ⁻¹)	-19.81	-23.10	-28.55	-34.46	-30.97	0.38	0.26

Con estos valores de ΔH° y ΔS° se puede concluir que mientras que los derivados con anillo bencénico (**35**, **38** y **39**) interaccionan con la ASB por enlace de hidrógeno o interacción de van der Waals, pues sendos parámetros son negativos; los complejos con residuos piridina se coordinan mediante por fuerzas hidrofóbicas (ΔH° y $\Delta S^\circ > 0$). Estos resultados son contradictorios con lo que se podría esperar de la estructura de los complejos puesto que los complejos **40** y **41**, podrían efectuar enlaces de hidrógeno mediante el átomo de N-py. En lo que respecta a los derivados con benceno, esta posibilidad no existe ya que no tienen átomos capaces de generar enlaces de hidrógeno, por lo que la interacción con complejo-ASB se reduce a fuerzas de van der Waals. Además, todos los complejos muestran una buena interacción con la ASB ya que ΔG° es negativa, por lo que el enlace complejo-ASB está favorecido termodinámicamente. Por el contrario, los complejos con unidades mercapto, este parámetro es positivo haciendo que no sea favorable la unión. Este hecho revela que el proceso de unión está entálpicamente dirigido.

Estudios termodinámicos con derivados de Au(III)

Tabla 2.3.17. Parámetros termodinámicos para la unión ASB-complejo Au(III).

	ΔH° (KJ mol ⁻¹)	ΔS° (KJ mol ⁻¹)	ΔG° (KJ mol ⁻¹)
13	10.29	34.61	-22.06
14	-98.86	-0.23	-31.41
15	-43.62	-35.31	-1.35

Según los valores recogidos en la Tabla 2.3.17, y dado que los valores para ΔH° y ΔS° son ambos negativos para los compuestos **14** y **15**, la interacción ASB-[Au] se da por enlaces de hidrógeno o por fuerzas de van der Waals. Sin embargo, **13** presenta el caso contrario ya que ΔH° y ΔS° son positivos, indicando que la interacción con la ASB es más débil por fuerzas hidrofóbicas.

Este estudio respalda los valores calculados de K_b anteriormente, ya que **13** presentaba un valor de K_b mucho más pequeño que **14** y **15** (100 y 1000 veces menor, respectivamente); puesto que se sabe que las fuerzas de van der Waals y, aún más los enlaces de hidrógeno, son fuerzas intermoleculares con mayores energías de enlace que las hidrofóbicas.

Además, el hecho de que el compuesto **13** sea el que interacciona por fuerzas hidrofóbicas es consistente también por el efecto del metilo, que como se ha recogido en la sección del LogP, contribuye positivamente a la hidrofobicidad de las moléculas.

BIBLIOGRAFÍA

1. Craig, W. A., Pharmacokinetic/pharmacodynamic parameters: rationale for antibacterial dosing of mice and men. *Clin Infect Dis* **1998**, *26* (1), 1-10; quiz 11-2.
2. Cheng, A.; Merz, K. M., Jr., Prediction of aqueous solubility of a diverse set of compounds using quantitative structure-property relationships. *J Med Chem* **2003**, *46* (17), 3572-80.
3. Lombardo, F.; Obach, R. S.; Shalaeva, M. Y.; Gao, F., Prediction of volume of distribution values in humans for neutral and basic drugs using physicochemical measurements and plasma protein binding data. *J Med Chem* **2002**, *45* (13), 2867-76.
4. Thomas, G., *Medicinal Chemistry, an introduction*. Wiley 2000; Vol. 1, p 517.
5. Bhal, S. K. LogP: Making Sense of the Value.
http://www.acdlabs.com/resources/knowledgebase/app_notes/-physchem/makingsense.php
(accessed June 17, 2018).
6. Kerns, E. H.; Di, L., Lipophilicity Methods, Drug-like Properties: Concepts, Structure Design and Methods. In *Lipophilicity Methods*, Elsevier: San Diego, 2008; p 10.
7. Pretsch, E.; Martínez, R.; Herrera, A.; Bühlmann, P.; Affolter, C., *Determinación estructural de compuestos orgánicos*. Elsevier España: 2002.
8. Boscutti, G.; Nardon, C.; Marchio, L.; Crisma, M.; Biondi, B.; Dalzoppo, D.; Dalla Via, L.; Formaggio, F.; Casini, A.; Fregona, D., Anticancer Gold(III) Peptidomimetics: From Synthesis to in vitro and ex vivo Biological Evaluations. *ChemMedChem* **2018**, *13* (11), 1131-1145.
9. Ayrton, A.; Morgan, P., Role of transport proteins in drug absorption, distribution and excretion. *Xenobiotica* **2001**, *31* (8-9), 469-97.
10. Goldstein, G. W.; Betz, A. L., The blood-brain barrier. *Sci Am* **1986**, *255* (3), 74-83.
11. Scherrmann, J. M., Transporters in absorption, distribution, and elimination. *Chem Biodivers* **2009**, *6* (11), 1933-42.
12. Aikman, B.; de Almeida, A.; Meier-Menches, S. M.; Casini, A., Aquaporins in cancer development: opportunities for bioinorganic chemistry to contribute novel chemical probes and therapeutic agents. *Metallomics* **2018**, *10* (5), 696-712.
13. T, P. L.; Mondal, M.; Ramadas, K.; Natarajan, S., Molecular interaction of 2,4-diacetylphloroglucinol (DAPG) with human serum albumin (ASH): The spectroscopic, calorimetric and computational investigation. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* **2017**, *183*, 90-102.
14. Paal, K.; Muller, J.; Hegedus, L., High affinity binding of paclitaxel to human serum albumin. *Eur J Biochem* **2001**, *268* (7), 2187-91.
15. Agudelo, D.; Bourassa, P.; Bruneau, J.; Berube, G.; Asselin, E.; Tajmir-Riahi, H. A., Probing the binding sites of antibiotic drugs doxorubicin and N-(trifluoroacetyl) doxorubicin with human and bovine serum albumins. *PLoS One* **2012**, *7* (8), e43814.
16. Mote, U. S.; Bhattar, S. L.; Patil, S. R.; Kolekar, G. B., Interaction between felodipine and bovine serum albumin: fluorescence quenching study. *Luminescence* **2010**, *25* (1), 1-8.
17. Ma, R.; Pan, H.; Shen, T.; Li, P.; Chen, Y.; Li, Z.; Di, X.; Wang, S., Interaction of Flavonoids from *Woodwardia unigemmata* with Bovine Serum Albumin (ASB): Application of Spectroscopic Techniques and Molecular Modeling Methods. *Molecules* **2017**, *22* (8).
18. Anbazhagan, V.; Renganathan, R., Study on the binding of 2,3-diazabicyclo[2.2.2]oct-2-ene with bovine serum albumin by fluorescence spectroscopy. *J Lumin* **2008**, *128* (9), 1454-1458.
19. Moriyama, Y.; Ohta, D.; Hachiya, K.; Mitsui, Y.; Takeda, K., Fluorescence behavior of tryptophan residues of bovine and human serum albumins in ionic surfactant solutions: A comparative study of the two and one tryptophan(s) of bovine and human albumins. *J Protein Chem* **1996**, *15* (3), 265-272.
20. Li, S. K.; Wang, Y. J.; Lin, Q. Y.; Liu, W. D.; Ding, J. H.; Wang, Y. Y., Synthesis, crystal structures of novel complexes of rare earth with norfloxacin, interaction with DNA and ASB. *J Rare Earth* **2012**, *30* (5), 460-466.
21. Bal, W.; Sokolowska, M.; Kurowska, E.; Faller, P., Binding of transition metal ions to albumin: Sites, affinities and rates. *Bba-Gen Subjects* **2013**, *1830* (12), 5444-5455.
22. Lakowicz, J. R., *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. 3rd ed.; Springer US: 2006.
23. Zhang, G.; Que, Q.; Pan, J.; Guo, J., Study of the interaction between icariin and human serum albumin by fluorescence spectroscopy. *J Mol Struct* **2008**, *881*, 7.

24. Colmenarejo, G.; Alvarez-Pedraglio, A.; Lavandera, J. L., Cheminformatic models to predict binding affinities to human serum albumin. *Journal of Medicinal Chemistry* **2001**, *44* (25), 4370-4378.
25. Neault, J. F.; Tajmir-Riahi, H. A., Interaction of cisplatin with human serum albumin. Drug binding mode and protein secondary structure. *Bba-Protein Struct M* **1998**, *1384* (1), 153-159.
26. Suryawanshi, V. D.; Walekar, L. S.; Gore, A. H.; Anbhule, P. V.; Kolekar, G. B., Spectroscopic analysis on the binding interaction of biologically active pyrimidine derivative with bovine serum albumin. *J Pharm Ana* **2016**, *6* (1), 56-63.
27. Wang, Y.; Zhu, R.; Ni, Y.; Kokot, S., Competitive interactions of anti-carcinogens with serum albumin: a spectroscopic study of bendamustine and dexamethasone with the aid of chemometrics. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* **2014**, *123*, 241-8.

Capítulo III: Parte Experimental

TÉCNICAS ESTRUCTURALES

ESPECTROSCOPIA INFRARROJA (IR)

Los análisis de infrarrojo se han llevado a cabo en un espectrofotómetro Perkin-Elmer FT-IR *Spectrum One* que cubre el rango de 4000 a 250 cm^{-1} . Esta técnica contribuye a la facilidad de análisis ya que permite introducir la muestra en diversas formas: sólido, líquido, polvo... La muestra se coloca sobre el cristal, el cual presenta un alto índice de refracción, el rayo IR llega al cristal donde se refleja internamente y vuelve al detector. Cuando el rayo de IR es reflejado dentro del cristal, penetra unas micras en la muestra. Las absorbancias obtenidas son debidas únicamente a la muestra.

RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)

Los estudios de RMN se han realizado en un espectrómetro Bruker AV 400 y 300 MHz midiendo a 400.16 MHz para ^1H , 162 MHz para $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ y 100.62 MHz para $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$. Los disolventes utilizados durante la caracterización de los complejos ha sido principalmente deuteriocloroformo (CDCl_3), y menor medida DMSO- d_6 y acetonitrilo deuterado (CD_3CN). La elección de uno u otro se ha debido a la diferente solubilidad de los complejos sintetizados.

ESPECTROMETRÍA DE MASAS (MS)

Los espectros de masas estudiados se hicieron en un espectrómetro MALDI-Tof Microflex, con láser de N_2 (337 nm, 3.68 eV) como fuente de ionización, con matriz DCTB (1,1-diciano-4-butilfenil-3-metilbutadieno, MW: 250) y utilizando la técnica de MALDI+ y MALDI-. Los valores se expresan según la relación masa/carga (m/z).

ANÁLISIS ELEMENTAL CUANTITATIVO

Las medidas se realizaron en un equipo Perkin Elmer 2400 Series II CHNS/O System elemental analyser.

ESPECTROFLUORÍMETRO

Los espectros de luminiscencia se han obtenido en un espectrofluorímetro Jobin-Yvon FluoroLog3-11 FL-3 empleando ventanas de 3nm, que se optimizan para conseguir mayores o menores intensidades registradas; tanto para la excitación como para la emisión. Las medidas de los complejos se han realizado en disolución en cubeta de cuarzo (1 cm de camino óptico) o tubo. Los estudios de interacción con ASB se realizaron en PBS, a una temperatura de 37 °C (fisiológica) con adiciones de concentraciones crecientes de ASB.

ESPECTROFOTOMETRÍA ULTRAVIOLETA VISIBLE

El espectrofotómetro utilizado para el estudio por UV-vis es un Thermo Scientific Evolution 600. En este caso, también se han realizado medidas a distintas temperaturas, ambiente y 37°C, a distintos tiempos para estudiar la estabilidad térmica de los complejos.

DIFRACCIÓN DE RAYOS X

Los experimentos de Rayos X se han llevado a cabo en un difractómetro Xcalibur Sapphire3 con una fuente de radiación MoK α . Las medidas se realizaron a baja temperatura (150K) y siguiendo el método w-scans. La interpretación de resultados se hizo con el programa WINGX.

SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN

PRODUCTOS DE PARTIDA DE Au(I) Y Au(III)

Para la preparación de los precursores [AuCl₃(HL)], y los consiguientes derivados ciclometalados ([AuCl₂L]), se ha utilizado como productos de partida las especies HAuCl₄ y Na[AuCl₄] donadas por la empresa Torrecid para la realización de esta investigación. Los mencionados precursores [AuCl₃(HL)] se han preparado según el procedimiento recogido en los Trabajos Fin de Máster de A. González y E. Colom.

En lo que respecta a la química de Au(I), los productos de partida son [AuCl(tht)] (tht: tetrahidrotiofeno) que se prepara según el procedimiento sintético recogido en la literatura.¹ Este complejo se utiliza para preparar [AuCl(HMPT)], que se obtiene a través modificaciones del protocolo descrito por Schmidbaur *et al.*² Ese procedimiento junto con el seguido para la síntesis de los derivados [Au(SR)HMPT] y [Au(C \equiv CR)HMPT], se recogen en los Trabajos Fin de Grado de R. Pena-Martínez y N. Espallargas.

COMPLEJOS CICLOMETALADOS DE Au(III): [AuCl₂L]

Los complejos ciclometalados de Au(III), [AuCl₂(tpy)] (**1**) y [AuCl₂(ppy)] (**2**) se han sintetizado según el procedimiento descrito por Janzen *et al.*³ El complejo análogo con 2-bencilpiridina (bzip) (**3**), se ha preparado por modificación del protocolo de Constable.⁴ Así, la relación de disolvente utilizada MeCN/Agua es 1:4.

COMPLEJOS DE Au(III) CON DERIVADOS PIRIMIDÍNICOS

COMPLEJOS CON 2-MERCAPTOPYRIMIDINAS

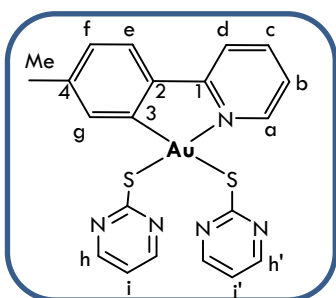
Se desprotona 2-mercaptopyrimidina (**4**, **5**, **6**) o 4,6-dimetil-2-mercaptopyrimidina (**7**, **8**, **9**) con K₂CO₃ en acetona durante una hora. A continuación se añade [AuCl₂L] generándose una suspensión de color amarillo intenso. La reacción se deja durante 4h en agitación a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo de reacción, el sólido se aísla por filtración, se redisuelve con diclorometano y se evapora a sequedad.

[Au(Spym)₂tpy], 4: 96%

g [AuCl₂(tpy)]: 64.5 mg, 0.147 mmol

g Spym: 16.7 mg, 0.149 mmol

g K₂CO₃: 25.5 mg, 0.184 mmol



¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 9.80 (dd, 1H, Ha), 8.33 (d, *J* = 4.9 Hz, 2H, Hh), 8.23 (d, *J* = 4.8 Hz, 2H, Hh'), 8.18 (d, *J* = 0.8 Hz, 1H Hg), 7.99 (ddd, *J* = 8.1, 7.4, 1.6 Hz, 1H, Hc), 7.89 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, Hd), 7.60 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, He), 7.32 (ddd, *J* = 7.3, 5.9, 1.4 Hz, 1H, Hb), 7.16 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, Hf), 6.82 (t, *J* = 4.8 Hz, 1H, Hi), 6.73 (t, *J* = 4.9 Hz, 1H, Hi'). **¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃)** δ 165.68 (C1), 159.72 (C2), 156.57 (Ch'), 156.39 (Ch), 149.13 (Ca), 142.88 (C4), 141.42 (Cd), 141.28 (C3), 133.67 (Cg), 128.90 (Cf), 125.22 (Ce), 123.43 (Cb), 120.07 (Cd), 115.73 (Ci), 114.99 (Ci'), 22.17(CMe). **IR (ν(cm⁻¹))** 3034, 1632, 1602, 1557, 1538, 1367, 1181,

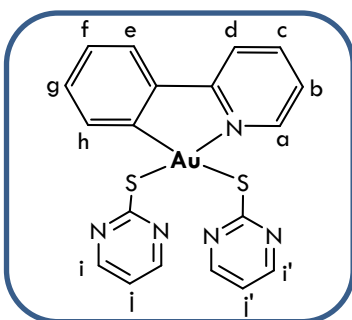
1029, 976, 830, 777, 770, 630, 300. **MALDI⁺ MS m/z (%)**: 476.1 (37.21, [M-Spy]⁺), 513.1 (37.21, [M-Spy+K]⁺), 533.2 (86, [AuL₂]⁺), 841.2 (2, [M-Spy+AuL]⁺).

[Au(Spym)₂ppy], 5: 90%

g [AuCl₂(ppy)]: 68.5 mg, 0.162 mmol

g Spym: 33.7 mg, 0.300 mmol

g K₂CO₃: 44.6 mg, 0.322 mmol



¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 9.83 (d, *J* = 5.9 Hz, 1H, Ha), 8.37 (dd, *J* = 7.4, 1.5 Hz, 1H, Hh), 8.32 (d, *J* = 4.8 Hz, 2H, Hh'), 8.24 (d, *J* = 4.8 Hz, 2H, Hh''), 8.08 – 8.00 (m, 1H, Hc), 7.95 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H, He), 7.72 (dd, *J* = 7.3, 1.8 Hz, 1H, Hd), 7.43 – 7.32 (m, 3H, Hb, g, f), 6.82 (t, *J* = 4.9 Hz, 1H, Hi), 6.74 (t, *J* = 4.8 Hz, 1H, Hi'). **¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃)** δ 156.59 (Ci), 156.45 (Cj'), 149.37 (Ca), 141.57 (Cc), 133.20 (Ch), 132.11 (Cb), 128.23 (Cf-g), 125.30 (Cd), 124.02 (Cf-g), 120.37 (Ce), 115.75 (Ci), 115.06 (Ci').

IR (ν(cm⁻¹)) 3070, 1647, 1627, 1606, 1557, 1536, 1363, 1175, 1007, 975, 830, 745, 630. **MALDI⁺ MS m/z (%)**: 462.1 (95, [M-Spy]⁺), 505.2 (95,

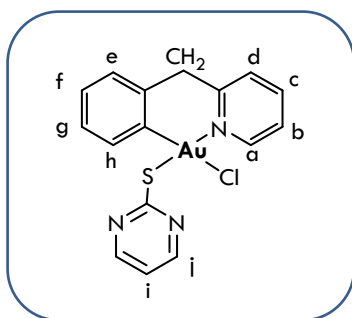
[AuL₂]⁺), 612.1 (11, [M+K]⁺), 813.2 (15, [M-Spy+AuL]⁺).

[AuCl(Spym)bzp], 6: 97%

g [AuCl₂(bzp)]: 65.0 mg, 0.149 mmol

g Spym: 33.6 mg, 0.300 mmol

g K₂CO₃: 46.4 mg, 0.336 mmol



^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 9.34 (d, $J = 4.9$ Hz, 1H, **Ha**), 8.28 (d, $J = 4.9$ Hz, 2H, **Hj**), 7.97 (td, $J = 7.7, 1.5$ Hz, 1H, **Hc**), 7.71 (dd, $J = 7.9, 1.1$ Hz, 1H, **Hd**), 7.68 (d, $J = 7.4$ Hz, 1H, **Hh**), 7.52 (dd, $J = 7.5, 6.1$ Hz, 1H, **Hb**), 7.12 (dd, $J = 7.3, 1.7$ Hz, 1H, **He**), 7.07 (td, $J = 7.2, 1.2$ Hz, 1H, **Hg**), 7.00 (td, $J = 7.6, 1.8$ Hz, 1H, **Hf**), 6.77 (t, $J = 4.9$ Hz, 1H, **Hi**), 4.57 (d, $J = 14.8$ Hz, 1H, **CH₂**), 4.04 (d, $J = 15.3$ Hz, 1H, **CH₂**). **^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3)** δ 156.39 (**Ca**), 151.52 (**Ca**), 143.42 (**C₂**), 141.51 (**Cc**), 134.46 (**Cd**), 132.98 (**Ci**), 128.45 (**Ce**), 127.68 (**Cg**), 127.49 (**Cf**), 125.74 (**Ch**), 124.19 (**Cb**),

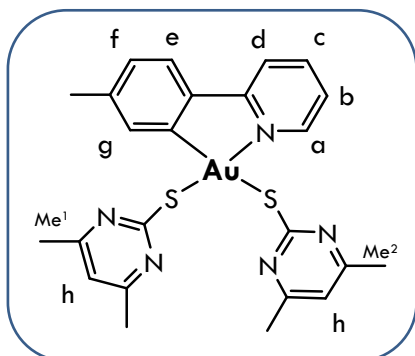
115.81 (**Cj**), 47.89 (**CH₂**). **IR** ($\nu(\text{cm}^{-1})$) 3059, 1629, 1557, 1545, 1402, 1375, 1174, 1007, 831, 768, 747, 293. **MALDI⁺ MS m/z (%)**: 476.1 (95, $[\text{M}-\text{Cl}]^+$), 533.2 (99, $[\text{AuL}_2]^+$), 841.2 (3, $[\text{M}-\text{Cl}+\text{AuL}]^+$).

[Au(S(Me)₂pyrim)₂tpy], 7: 90%

g $[\text{AuCl}_2(\text{tpy})]$: 64.0 mg, 0.147 mmol

g S(Me)₂pyrim: 42.8 mg, 0.305 mmol

g K_2CO_3 : 45.2 mg, 0.327 mmol



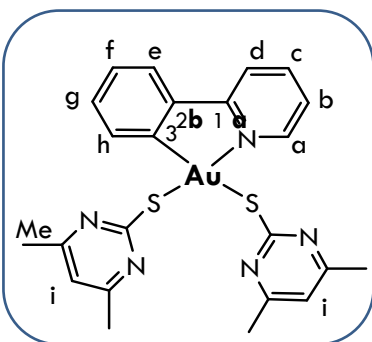
^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 9.74 (dd, $J = 5.9, 1.0$ Hz, 1H, **Ha**), 8.13 – 8.08 (m, 1H, **Hg**), 8.07 – 8.02 (m, 1H, **Hc**), 7.89 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H, **Hd**), 7.52 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H, **Hf**), 7.49 – 7.43 (m, 1H, **Hb**), 7.14 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, **He**), 6.75 (s, 1H, **Hh'**), 6.59 (s, 1H, **Hh**), 2.53 (s, 3H, **HMe**), 2.39 (s, 6H **HMe¹**), 2.31 (s, 6H, **HMe²**). **^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3)** δ 165.36 (**C1**), 159.87 (**C2**), 149.37 (**Ca**), 142.61 (**C4**), 141.11 (**C3**), 140.94 (**Cc**), 133.41 (**Cg**), 128.64 (**Cf**), 125.07 (**Ce**), 123.09 (**Cb**), 119.64 (**Cd**), 115.31 (**Ch**), 23.91 (**CMe¹-Me²**), 22.15 (**CMe**). **IR** ($\nu(\text{cm}^{-1})$) 3026, 2964, 1601, 1587, 1571, 1525, 1425, 1336, 1243, 1163, 1029, 877, 776, 546, 278. **MALDI⁺ MS m/z (%)**: 504.1 (87, $[\text{M}-\text{S}(\text{Me})_2\text{pyrim}]^+$), 533.2 (93, $[\text{AuL}_2]^+$), 682.2 (2, $[\text{M}+\text{K}]^+$), 869.2 (23, $[\text{M}-\text{S}(\text{Me})_2\text{pyrim}+\text{AuL}]^+$).

[Au(S(Me)₂pyrim)₂ppy], 8: 88%

g $[\text{AuCl}_2(\text{ppy})]$: 68.5 mg, 0.162 mmol

g S(Me)₂pyrim: 42.1 mg, 0.300 mmol

g K_2CO_3 : 45.1 mg, 0.326 mmol



^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 9.85 (d, $J = 6.9$ Hz, 1H, **Ha**), 8.14 (dd, $J = 11.5, 4.0$ Hz, 1H, **Hc**), 8.07 (dd, $J = 8.0, 1.3$ Hz, 1H, **Hh**), 7.92 (d, $J = 7.3$ Hz, 1H, **He**), 7.56 (dd, $J = 7.5, 1.7$ Hz, 1H, **Hd**), 7.52 (t, $J = 6.7$ Hz, 1H, **Hb**), 7.43 – 7.38 (m, 1H, **Hf**), 7.38 – 7.33 (m, 1H, **Hg**), 6.76 (s, 2H, **Hi+Hi'**), 2.39 (s, 12H, **CMe**). **^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3)** δ 165.27 (**C1**), 160.17 (**C2**), 149.51 (**Ca**), 144.11 (**C3**), 141.11 (**Cc**), 132.84 (**Ch**), 131.86 (**Cf**), 127.94 (**Cg**), 125.14 (**Ce**), 123.67 (**Cb**), 119.96 (**Cd**), 114.05 (**Ci**), 23.92 (**CMe**). **IR** ($\nu(\text{cm}^{-1})$) 3064, 2967, 1648, 1570, 1527, 1416, 1335, 1245, 1165, 972, 877, 830, 760, 545. **MALDI⁺ MS m/z**

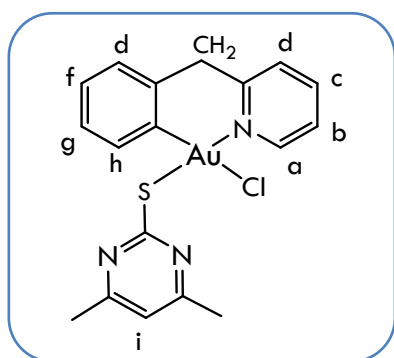
(%): 490.0 (97, [M- S(Me)₂pyrim]⁺), 505.2 (93, [AuL₂]⁺), 668.2 (14, [M+K]⁺), 826.2 (38, [M- S(Me)₂pyrim-Me+AuL]⁺), 841.2 (36, [M- S(Me)₂pyrim+AuL]⁺).

[AuCl(S(Me)₂pyrim)₂bzp], 9: 81%

g [AuCl₂(bzp)]: 65.4 mg, 0.150 mmol

g S(Me)₂pyrim: 42.2 mg, 0.300 mmol

g K₂CO₃: 45.8 mg, 0.331 mmol

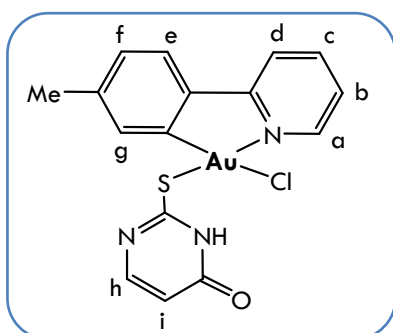


¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.52 (d, *J* = 5.0 Hz, 1H, H_a), 7.67 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H, H_h), 7.52 – 7.47 (m, 1H, H_c), 7.41 – 7.34 (m, 2H, H_e+H_f), 7.31 – 7.27 (m, 1H, H_g), 7.08 (dd, *J* = 10.5, 5.6 Hz, 2H, H_b+H_d), 6.65 (s, 1H, H_i), 4.39 (s, 2H, H_{CH₂}), 2.30 (s, 6H, H_{Me}). **¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃)** δ 167.40 130.94 (C_e), 129.97 (C_f), 127.38 (C_g), 123.69 (C_d), 121.14 (C_b), 116.23 (C_i), 42.99 (C_{CH₂}), 23.99 (C_{Me}). **IR (ν_{cm⁻¹})** 3045, 2961, 2915, 1610, 1567, 1532, 1431, 1338, 1255, 1246, 1225, 1027, 880, 781, 761, 543, 285. **MALDI⁺ MS m/z (%)**: 504.0 (100, [M-Cl]⁺), 533.2 (42, [AuL₂]⁺), 681.2 (2, [M-Cl-2Me+L+K]⁺), 840.1 (16, [M- S(Me)₂pyrim +AuL]⁺), 1205.1 (3, [M- S(Me)₂pyrim +Au₂L₂]⁺).

COMPLEJOS DE AU(III) CON 2-TIOURACILO

Sobre una disolución etanólica de KOH se adiciona el 2-tiouracilo, formándose una suspensión blanca que se deja desprotonar durante 20 min. A continuación, se añade [AuCl₂L] provocando un cambio de color a amarillo que se va intensificando durante las 2h siguientes. El sólido formando se filtra por gravedad.

[AuCl(2-Tiouracilo)tpy], 10: 95%



g [AuCl₂(tpy)]: 66.2 mg, 0.152 mmol

g 2-Tiouracilo: 38.9 mg, 0.303 mmol

g KOH: 19.6 mg, 0.349 mmol

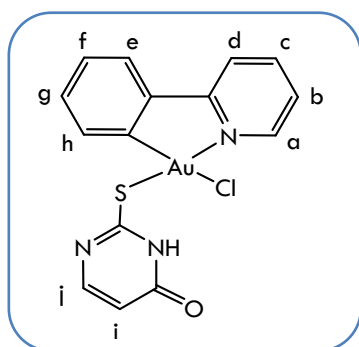
¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ 10.91 (d, *J* = 6.3 Hz, 1H, H_a), 8.39 – 8.28 (m, 2H, H_c+H_d), 7.91 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, H_e), 7.71 – 7.56 (m, 2H, H_i+H_b), 7.29 (d, *J* = 7.0 Hz, 1H, H_f), 6.90 (s, 1H, H_g), 6.07 (d, *J* = 6.4 Hz, 1H, H_h), 2.36 (s, 3H, H_{Me}). **¹³C NMR (101 MHz, DMSO)** δ 152.03 (C_i), 142.19 (C_c), 131.64 (C_g), 129.27 (C_f), 126.37 (C_e), 125.46 (C_b), 121.00 (C_d), 114.05 (C_h), 21.16 (C_{Me}). **IR (ν_{cm⁻¹})** 3016, 1608, 1593, 1557, 1464, 1298, 1207, 1033, 992, 822, 775, 717, 417, 302. **MALDI⁺ MS m/z (%)**: 492.1 (100, [M-Cl+H]⁺), 533.2 (49, [AuL₂]⁺). **MALDI⁻ MS m/z (%)**: 491.1 (100, [M-Cl]⁻).

[AuCl(2-Tiouracilo)ppy], 11: 99%

g [AuCl₂(ppy)]: 64.5 mg, 0.153 mmol

g 2-Tiouracilo: 38.5 mg, 0.300 mmol

g KOH: 20.5 mg, 0.365 mmol



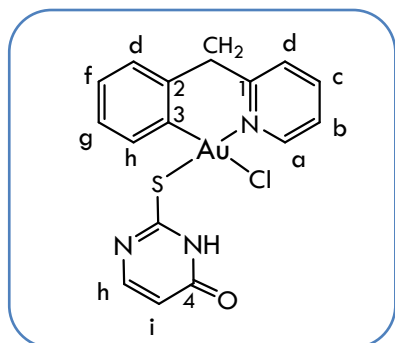
¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ 10.95 (d, *J* = 4.9 Hz, 1H, **Ha**), 8.43 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H, **Hc**), 8.37 (td, *J* = 7.8, 1.5 Hz, 1H, **Hd**), 8.04 (dd, *J* = 7.8, 1.4 Hz, 1H, **Hi**), 7.70 (ddd, *J* = 7.4, 5.9, 1.6 Hz, 1H, **Hh**), 7.63 (d, *J* = 6.4 Hz, 1H, **Hb**), 7.51 – 7.46 (m, 1H, **Hg**), 7.31 (td, *J* = 7.6, 1.4 Hz, 1H, **Hf**), 7.14 – 7.10 (m, **Cj**), 142.91 (**Cc**), 131.79 (**Cf**), 131.36 (**Ce**), 128.76 (**Cg**), 126.62 (**Ch**), 126.04 (**Cb**), 121.37 (**Cd**), 114.09 (**Ci**), 39.52 (**CMe**). **IR (ν(cm⁻¹))** 3018, 1655, 1631, 1608, 1569, 1465, 1298, 989, 813, 753, 728, 655, 412, 315. **MALDI⁺ MS m/z (%)**: 478.0 (41, [M-Cl+H⁺]⁺), 538.2 (100, [M+Na]⁺). **MALDI⁻ MS m/z (%)**: 477.1 (100, [M-Cl]⁻).

[AuCl(2-Tiouracilo)bzp], 12: 98%

g [AuCl₂(bzp)]: 65.5 mg, 0.150 mmol

g 2-Tiouracilo: 38.1 mg, 0.297 mmol

g KOH: 23.5 mg, 0.419 mmol

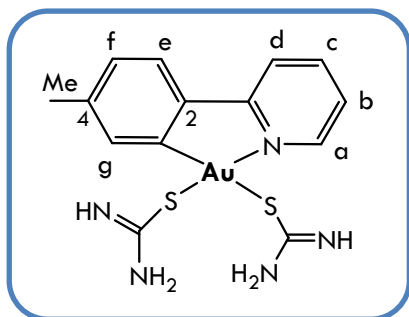


¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ 8.60 (d, *J* = 5.8 Hz, 1H, **Ha**), 8.12 (t, *J* = 7.7 Hz, 1H, **Hc**), 7.84 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H, **Hd**), 7.57 (t, *J* = 6.0 Hz, 1H, **Hb**), 7.53 (d, *J* = 6.3 Hz, 1H, **Hi**), 7.30 (dd, *J* = 8.7, 5.9 Hz, 1H, **Hg**), 7.23 – 7.16 (m, 3H, **Hh+Hf+He**), 6.01 (d, *J* = 6.4 Hz, 1H, **Hj**), 3.68 (d, *J* = 15.1 Hz, 1H, **HCH₂**), 3.57 (d, *J* = 15.0 Hz, 1H, **CCH₂**). **¹³C NMR (101 MHz, DMSO)** δ 166.16 (**C4**), 155.65 (**C1**), 153.29 (**Ci**), 149.75 (**Ca**), 142.89 (**Cc**), 136.49 (**C3**), 134.78 (**C2**), 130.44, 129.23, 128.21, 127.93, (**Ce, Cf, Cg, Ch**), 126.65 (**Cd**), 125.32 (**Cb**), 113.21 (**Cj**), 44.68 (**CCH₂**). **IR (ν(cm⁻¹))** 3071, 1662, 1606, 1566, 1453, 1308, 1226, 1157, 1003, 826, 769, 745, 455, 301. **MALDI⁺ MS m/z (%)**: 492.1 (29, [M-Cl+H⁺]⁺), 533.1 (100, [AuL₂]⁺). **MALDI⁻ MS m/z (%)**: 491.1 (100, [M-Cl]⁻)

COMPLEJOS DE Au(III) CON TIOUREA

Se añade la tiourea sobre la suspensión de [AuCl₂L] en acetona; a continuación, se añade KPF₆ y se lleva a temperatura de reflujo con agitación durante 1 hora. Pasado ese tiempo se lleva a temperatura ambiente y se deja en agitación durante 5 horas más. El sólido obtenido se filtra y se lava con agua.

[Au(tiourea)₂tpy], 13: 68%



g [AuCl₂(tpy)]: 43.9 mg, 0.100 mmol

g Tiourea: 15.6 mg, 0.205 mmol

g KPF₆: 40.3 mg, 0.219 mmol

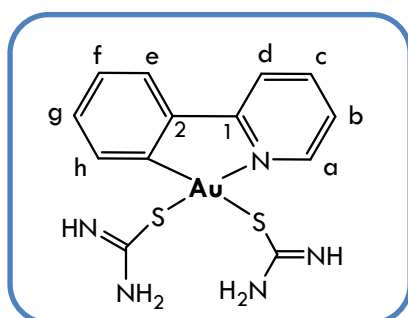
¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ 9.45 (d, *J* = 5.8 Hz, 1H, **Ha**), 8.45 – 8.34 (m, 2H, **Hc+Hd**), 7.96 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, **He**), 7.78 (td, *J* = 7.0, 1.9 Hz, 1H, **Hb**), 7.57 (s, 1H, **Hg**), 7.33 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, **Hf**), 2.40 (s, 3H, **HMe**). **¹³C NMR (101 MHz, DMSO)** δ 151.79 (**Ca**), 143.73 (**Cc**), 142.47 (**C2**), 140.47 (**C4**), 130.60 (**Cg**), 129.67 (**Cf**), 126.98 (**Ce**), 124.83 (**Cb**), 121.67 (**Cd**), 21.57 (**CMe**). **IR (ν(cm⁻¹))** 3337, 3177, 3021, 2967, 1626, 1603, 1588, 1565, 1427, 1402, 1317, 1302, 1247, 1165, 1032, 834, 781, 697, 625, 480, 432, 294. **MALDI⁺ MS m/z (%)**: 440.1 (81, [M-tiourea]⁺), 476.0 (100, [M-C(NH₂)₂]⁺), 513.1 (27, [M]⁺).

[Au(tiourea)₂ppy], 14: 91%

g [AuCl₂(ppy)]: 68.4 mg, 0.162 mmol

g Tiourea: 22.4 mg, 0.294 mmol

g KPF₆: 61.7 mg, 0.335 mmol



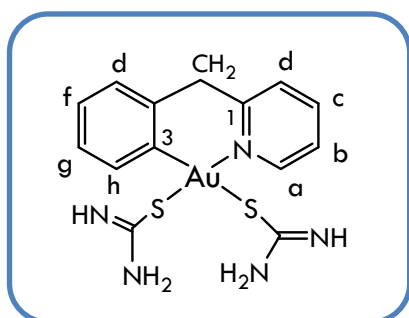
¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ 9.49 (d, *J* = 5.6 Hz, 1H, **Ha**), 8.49 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, **Hd**), 8.42 (t, *J* = 7.7 Hz, 1H, **He**), 8.08 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H, **Hh**), 7.84 (t, *J* = 6.4 Hz, 1H, **Hb**), 7.77 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, **He**), 7.51 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H, **Hg**), 7.43 (t, *J* = 7.1 Hz, 1H, **Hf**). **¹³C NMR (101 MHz, DMSO)** δ 162.98 (**C1**), 151.88 (**C3**), 147.30 (**Ca**), 143.78 (**Cc**), 143.35 (**C2**), 132.08 (**Cf**), 130.27 (**Ce**), 129.19 (**Cg**), 127.13 (**Ch**), 125.33 (**Cb**), 121.97 (**Cd**). **IR (ν(cm⁻¹))** 3275, 3072, 3024, 1631, 1606, 1579, 1489, 1407, 1319, 1304, 1257, 1243, 1168, 1068, 1012, 762, 488, 478, 304. **MALDI⁺ MS m/z (%)**: 426.0 (55, [M-tiourea]⁺), 462.0 (100, [M-C(NH₂)₂]⁺), 499.1 (10, [M]⁺).

[Au(tiourea)₂bzp], 15: 74%

g [AuCl₂(bzp)]: 65.4 mg, 0.150 mmol

g Tiourea: 23.0 mg, 0.302 mmol

g KPF₆: 64.7 mg, 0.351 mmol



¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ 9.17 (d, *J* = 5.0 Hz, 1H, **Ha**), 8.25 (td, *J* = 7.7, 1.5 Hz, 1H, **Hc**), 7.98 (d, *J* = 7.1 Hz, 1H, **Hd**), 7.75 (ddd, *J* = 7.4, 6.1, 1.3 Hz, 1H, **Hb**), 7.47 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H, **Hh**), 7.29 (dd, *J* = 7.4, 1.5 Hz, 1H, **He**), 7.20 (td, *J* = 7.3, 1.1 Hz, 1H, **Hf**), 7.12 – 7.06 (m, 1H, **Hg**), 4.81 (s, 1H, **HCH₂**), 4.34 (s, 1H, **HCH₂**). **¹³C NMR (101 MHz,**

DMSO) δ 155.71 (C1), 151.23 (Ca), 142.98 (Cc), 133.31 (C3), 132.53 (Ch), 129.12 (Ce), 127.99 (Cf), 127.50 (Cg), 126.23 (Cd), 124.38 (Cb), 45.92 (CCH₂). **IR** ($\nu(\text{cm}^{-1})$) 3271, 3070, 1633, 1621, 1577, 1562, 1408, 1342, 1293, 1265, 1161, 1021, 761, 747, 719, 648, 614, 484. **MALDI⁺ MS** m/z (%): 440.1 (46, [M-tiourea]⁺), 476.0 (100, [M-C(NH₂)₂]⁺), 513.1 (38, [M]⁺).

COMPLEJOS DE AU(III) CON ACETATOS

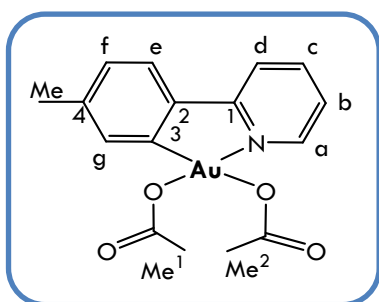
Se sigue el procedimiento descrito por Parish *et al.* Journal of Organometallic Chemistry 596 (2000) 165-176.

Se deja en agitación, en ausencia de luz, la mezcla de acetato de plata y el correspondiente [AuCl₂L] en diclorometano durante 1 hora. A continuación, se filtra por tierra de diatomeas, y las aguas madres se evaporan a sequedad, obteniendo un sólido blanco en todos los casos.

[Au(OAc)₂tpy], 16: 47%

g [AuCl₂(tpy)]: 64.3 mg, 0.147 mmol

g AgOAc: 49.9 mg, 0.299 mmol

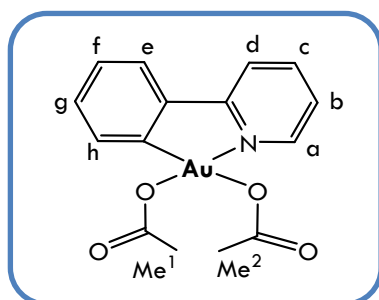


¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.63 (dd, $J = 6.0, 0.9$ Hz, 1H, Ha), 8.06 (td, $J = 8.1, 1.5$ Hz, 1H, Hc), 7.78 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, Hd), 7.40 – 7.35 (m, 1H, Hb), 7.35 – 7.31 (m, 1H, Hf), 7.15 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H, He), 7.02 (s, 1H, Hg), 2.40 (s, 3H, HMe), 2.28 (s, 3H, HMe¹), 2.16 (s, 3H, HMe²). **¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃)** δ 177.30 (C=O¹), 175.58 (C=O²), 165.41 (C1), 148.28 (Ca), 143.10 (C4), 142.90 (Cc), 142.40 (C2), 138.86 (C3), 130.46 (Cg), 129.86 (Ce), 124.80 (Cf), 123.32 (Cb), 120.45 (Cd), 24.69 (CMe¹), 22.47 (CMe²), 22.30 (CMe). **IR** ($\nu(\text{cm}^{-1})$) 3050, 2925, 1667, 1651, 1625, 1606, 1593, 1465, 1362, 1310, 1277, 1009, 824, 770, 703, 676, 419. **MALDI⁺ MS** m/z (%): 424.2 (6, [M-OAc]⁺), 533.2 (100, [AuL₂]⁺), 789.3 (8, [M-OAc+AuL]⁺).

[Au(OAc)₂ppy], 17: 20%

g [AuCl₂(ppy)]: 62.2 mg, 0.147 mmol

g AgOAc: 49.3 mg, 0.295 mmol



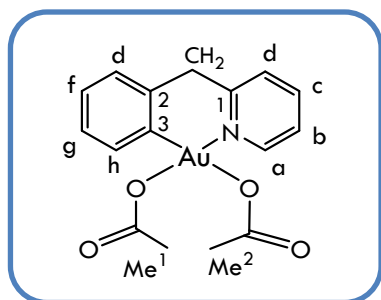
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.68 (dd, $J = 6.0, 0.9$ Hz, 1H, Ha), 8.15 – 8.09 (m, 1H, Hc), 7.85 (d, $J = 7.4$ Hz, 1H, Hd), 7.47 (d, $J = 7.4$ Hz, 1H, Hh), 7.43 (ddd, $J = 7.5, 6.0, 1.4$ Hz, 1H, Hb), 7.39 – 7.33 (m, 1H, Hg), 7.28 (dd, $J = 7.3, 5.9$ Hz, 1H, Hf+He), 2.27 (s, 3H, HMe¹), 2.17 (s, 3H, HMe²). **¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃)** δ 177.36 (C=O¹), 175.56 (C=O²), 148.45 (Ca), 143.08 (Cc), 131.87, 130.03 (Ce, Cf), 129.21 (Cg), 124.93 (Ch), 123.97 (Cb), 120.79 (Cd), 24.67 (CMe¹), 22.38 (CMe²). **IR** ($\nu(\text{cm}^{-1})$) 3117, 3083, 2925, 1651, 1633, 1608, 1492, 1363, 1309,

1286, 1259, 1017, 755, 705, 682, 410. **MALDI⁺ MS m/z (%)**: 505.2 (100, [AuL₂]⁺), 774.3 (6, [M-OAc+AuL]⁺). **MALDI⁻ MS m/z (%)**: 410.0 (100, [M-OAc]⁻)

[Au(OAc)₂bzp], 18: 25%

g [AuCl₂(bzp)]: 67.1 mg, 0.154 mmol

g AgOAc: 58.7 mg, 0.352 mmol



¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 9.04 (dd, *J* = 6.0, 0.8 Hz, 1H, H_a), 7.99 (td, *J* = 7.7, 1.5 Hz, 1H, H_c), 7.68 (d, *J* = 7.0 Hz, 1H, H_d), 7.44 (ddd, *J* = 7.6, 6.0, 1.5 Hz, 1H, H_b), 7.30 (dd, *J* = 7.9, 1.1 Hz, 1H, H_h), 7.13 (dd, *J* = 7.2, 1.1 Hz, 1H, H_f), 7.08 (dd, *J* = 7.3, 1.7 Hz, 1H, H_e), 7.07 – 7.01 (m, 1H, H_g), 4.41 (s, 2H, H_{CH2}), 2.12 (s, 3H, H_{Me1}), 2.04 (s, 3H, H_{Me2}). **¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃)** δ 177.72 (C=O¹), 175.47 (C=O²), 157.36 (C1), 151.40 (Ca), 142.14 (Cc), 131.33 (C3), 130.87 (Ch), 130.57 (C2), 130.35 (Cf), 128.31 (Ce), 127.50 (Cg), 127.27 (Cd), 124.50 (Cb),

47.39 (CCH₂), 24.61 (CMe¹), 22.02 (CMe²). **IR (ν(cm⁻¹))** 3060, 2927, 1667, 1625, 1438, 1356, 1304, 1273, 1005, 760, 678, 448. **MALDI⁺ MS m/z (%)**: 424.2 (14, [M-OAc]⁺), 533.2 (98, [AuL₂]⁺), 591.4 (6, [M-OAc+L]⁺). **MALDI⁻ MS m/z (%)**: 424.1 (45, [M-OAc]⁻), 482.1 (6, [M-H]⁻).

COMPLEJOS DE AU(III) CON AMINOÁCIDOS

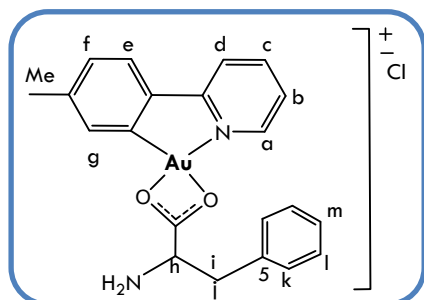
Se disuelve el aa elegido en la disolución de NaOH y metanol. Transcurridos 10 min, se añade [AuCl₂L] y se deja en agitación durante 6 horas, en el caso de L-fenilalanina; 2 horas con L/D-metionina. A continuación, se evapora a sequedad obteniéndose un sólido amarillo.

[Au(fenilalanina)tpy]Cl, 19: 88%

g [AuCl₂(tpy)]: 65.2 mg, 0.149 mmol

g L-fenilalanina: 49.0 mg, 0.297 mmol

g NaOH: 26.1 mg, 0.652 mmol



¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.89 (d, *J* = 5.7 Hz, 1H, H_a), 8.09 – 8.00 (m, 1H, H_c), 7.84 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, H_d), 7.51 (d, *J* = 3.8 Hz, 1H, H_f), 7.45 – 7.38 (m, 1H, H_b), 7.36 (d, *J* = 7.0 Hz, 2H, H_k), 7.32 (d, *J* = 7.3 Hz, 2H, H_l), 7.24 – 7.19 (m, 1H, H_m), 7.15 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, H_e), 6.94 (s, 1H, H_g), 4.25 (dd, *J* = 9.4, 3.5 Hz, 1H, H_h), 3.51 – 3.39 (m, 1H, H_j), 3.03 (dd, *J* = 13.5, 9.4 Hz, 1H, H_i), 2.36 (s, 3H, H_{Me}). **¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃)** δ 148.00 (Ca), 141.56 (Cc), 138.75 (C5), 129.76 (Cg), 128.84 (Ck), 128.46 (Cl), 126.45 (Cm), 124.96 (Cf), 123.77 (Cb), 119.85 (Cd), 67.47 (Ch), 21.82 (CMe). **IR**

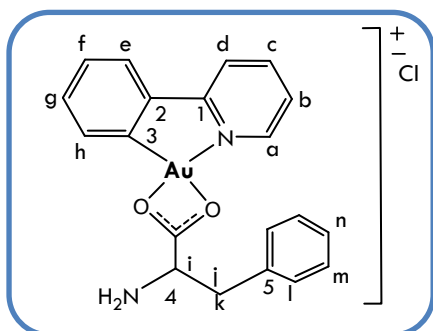
(ν(cm⁻¹)) 3025, 2916, 1578, 1493, 1408, 1315, 1030, 775, 744, 698, 468, 280. **MALDI⁺ MS m/z (%)**: 533.2 (99, [AuL₂]⁺), 898.2 (42, [M+AuL]⁺).

[Au(fenilalanina)ppy]Cl, 20: 60%

g [AuCl₂(ppy)]: 63.5 mg, 0.150 mmol

g L-fenilalanina: 50.3 mg, 0.304 mmol

g NaOH: 30.0 mg, 0.750 mmol



¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.93 (dd, *J* = 5.7, 0.8 Hz, 1H, Ha), 8.11 – 8.06 (m, 1H, Hc), 7.91 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, Hd), 7.63 (dd, *J* = 7.7, 1.4 Hz, 1H, Hh), 7.49 – 7.45 (m, 1H, Hb), 7.38 – 7.27 (m, 6H, H_{Phe}+H_g), 7.22 (dt, *J* = 9.5, 4.3 Hz, 1H, Hf), 7.15 (dd, *J* = 7.7, 1.1 Hz, 1H, He), 4.28 (dd, *J* = 9.6, 3.4 Hz, 1H, Hi), 3.43 (dd, *J* = 13.5, 3.4 Hz, 1H, Hj), 3.03 (dd, *J* = 13.5, 9.6 Hz, 1H, Hk). **¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃)** δ 185.44 (C=O), 162.15 (C4), 148.29 (C1), 142.75 (Ca), 141.85 (C2), 141.09 (Cc), 140.02 (C3), 138.90 (C5), 126.58 (Cn), 125.28 (Ch), 124.51 (Cb), 120.36 (Cd), 67.66 (Ci), 44.47 (Cj-Ck).

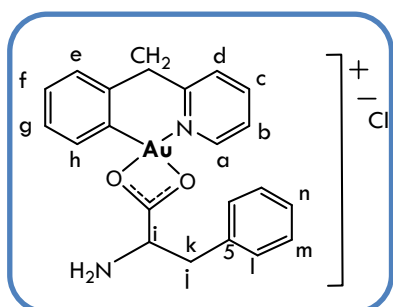
IR (ν(cm⁻¹)) 3027, 2934, 1644, 1606, 1583, 1489, 1444, 1408, 1286, 1255, 1159, 1071, 1028, 910, 754, 727, 699, 644, 534, 412. **MALDI⁺ MS m/z (%)**: 394.3 (7, [AuClPhe]), 505.1 (100, [AuL₂]⁺), 699.1 (4, [Au₂Phe₂+Na]⁺).

[Au(fenilalanina)bzp]Cl, 21: 55%

g [AuCl₂(bzp)]: 65.4 mg, 0.150 mmol

g L-fenilalanina: 29.9 mg, 0.181 mmol

g NaOH: 14.9 mg, 0.372 mmol



¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.95 (dd, *J* = 5.7, 0.9 Hz, 1H, Ha), 7.96 (td, *J* = 7.7, 1.6 Hz, 1H, Hc), 7.64 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H, Hd), 7.45 (ddd, *J* = 7.3, 5.8, 1.3 Hz, 1H, Hb), 7.33 – 7.26 (m, 5H, H_f+H_g+H_h+H_i), 7.23 – 7.19 (m, 1H, Hn), 7.19 – 7.15 (m, 2H, Hm), 7.13 – 7.06 (m, 1H, He), 4.28 (dd, *J* = 9.1, 3.5 Hz, 1H, Hi), 4.19 (d, *J* = 15.4 Hz, 1H, HCH₂), 4.03 (d, *J* = 15.4 Hz, 1H, HCH₂), 3.33 (dd, *J* = 13.5, 3.5 Hz, 1H, Hk), 3.08 (dd, *J* = 13.5, 9.1 Hz, 1H, Hj). **¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃)** δ 183.98 (C=O), 150.68 (Ca), 141.49 (Cc), 138.99 (C5), 130.27 (Cg), 129.78 (Cl), 128.55 (Cf), 128.31 (Ch), 127.85 (Cn), 127.76 (Cm),

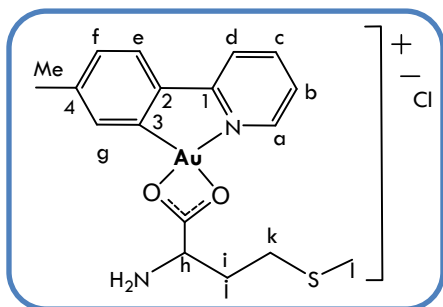
126.45 (Ce), 126.04 (Cd), 124.65 (Cb), 68.18 (Ci), 47.36 (CCH₂), 44.29 (Cj-Ck). **IR (ν(cm⁻¹))** 3056, 2923, 1644, 1603, 1580, 1494, 1433, 1292, 1030, 747, 699, 622, 259. **MALDI⁺ MS m/z (%)**: 533.0 (100, [AuL₂]⁺), 729.0 (17, [M+Au]⁺).

[Au(meteonina)tpy]Cl, 22: 21%

g [AuCl₂(tpy)]: 64.8 mg, 0.149 mmol

g L/D-meteonina: 44.5 mg, 0.298 mmol

g NaOH: 23.2 mg, 0.580 mmol



$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 8.93 (d, $J = 4.9$ Hz, 1H, **Ha**), 8.05 (td, $J = 8.0, 1.5$ Hz, 1H, **Hc**), 7.86 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H, **Hd**), 7.55 – 7.49 (m, 1H, **He**), 7.45 – 7.39 (m, 1H, **Hb**), 7.18 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, **Hf**), 7.15 (s, 1H, **Hg**), 4.35 (dd, $J = 7.9, 4.3$ Hz, 1H, **Hh**), 2.90 – 2.74 (m, 1H, **Hk**), 2.43 (s, 3H, **HMe**), 2.32 – 2.22 (m, 1H, **Hi**), 2.16 (s, 3H, **Hi**), 2.13 – 2.03 (m, 1H, **Hj**). **$^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CDCl_3)** δ 185.90 (**C=O**), 162.40 (**C1**), 148.21 (**Ca**), 142.6 (**C3**), 141.79 (**Cc**), 141.21(**C4**), 139.94 (**C2**), 129.83 (**Cg**), 129.10 (**Cf**), 125.17 (**Ce**), 123.93 (**Cb**), 120.08 (**Cd**), 64.30 (**Ch**), 36.86 (**Cl-Cj**), 30.64 (**Ck**),

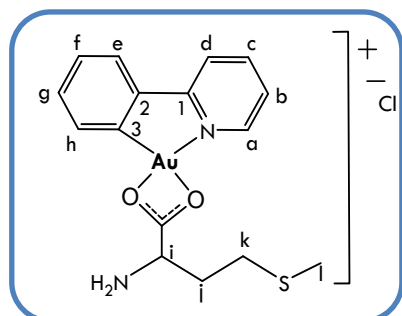
22.02 (**CMe**), 15.48 (**Cl**). **IR** ($\nu(\text{cm}^{-1})$) 3206, 3039, 2916, 2821, 2167, 1654, 1608, 1592, 1492, 1429, 1378, 1286, 1254, 1078, 1039, 838, 769, 707, 665, 597, 425, 387, 327. **MALDI⁺ MS** m/z (%): 512.2 (16, $[\text{M}-\text{HCl}]^+$), 532.3 (100, $[\text{AuL}_2]^+$), 877.4 (6, $[\text{M}+\text{L}]^+$).

[Au(meteonina)ppy]Cl, 23: 19%

g $[\text{AuCl}_2(\text{ppy})]$: 63.7 mg, 0.151 mmol

g L/D-meteonina: 49.0 mg, 0.297 mmol

g NaOH: 26.1 mg, 0.607 mmol



$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 8.93 (d, $J = 5.1$ Hz, 1H, **Ha**), 8.10 (td, $J = 8.0, 1.5$ Hz, 1H, **Hc**), 7.93 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H, **Hd**), 7.64 (d, $J = 7.0$ Hz, 1H, **Hh**), 7.49 – 7.44 (m, 1H, **Hb**), 7.40 – 7.30 (m, 3H, **He+Hf+Hg**), 4.34 (dd, $J = 8.1, 4.1$ Hz, 1H, **Hi**), 2.88 – 2.71 (m, 2H, **Hi**), 2.31 – 2.20 (m, 1H, **Hk**), 2.15 (s, 3H, **HMe**), 2.08 (dd, $J = 13.9, 5.9$ Hz, 1H, **Hj**). **$^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CDCl_3)** δ 162.13 (**C1**), 148.22 (**Ca**), 142.65 (**C2**), 141.84 (**Cc**), 141.18 (**C3**), 131.47, 129.20, 128.32 (**Ce, Cf, Cg**), 125.21 (**Ch**), 124.42 (**Cb**), 120.33 (**Cd**), 64.19 (**Cl**), 36.55 (**Ck-Cj**), 30.59 (**Cl**), 15.39 (**CMe**). **IR** ($\nu(\text{cm}^{-1})$) 2910, 2839, 2158, 2031, 1635,

1606, 1558, 1489, 1442, 1423, 1373, 1258, 1206, 1162, 1026, 985, 825, 756, 662, 509, 325. **MALDI⁺ MS** m/z (%): 499.0 (17, $[\text{M}-\text{Cl}]^+$), 505.0 (43, $[\text{AuL}_2]^+$), 856.0 (3, $[\text{M}+\text{AuL}-\text{Cl}]^+$).

COMPLEJOS DE Au(III) CON RESIDUOS ALQUINILO

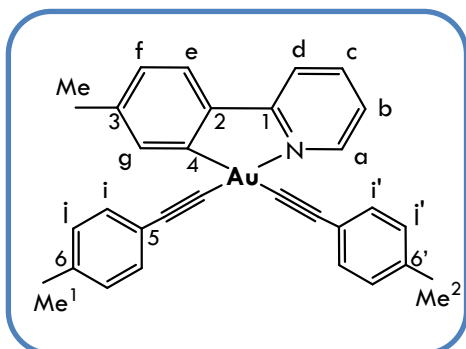
Se disuelve NaOH y el alquino correspondiente en metanol, y se deja en agitación 15 minutos. Transcurrido ese tiempo se añade $[\text{AuCl}_2\text{L}]$ y se deja reaccionar durante 24 horas. La disolución se concentra y el sólido que precipita se filtra y se lava con MeOH.

[Au(p-etinil tolueno)₂tpy], 24: 54%

g $[\text{AuCl}_2(\text{tpy})]$: 64.9 mg, 0.149 mmol

g p-etinil tolueno: 39 μg , 0.302 mmol

g NaOH: 20.2 mg, 0.505 mmol



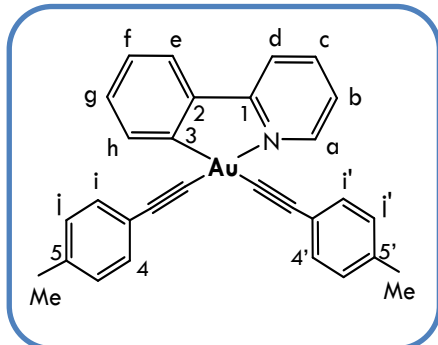
^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 9.69 (dd, $J = 5.8, 1.0$ Hz, 1H, **Ha**), 8.15 (s, 1H, **Hg**), 8.02 (tt, $J = 10.7, 2.4$ Hz, 1H, **He**), 7.86 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, **Hd**), 7.62 – 7.54 (m, 1H, **Hf**), 7.51 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H, **Hh**), 7.47 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H, **Hh'**), 7.37 (ddd, $J = 7.3, 5.8, 1.4$ Hz, 1H, **Hb**), 7.18 – 7.07 (m, 4H, **Hi+Hi'**). **^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3)** δ 167.30 (**C1**), 156.52 (**C5**), 151.03 (**Ca**), 142.61 (**C4**), 141.33 (**Cc**), 137.13 (**C6**), 136.93 (**Cg**), 136.90 (**C6'**), 132.04 (**Ci**), 131.94 (**Ci'**), 128.92, 128.88 (**Cj+Cj'**), 124.24 (**Ce**), 124.67 (**Cf**), 123.48 (**Cb**), 123.24 (**C2**), 119.92 (**Cd**), 116.76 (**C3**), 104.26 (**C \equiv Tolilph**), 99.22 (**C \equiv Tolilph**), 22.25 (**CMe**), 21.61 (**CMe 1**), 21.59 (**CMe 2**). **IR** ($\nu(\text{cm}^{-1})$) 3047, 3022, 2919, 2164, 1607, 1590, 1505, 1166, 1038, 816, 780, 729, 529, 424, 303. **MALDI $^+$ MS m/z (%)**: 533.2 (100, $[\text{AuL}_2]^+$). **MALDI $^-$ MS m/z (%)**: 427.0 (23, $[\text{Au}(p\text{-etilil tolueno})_2]^-$), 480.0 (19, $[\text{M}-(p\text{-etilil tolueno})]^-$)

[Au(*p*-etilil tolueno) $_2$ ppy], 25: 41%

g $[\text{AuCl}_2(\text{ppy})]$: 63.6 mg, 0.151 mmol

g *p*-etilil tolueno: 39 μg , 0.302 mmol

g NaOH: 21.2 mg, 0.530 mmol



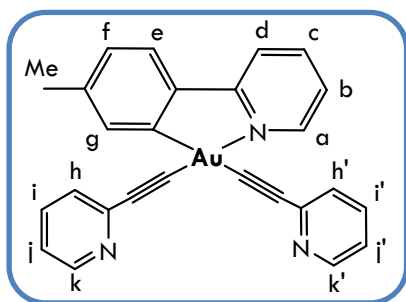
^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 9.74 (d, $J = 4.7$ Hz, 1H, **Ha**), 8.34 (dd, $J = 7.4, 1.3$ Hz, 1H, **Hh**), 8.11 – 8.01 (m, 1H, **Hc**), 7.92 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, **Hd**), 7.72 – 7.65 (m, 1H, **He**), 7.54 – 7.44 (m, 4H, **Hj+Hj'**), 7.45 – 7.38 (m, 1H, **Hb**), 7.38 – 7.31 (m, 1H, **Hg**), 7.11 (dd, $J = 7.8, 4.5$ Hz, 4H, **Hi+Hi'**), 2.35 (d, $J = 2.2$ Hz, 6H, **HMe+HMe 2**). **^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3)** δ 167.19 (**C1**), 156.71 (**C2**), 151.19 (**Ca**), 145.37 (**C3**), 141.51 (**Cc**), 137.16, 136.94 (**C5, C5'**), 136.24 (**Ch**), 132.07 (**Cf**), 132.03 (**Cj**), 131.93 (**Cj'**), 128.93 (**Ci**), 128.87 (**Ci'**), 127.53 (**Cg**), 124.75 (**Ce**), 124.07 (**Cb**), 123.16, 126.13 (**C4, C4'**), 123.13 (**Cd**), 104.26 (**C \equiv Tolilph**), 99.22 (**C \equiv Tolilph**), 21.60 (**CMe**), 21.58 (**CMe**). **IR** ($\nu(\text{cm}^{-1})$) 3051, 2918, 2164, 1665, 1607, 1583, 1505, 1486, 1442, 1310, 1216, 1033, 817, 759, 734, 529, 415, 306. **MALDI $^+$ MS m/z (%)**: 505.2 (33, $[\text{AuL}_2]^+$), 735.4 (100, $[\text{M}+L]^+$). **MALDI $^-$ MS m/z (%)**: 427.0 (100, $[\text{Au}(p\text{-etilil tolueno})_2]^-$), 466.3 (39, $[\text{M}-(p\text{-etilil tolueno})]^-$), 739.3 (20, $[\text{M}+L]^-$).

[Au(2-etinil piridina) $_2$ tpy], 26: 74%

g $[\text{AuCl}_2(\text{tpy})]$: 65.9 mg, 0.151 mmol

g 2-etinil piridina: 31 μg , 0.307 mmol

g NaOH: 20.8 mg, 0.520 mmol



$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 9.71 (d, $J = 4.9$ Hz, 1H, **Ha**), 8.60 (d, $J = 4.7$ Hz, 1H, **Hk**), 8.55 (d, $J = 4.5$ Hz, 1H, **Hk'**), 8.13 (s, 1H, **Hg**), 8.03 (t, $J = 7.7$ Hz, 1H, **Hc**), 7.86 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H, **Hd**), 7.65 – 7.59 (m, 1H, **Hf**), 7.55 (dd, $J = 11.2, 6.7$ Hz, 4H, **Hi+Hi'+Hj+Hj'**), 7.39 (t, $J = 6.5$ Hz, 1H, **Hb**), 7.16 (t, $J = 10.1$ Hz, 3H, **He+Hj+Hj'**), 2.40 (s, 3H, **HMe**).

$^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) δ 149.65 (**Ca**), 147.97 (**Ck+Ck'**), 141.69 (**Cc**), 136.99 (**Cg**), 136.06 (**Cf**), 129.39 (**Ce**), 127.54 (**Ch**), 127.42 (**Ch'**), 125.35 (**Hi+Hi'**), 124.83 (**Cf**), 123.53 (**Cb**), 122.25 (**Cj**), 122.07 (**Cj'**), 120.01 (**Cd**), 22.22 (**CMe**).

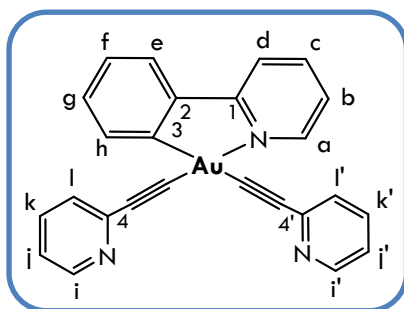
IR ($\nu(\text{cm}^{-1})$) 3073, 2992, 2911, 2170, 2141, 1609, 1578, 1557, 1457, 1422, 1237, 1039, 894, 818, 769, 738, 630, 425. **MALDI⁺ MS** m/z (%): 533.2 (88, $[\text{AuL}_2]^+$), 570.1 (100, $[\text{M+H}]^+$).

[Au(2-etinil piridina)₂ppy], 27: 94%

g $[\text{AuCl}_2(\text{ppy})]$: 64.9 mg, 0.149 mmol

g 2-etinil piridina: 31 μg , 0.307 mmol

g NaOH: 21.5 mg, 0.537 mmol



$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 9.66 (dd, $J = 5.8, 0.9$ Hz, 1H, **Ha**), 8.53 (ddd, $J = 4.9, 1.8, 1.0$ Hz, 1H, **Hi**), 8.49 (ddd, $J = 4.9, 1.8, 0.9$ Hz, 1H, **Hi'**), 8.25 (dd, $J = 7.5, 1.2$ Hz, 1H, **Hh**), 8.04 – 7.97 (m, 1H, **Hc**), 7.86 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, **Hd**), 7.61 (dd, $J = 7.7, 1.4$ Hz, 1H, **He**), 7.58 – 7.51 (m, 2H, **Hk+Hk'**), 7.51 – 7.44 (m, 2H, **Hi+Hi'**), 7.38 (ddd, $J = 7.3, 5.8, 1.3$ Hz, 1H, **Hb**), 7.33 (td, $J = 7.4, 1.5$ Hz, 1H, **Hg**), 7.30 – 7.24 (m, 1H, **Hf**), 7.09 (tdd, $J = 7.5, 4.9, 1.3$ Hz, 2H, **Hj+Hj'**). **$^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CDCl_3)** δ 167.01 (**C1**), 155.76 (**C2**), 151.56 (**Ca**), 149.75 (**Ci**), 149.67 (**Ci'**), 145.66 (**C4**), 145.55 (**C4'**), 145.28 (**C3**), 141.80

(**Cc**), 136.39 (**Ch**), 135.99 (**Ck**), 135.93 (**Ck'**), 132.24 (**Cg**), 127.79 (**Cf**), 127.49 (**Cl**), 127.48 (**Cl'**), 124.88 (**Ce**), 124.40 (**Cb**), 121.99 (**Cj**), 121.82 (**Cj'**), 120.42 (**Cd**), 103.98 ($\text{C}\equiv\text{Cpy}$), 99.24 ($\text{C}\equiv\text{Ctpy}$). **IR** ($\nu(\text{cm}^{-1})$) 3049, 2164, 2144, 1629, 1607, 1580, 1557, 1458, 1423, 1242, 1151, 777, 751, 728, 630, 414. **MALDI⁺ MS** m/z (%): 505.2 (16, $[\text{AuL}_2]^+$), 594.0 (98, $[\text{M+K}]^+$). **MALDI⁻ MS** m/z (%): 401.1 (100, $[\text{Au}(2\text{-etinil piridina})^-]$), 453.1 (11, $[\text{M}-(2\text{-etinil piridina})^-]$).

MATERIALES Y MÉTODOS: ESTUDIOS FARMACOCINÉTICOS

COEFICIENTE DE DISTRIBUCIÓN (LOG P_{7.4})

El coeficiente de partición (P_{ow}) se define como el cociente entre las concentraciones de una sustancia en una mezcla bifásica formada por dos disolventes inmiscibles en equilibrio: n-octanol y agua. Este coeficiente mide la solubilidad diferencial de un soluto en esos dos disolventes.

$$P_{ow} = \frac{[\text{Compuesto}]_{\text{n-octanol}}}{[\text{Compuesto}]_{\text{agua}}}$$

Ecuación 3.1. Coeficiente de partición en octanol/agua.

Cuando se trata de moléculas ionizables se utiliza el término de coeficiente de distribución. Éste se mide a un determinado pH, en este caso se trabaja a pH=7.4 (pH fisiológico), el cual se consigue con una disolución tampón (PBS).

El tampón PBS es una disolución empleada en procesos bioquímicos ya que su composición en iones y osmolaridad es muy similar a la del líquido extracelular de mamíferos. Esta disolución tampón se preparó según la siguiente Tabla:

Tabla 3.1. Composición del tampón PBS

	mM	g/l
NaCl	137	8.01
KCl	2.7	0.20
Na₂HPO₄	20	0.27
NaHPO₄	10	1.40

El pH de la disolución fue llevado hasta 7.4 mediante la adición de HCl o NaOH. El KCl se adiciona para lograr una osmolaridad similar a la presente en el cuerpo humano, y las sales de fosfato son las especies amortiguadoras para conseguir y mantener el pH requerido.

Volúmenes iguales de los dos disolventes, octanol y agua, se presaturaron y llevaron a equilibrio agitando vigorosamente durante 72 horas a temperatura ambiente, para después separar las dos fases formadas con un embudo de decantación.

Para el ensayo se pesó aproximadamente 1 mg de cada compuesto en un bote clip, se disolvió en 5 ml de PBS y 5 ml de n-octanol y a continuación se agitó vigorosamente durante 10 minutos. Transcurrido este tiempo, la disolución resultante se centrifuga a 2000 rpm durante 4 minutos, para conseguir una separación de las dos fases. A cada una de las fases se registra su espectro de absorción en el rango de 200-800 nm.

Para calcular el LogP se usó la siguiente ecuación:

$$\log P_{7.4} = \frac{\text{Abs max.fase orgánica}}{\text{Abs max.fase acuosa}} = \log \frac{[\text{Compuesto}]_{\text{fase orgánica}}}{[\text{Compuesto}]_{\text{fase acuosa}}}$$

Ecuación 3.2. Cálculo del logaritmo de $P_{7.4}$

ESTABILIDAD TÉRMICA EN DISOLUCIÓN

La medida de la estabilidad de los compuestos sintetizados, en condiciones fisiológicas, es decir, a pH 7.4 y a una temperatura 37°C, se realizó mediante la técnica de espectroscopia de absorción visible ultravioleta. Para ello primero se preparó una disolución 6 mM de cada compuesto en DMSO, y a partir de ésta se preparó otra disolución $5 \cdot 10^{-5}$ M en PBS hasta un volumen final de 5 ml. Una vez preparadas las muestras se mantuvieron en un baño termostático a 37°C durante el tiempo total de medida.

De las muestras se obtuvo el espectro de absorción en un rango desde 200 a 800 nm a diferentes tiempos (0, 2, 4, 6, 8 y 24 horas), para poder así estudiar la estabilidad de los compuestos.

ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN DE LOS COMPLEJOS CON ASB

En primer lugar, fue necesaria la preparación de la disolución de ASB (Sigma Aldrich). Para preparar 10 ml de disolución se pesó 1.3280 g de ASB y se disolvieron con PBS (10 mM, pH=7.4). La concentración final de la disolución se comprobó mediante un espectrofluorímetro. Para ello se tomaron 50 µL de la disolución de ASB y se diluyeron en 1.95 ml de PBS. Con el valor máximo de absorbancia del espectro y utilizando la ecuación de Lambert-Beer, conociendo el valor del coeficiente de extinción molar, se pudo calcular la concentración real en la disolución. Esta disolución se alícuota en tubos eppendorfs de 1.5 ml y se congela, para su utilización se descongela con un baño termostático a 37 °C.

Para medir la interacción de los diferentes compuestos con la ASB, se prepara también una disolución 6 mM en DMSO de cada complejo de Au.

Para la realización del experimento, se prepara una disolución de ASB en PBS (50 µM) para después ir aumentando la concentración del complejo mediante la adición de alícuotas de volúmenes de 2.5, 5 o 10 µL. Cada experimento se midió en el espectrofluorímetro esperando un tiempo de 4 minutos tras la adición del compuesto de oro, excitando a 295 nm, y en un rango de 310 a 450 nm.

Este estudio se realizó a diferentes temperaturas: temperatura ambiente (298 K), 305 y 310 K para poder concluir los mecanismos de quenching operativos para cada complejo, así como para conocer el tipo de unión y su fortaleza entre el complejo y la ASB.

MATERIALES Y MÉTODOS: ESTUDIOS FARMACODINÁMICOS

Los experimentos biológicos descritos en este trabajo se llevaron a cabo en el Departamento de Farmacología y Fisiología de la Facultad de Veterinaria (Universidad de Zaragoza).

CULTIVO DE LA LÍNEA CELULAR CACO-2/TC7

El cultivo celular se realizó bajo condiciones estériles en una sala limpia, equipada con una campana de flujo de flujo laminar de clase II (Telstar AV-100). Durante la manipulación de las células y de los medios necesarios, se deben seguir unas pautas generales para minimizar el riesgo de contaminación del cultivo celular:

- .. Antes de cada uso, la campana se esteriliza con radiación UV durante 30 minutos.
- .. El área de trabajo debe desinfectarse con etanol al 70% antes y después del uso, y especialmente después de cualquier derrame de medio, etc.
- .. La buena higiene del usuario es importante: las manos y los antebrazos deben lavarse antes y después de los procedimientos, usando equipos de protección personal y guantes limpios con etanol al 70% o estériles antes de trabajar dentro de la campana.
- .. Los materiales y reactivos deben mantenerse en condiciones estériles.
- .. Se recomienda el uso de materiales plásticos desechables cuando sea posible, así como la esterilización de material de vidrio y otro material mediante el uso de autoclave.
- .. Está prohibido hablar, comer, etc. en frente de la campana, ya que la boca es una fuente de contaminación.
- .. Los experimentos deben realizarse lo más rápido posible para evitar la contaminación, pero se deben evitar movimientos bruscos dentro de la campana, ya que esto podría desestabilizar el flujo de aire.

Las células se mantienen en cultivo en una estufa de CO₂ (Heraeus BB16), a temperatura constante (37°C) en una atmósfera humidificada, con un 95% de aire y un 5% de CO₂. La fuente de humedad se trata con un desinfectante para evitar contaminaciones de cualquier tipo.

EQUIPOS

Además de la campana y de la estufa de incubación, se utilizaron otros equipos para los experimentos celulares:

- .. Un baño termostático: los medios de cultivo deben ser precalentados a 37°C para evitar un shock térmico a las células cultivadas.
- .. Pipeteador, para usar con pipetas de plástico desechables.
- .. Microscopio invertido (Olympus CK2).
- .. Cámara de Neubauer de vidrio.
- .. Centrifugadora con accesorio para Eppendorf y tubos cónicos (Eppendorf 5810R).

MEDIO DE CULTIVO

El medio de cultivo utilizado es un Medio Esencial Mínimo de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), con alta concentración de glucosa (4.5 g/l), suplementado con:

- .. 20% de suero fetal bovino (SFB): proporciona factores de crecimiento y adhesión, hormonas, lípidos, minerales, etc. El suero debe descomplementarse previamente por calentamiento a 56°C durante 30 min.
- .. 1% de aminoácidos no esenciales 10 mM (AANE): para promover el crecimiento celular y viabilidad.
- .. 2% de disolución de L-glutamina 200 mM: es un aminoácido importante con un papel clave en la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos.
- .. 1% de disolución antibiótica (Penicilina 1000 UI/ml + Estreptomina 10 mg/ml): previene la proliferación de bacterias que podrían interrumpir el crecimiento normal de las células, con una acción combinada frente a bacterias Gram (+) y Gram (-).

Así, por ejemplo, para preparar 500 ml de medio completo, se añaden a 400 ml de DMEM, 100 ml de SFB, 5 ml de AANE 10 mM, 10 ml de L-glutamina 200 mM y 5 ml de disolución de penicilina-estreptomina. El medio completo puede almacenarse a 4°C hasta un mes. Por otra parte, el medio completo debe precalentarse a 37°C antes de su uso, para evitar daños a las células.

CRIOCONSERVACIÓN Y DESCONGELACIÓN DE CÉLULAS CONGELADAS

Las líneas celulares se proporcionan congeladas en nitrógeno líquido para asegurar su preservación a largo plazo. Es importante congelar las células en pasajes tempranos para que puedan usarse como una fuente nueva de células. El vial de congelación contiene 1.3×10^6 células en un volumen de 1,5 ml de medio de cultivo, con un 30% de SFB y un 10% de glicerol. El glicerol sirve como agente crioprotector, reduciendo el riesgo de la formación de cristales de hielo que podrían provocar daño celular.

La descongelación es un procedimiento estresante para las células, y debe llevarse a cabo con cuidado. Las células deben transferirse rápidamente del contenedor de nitrógeno líquido a un baño de agua a 37°C. Una vez que el vial está casi completamente descongelado, debe introducirse en la campana de cultivo, limpiando el exterior primero con etanol al 70%. La suspensión celular se coloca en un falcon cónico que contiene 5 ml de medio de cultivo recién calentado y, después de la homogeneización con pipeta, la disolución se transfiere a una caja de cultivo de 25 cm² y se coloca en la estufa.

MANTENIMIENTO Y SIEMBRA DE LA LÍNEA CELULAR CACO-2

El subcultivo (o pasaje) es la eliminación del medio y la transferencia de células de un cultivo anterior a un medio de crecimiento fresco. La siembra de células en una proporción de división adecuada permite que las células estén listas para un experimento en 24 horas, o que se mantengan adecuadamente para su uso futuro en una rutina de subcultivo.

Las células Caco-2 son adherentes, es decir que crecen como monocapas adheridas a una superficie como es el fondo de una caja de cultivo. Las células adherentes se pueden inspeccionar fácilmente bajo el microscopio, pero su crecimiento está limitado por el área de la superficie, por lo que es importante establecer un programa de siembra, junto con una relación de división correcta para evitar la confluencia.

El tapiz celular se tripsiniza semanalmente, cuando las células alcanzan el 80-90% de confluencia, siguiendo el siguiente protocolo que es apropiado para la mayoría de las células adherentes:

- .. El medio de cultivo se elimina por aspiración con una bomba de vacío, seguido de la adición de 5 ml de una disolución de PBS para lavar las células. Movimientos lentos de la caja ayudan a que se distribuya mejor el PBS, pero debe realizarse con cuidado para evitar perturbar la capa celular. Esta operación se realiza dos veces para asegurar que no quede medio de cultivo.
- .. Se adiciona 1 ml de disolución tripsina/EDTA (tripsina (0.25%)/EDTA (1 mM)) en PBS, sobre el tapiz celular.
- .. Las células se incuban de 10 a 15 minutos a 37°C, asegurándose de que la caja está totalmente cerrada.
- .. Después del tiempo de incubación, se saca la caja de la estufa y se dan unos golpecitos en la parte inferior de la caja. Las células se extraen con 5 ml de medio de cultivo, pipeteando varias veces para evitar la formación de grumos que pueden complicar el conteo celular.
- .. Para **determinar la densidad celular**, se mezclan en un tubo Eppendorf 50 µl de la suspensión que contiene las células con 100 µl de Trypan Blue (dilución 1:3). Este colorante tiñe selectivamente las células muertas de color azul, ya que atraviesa la membrana de las células muertas, mientras que las células viables tienen la membrana intacta y no permiten la penetración de este colorante. Esto permite distinguir las células vivas y muertas bajo el microscopio. Se depositan lentamente 10 µl de la suspensión de células teñidas en la cámara de Neubauer y, por capilaridad, ésta cubre la superficie de la cámara. Así, se cuentan el número de células vivas presentes en las dos cuadrículas centrales de la cámara de Neubauer (arriba y abajo), bajo el microscopio invertido, y se calcula la media de células contadas/cuadrícula.
- .. La cuadrícula central de la cámara de Neubauer tiene un volumen de 0.1 mm³, equivalente a 0.1 µl; por lo que la densidad celular puede determinarse mediante el cálculo:

$$\text{N}^\circ \text{ células /ml} = \text{Media de célula vivas contadas} \cdot 3 \text{ (factor de dilución)} \cdot 10000 \text{ (factor de conversión)}$$

Ecuación 3.3. Fórmula para la estimación de la densidad celular utilizando la cámara de Neubauer.

Conocida la densidad celular, se procede al cálculo del volumen de suspensión celular necesario para la siembra. El número de células a sembrar viene determinado por el tipo de experimento que se va a realizar (Tabla 3.2).

Para el mantenimiento de la línea celular, el medio de cultivo debe cambiarse cada 2–3 días, dependiendo de la tasa de crecimiento de las células, hasta el momento del subcultivo. A medida que las células crecen, se produce una acidificación del medio por la generación de ácido láctico, este hecho es visible por el cambio de color del medio: de rosa a naranja-amarillento, gracias a la presencia del indicador rojo fenol.

Tabla 3.2. Número de células Caco-2 sembradas para la realización de cada tipo de experimento.

<i>Experimento</i>	MTT	Anexina o ciclo celular	Caspasa	Estrés oxidativo	TrxR	Continuación experimentos	Siembra mantenimiento
<i>Soporte</i>	Placa 96 Ø	Caja de 25 cm ²	Placa 96 Ø	Caja de 75 cm ²	Caja de 75 cm ²	Caja de 25 cm ²	Caja de 25 cm ²
<i>Experimentos con células cancerígenas</i>	2.0·10 ⁴ céls/Ø	7.5·10 ⁵ céls/caja	10 ³ céls/Ø	2.5·10 ⁶ céls/caja	2.5·10 ⁶ céls/caja	10 ⁶ céls/caja	2.5·10 ⁵ céls/caja
<i>Experimentos con células normales</i>	4·10 ³ céls/Ø	-	-	-	-	-	-

TRATAMIENTO DE LAS CÉLULAS

El medio de tratamiento utilizado es un medio DMEM preparado según se ha descrito anteriormente, pero sin SFB. Con ese medio se prepara una disolución del complejo de Au a la concentración prefijada; para alcanzar dicha concentración se ha partido de una disolución del complejo de Au de 10 mM en DMSO.

En función del recipiente del ensayo se manejan diferentes volúmenes de medio con tratamiento:

- .. 100 µl para los pocillos de las placas de 96 pocillos
- .. 5 ml para las cajas de 25 cm²
- .. 15 ml para las cajas de 75 cm²

Asimismo, cabe destacar que como control a las técnicas realizadas para los estudios de muerte celular y de mecanismos de acción, como control se ha utilizado una concentración 20 µM de DMSO. Esta concentración se evaluó previamente por estudios de viabilidad celular (MTT) en lo que se observó que esta concentración no tenía efecto sobre la viabilidad de células Caco-2 tumorales ni de células Caco-2 normales.

ESTUDIO DE LA CITOTOXICIDAD DE LOS COMPUESTOS MEDIANTE MTT: CÁLCULO DE IC₅₀.

Para estudiar el efecto de los complejos de Au sobre la viabilidad celular y calcular el valor de su IC₅₀ se realizaron ensayos de MTT en células Caco-2. Estos experimentos se realizaron a 5 y 15 días post-siembra, con el fin de poder evaluar la selectividad de los compuestos frente a las células indiferenciadas con un fenotipo más parecido a las cancerígenas (células cancerígenas) y las células más diferenciadas, con un fenotipo más parecido a células epiteliales intestinales normales (células normales), respectivamente.

El MTT es un ensayo colorimétrico estándar basado en la reducción metabólica del MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolio o bromuro de tiazolil azul tetrazolio), ampliamente utilizado para la medición de la proliferación celular. El MTT presenta un color amarillo y, puede atravesar la

membrana mitocondrial de las células viables y ser reducido por la enzima succínica deshidrogenasa para formar cristales de color púrpura de formazán (1-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-3,5-difenilformazan). Estos no son solubles en agua, pero sí en DMSO o en disoluciones de etanol acidificado, entre otros.

La absorbancia a una longitud de onda específica (500-600 nm, dependiendo del disolvente) de la disolución de formazán resultante está relacionada con el número de células vivas mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Viabilidad celular (\%)} = \frac{\text{Abs}_{\text{control}}}{\text{Abs}_{\text{pocillo con tratamiento}}} \times 100$$

Ecuación 3.4. Ecuación para el cálculo de la viabilidad celular.

El protocolo seguido para determinar la citotoxicidad de los complejos sintetizados es el siguiente:

- .. En cada placa de 96Ø se han testado 4 complejos, realizando una curva con las concentraciones: 0, 1, 5, 10, 15 y 20 μM . La concentración de 0 μM se corresponde con el control de células no tratadas (Figura 3.1). Una vez puesto el tratamiento, se deja en incubación durante 72 h a 37°C en la estufa.
- .. Se añaden 10 μl del reactivo MTT (5 mg/ml) a cada pocillo de la placa tratada con los compuestos y luego se incuba durante 2 h 30 min en la estufa a 37°C.

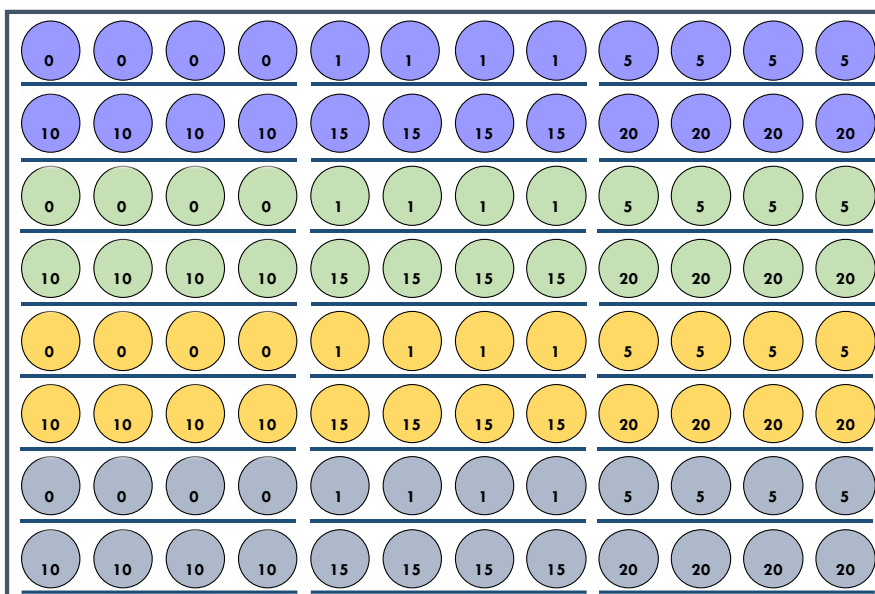


Figura 3.1. Esquema del diseño de una placa de 96Ø para un experimento de MTT. Cada color representa la incubación con un compuesto de Au distinto, de forma que en cada placa se testaban hasta 4 compuestos. En cada pocillo se indica la concentración (μM) utilizada.

- .. Se elimina el medio de cultivo por inversión sobre un papel.
- .. Después se añaden 100 µl de DMSO por pocillo y se agita la placa en un agitador orbital durante 4 min, para disolver los cristales de azul formazán.
- .. Por último, se mide la absorbancia de los pocillos en un lector de placas a 560 nm (DTX 800 Multimode Detector, Beckman Coulter).

El valor de absorbancia obtenido para las células control (0 µM) se utiliza como el valor de referencia correspondiente al máximo de células viables (100%). Se calcula la absorbancia media de los cuadruplicados correspondientes a cada concentración y se resta la absorbancia media del blanco. El porcentaje de viabilidad celular se calcula respecto a la absorbancia de los pocillos control (100%). Se representa la gráfica del porcentaje de viabilidad respecto a la concentración de cada compuesto y se determina la IC₅₀. Este parámetro expresa la concentración de un complejo que produce un efecto inhibitorio y que es capaz de producir el 50% de la inhibición máxima posible, y se ha utilizado para determinar la efectividad de los complejos testados.

ESTUDIOS DE CITOMETRÍA DE FLUJO

El principio básico de la citometría de flujo es la medición individual de las células en suspensión que se mueven a través de un sistema de flujo en un corto período de tiempo, lo que permite analizar 100-25.000 células por segundo. Cada una de células pasa a través del haz de un láser, que se ha configurado a una longitud de onda específica; y un complejo sistema de detectores recopila la información de la dispersión de la luz y la emisión en forma de pulsos de voltaje, que se analizan más a fondo mediante un software específico. Las células se deben desagregar antes del análisis, para que fluyan en una corriente fluida a través del haz de luz y se puedan medir de forma individual.

Esta técnica permite la adición de diferentes fluoróforos a la muestra, los cuales se pueden unir a diferentes componentes nucleares como el ADN, ARN, etc; o pueden conjugarse con antígenos para la detección de proteínas y anticuerpos. Dependiendo de los parámetros a estudiar, se utilizan unos fluoróforos u otros, y la intensidad de emisión de los fluoróforos se va a poder comparar con otros fluoróforos o con parámetros físicos, como el tamaño y la complejidad de las células, para obtener diferente información.

Los experimentos de citometría de flujo fueron realizados por el servicio científico "Separación celular y citometría" en el Centro de Investigación Biomédica de Aragón (CIBA), dirigido por el Dr. Javier Godino.

Para estos experimentos se requiere un gran número de células, por lo que se sembraron en una caja de 25cm² 10⁶ células, y se dejaron crecer durante 5 días. Es al cuarto día post-siembra cuando se realiza el tratamiento con los compuestos de Au (20 µM, 3 ml) y se incuban durante 24 h en la estufa a 37°C.

Transcurridas 24 h con el tratamiento, se realiza la individualización de las células Caco-2 por acción de tripsina/EDTA (2 ml) durante 30 min. Es importante no superar este tiempo de exposición, ya que la tripsina va a poder dañar la membrana de las células vivas. Posteriormente, se centrifugan a 900 g durante 5 min a temperatura ambiente. El sobrenadante se descarta, y las células se resuspenden en 5 ml de medio DMEM sin SFB.

Es entonces cuando se procede a realizar un conteo celular con azul de trypan. Este conteo es necesario ya que, para poder realizar una medida correcta, conviene alcanzar 10⁶ células. Se obtuvieron recuentos de 600-700.000 células/ml, por lo que se tomaron 2 ml de muestra de células de cada caja en un eppendorf.

Las células se centrifugaron a 900 g durante 5 min a temperatura ambiente y se lavaron dos veces con 1 ml de PBS.

ESTUDIO DEL CICLO CELULAR

Para el estudio del efecto de los complejos de Au sobre la proliferación celular, se analizaron las fracciones de las células presentes en cada fase del ciclo celular. Para los estudios de ciclo celular se utilizó como fluoróforo el yoduro de propidio (PI), que se va a unir al ADN nuclear de las células con la membrana plasmática dañada.

El protocolo utilizado para el análisis del ciclo celular es el siguiente:

- .. La alícuota con 10^6 células se centrifuga para eliminar el PBS, y el pellet de células se resuspende con 1 ml de EtOH (70%) almacenado a -20°C . Es importante que la adición se haga despacio y a la vez que se agita con la ayuda de un vortex, para evitar la formación de grumos.
- .. Las muestras se incuban durante 24 horas a 4°C en oscuridad. Las células a 4°C se pueden mantener durante semanas.
- .. Las células se centrifugan a continuación a 3000 rpm durante 5 min y se procede a la eliminación del sobrenadante; luego se añaden 500 μl del tampón de marcaje (940 μl PBS 1x, 50 μl PI 1 mg/ml y 10 μl RNase 10 mg/ml).
- .. La muestra se incuba durante 30 min a temperatura ambiente en oscuridad para que se produzca el marcaje con PI. Antes de introducir la muestra en el citómetro, se filtra con un filtro de 0.3 μm .
- .. El marcaje de las células con el PI se detecta mediante el citómetro Gallios Flow Cytometry, Beckman Coulter, disponible en el servicio de citometría del CIBA, y se obtienen los histogramas de fluorescencia para cada uno de los compuestos testados. La obtención y el análisis de los resultados se llevaron a cabo mediante el programa informático: The Beckman Coulter Kaluza Analysis Software.

Este experimento permite determinar el contenido en ADN celular, que es dependiente de la fase del ciclo en la que se encuentra la célula; y así diferenciar entre las poblaciones celulares presentes en cada una de las fases del ciclo celular: G0/G1, S, G2/M. Los resultados obtenidos se expresan en porcentaje de cada uno de los tipos de poblaciones celulares.

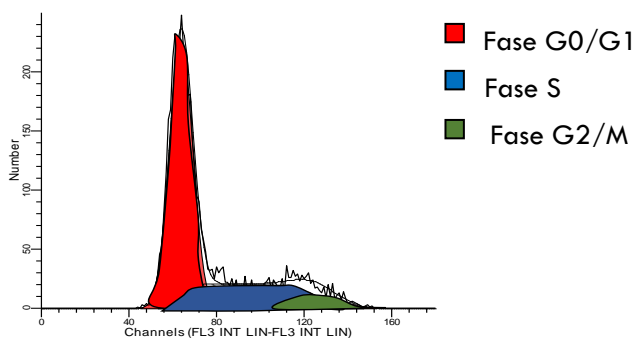


Figura 3.2. Ejemplo de un histograma de fluorescencia obtenido por citometría de flujo con tinción con PI.

ESTUDIO DE APOPTOSIS: DETECCIÓN DE FOSFATIDILSERINA

Para este ensayo, se ha utilizado el kit comercial: Annexin V FITC Apoptosis Detection kit (Ref. ANXVKF-100T) de Immunostep.

La presencia de células apoptóticas se puede estudiar mediante la combinación de los fluoróforos, 7-Aminoactinomicina D (7-AAD) y anexina V. El 7-AAD se une al ADN nuclear y, como no es permeable a la membrana, solo se puede unir al ADN de las células que sufren apoptosis o necrosis tardías, cuando la membrana celular está dañada y presenta defectos. La detección de fosfatidilserina (PS) es una señal de apoptosis, puesto que sólo se expone al exterior de la membrana en células en procesos de muerte celular programada. La membrana celular en células normales está compuesta mayoritariamente por lípidos como el colesterol o fosfolípidos, distribuidos de forma asimétrica en la capa externa respecto de la interna. Uno de los fosfolípidos de la cara interna es la PS, y sólo es externalizada por acción de las flipasas y flopasas como parte del proceso de señalización apoptótico. Así, sólo cuando la PS es externalizada, la anexina V se va a poder unir a ella en presencia de iones calcio (Ca^{2+}). La anexina V se encuentra conjugada con el fluoróforo FITC (isotiocianato de fluoresceína), que va a permitir detectar aquellas células en las que se da la unión PS-Anexina V.

Para determinar el número de células marcadas con anexina V-FITC y/o 7-AAD, se continúa el procedimiento anterior centrifugando las células resuspendidas en PBS durante un pulso a máxima potencia para eliminar el PBS, y el pellet celular se resuspende en 200 μl de Buffer de Anexina. Para obtener una lectura adecuada se preparan diferentes muestras a partir de estas suspensiones celulares:

- 2 muestras para cada uno de los tratamientos realizados: 50 μl de la muestra correspondiente + 2.5 μl de Anexina+ 2.5 μl de 7-AAD.
- 3 muestras control (para verificar el buen funcionamiento de la tinción y la citometría):
 - .. **Anexina:** 50 μl de una muestra cualquiera con muerte celular + 2.5 μl de Anexina.
 - .. **7-AAD:** 50 μl de una muestra cualquiera con muerte celular + 2.5 μl de 7-AAD.
 - .. **Células sin marcar:** 50 μl de una muestra cualquiera con muerte celular.

Todas estas muestras se incuban a temperatura ambiente durante 15 min en oscuridad, para favorecer la reacción con 7-AAD. Transcurrido esos 15 min, se añaden 150 μ l de 1 x *Annexin-binding buffer* a todas las muestras y se cuentan las células marcadas con anexina V-FITC y/o 7-AAD en el citómetro de flujo (BD FACSARIA Cell Sorter, BD Biosciences).

Los datos obtenidos se han representado en forma de distribuciones de frecuencia de puntos ("dot plots") donde cada punto representa una célula individual que ha pasado por el instrumento, con su intensidad de fluorescencia, y que se ha medido a las longitudes de onda de emisión máxima de los marcadores. Los datos obtenidos en el estudio por citometría de flujo de muerte celular usando anexina V-FITC y 7-AAD se representan en forma de distribuciones de frecuencia o histogramas de dos dimensiones, como se muestra en la Figura 3.3. En los histogramas de dos dimensiones o parámetros se representan en cada eje la intensidad de fluorescencia de un parámetro diferente: la interacción con anexina V-FITC está representada en el eje de abscisas, mientras que la interacción con 7-AAD se representa en el eje de ordenadas.

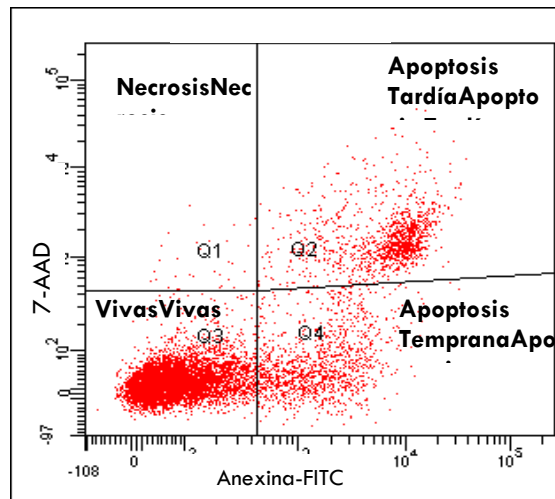


Figura 3.3. Histograma de fluorescencia obtenido por citometría de flujo que representa los diferentes estadios de apoptosis. Células en necrosis (Q1), sólo son marcadas con 7-AAD; células vivas (Q3), no son marcadas ni con 7-ADD ni anexina V; células en apoptosis tardía (Q2), teñidas con anexina V y 7-AAD; células en apoptosis temprana (Q4), en las que sólo se detecta anexina V.

ESTUDIO DE APOPTOSIS: DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA CASPASA 3/7.

Para estudiar si los complejos de Au inducían apoptosis en las células Caco-2 mediante la activación de la vía de las caspasas, se determinó la actividad de las caspasas-3 y -7 mediante el kit comercial de Promega, Caspase-Glo® 3/7 (Ref. G8090).

Este kit proporciona un sustrato para las caspasas 3/7 proluminescente, que contiene una secuencia tetrapeptídica DEVD, en combinación con la luciferasa y un agente de lisis celular. La adición del reactivo Caspase-Glo 3/7 directamente en el ensayo produce la lisis de las células, seguido de la unión de la caspasa al sustrato DEVD y la generación de luminiscencia. La intensidad de la luminiscencia es proporcional a la cantidad de actividad de las caspasas-3 y -7 en la muestra, lo que permite evaluar si los complejos de Au inducen o no apoptosis por esta vía de señalización.

El protocolo seguido para este ensayo requiere no superar las 20.000 células, según recoge el protocolo del kit. De esta forma, se siembra una placa blanca de 96 pocillos con 1.000 céls/pocillo y se incuban a 37°C en estufa. En el día 4 de crecimiento, se realiza un tratamiento con los compuestos de Au (100 µl) 24 h a la máxima dosis testada previamente (20 µM), realizando tres réplicas con cada complejo.

El reactivo de caspasa se debe preparar cuando vaya a ser utilizado, ya que pierde intensidad de señal con el tiempo. Para su preparación se deben atemperar previamente (1h) el buffer de caspasas 3/7 y el sustrato liofilizado de la caspasa 3/7. Una vez atemperados, se transfiere el contenido del recipiente del buffer al recipiente ámbar que contiene el sustrato y se mezcla por inversión hasta que el sustrato esté bien disuelto. De esta forma se obtiene un volumen final de 2.5 ml.

Al igual que los reactivos, la placa a tratar también debe atemperarse antes de añadir el reactivo de caspasa.

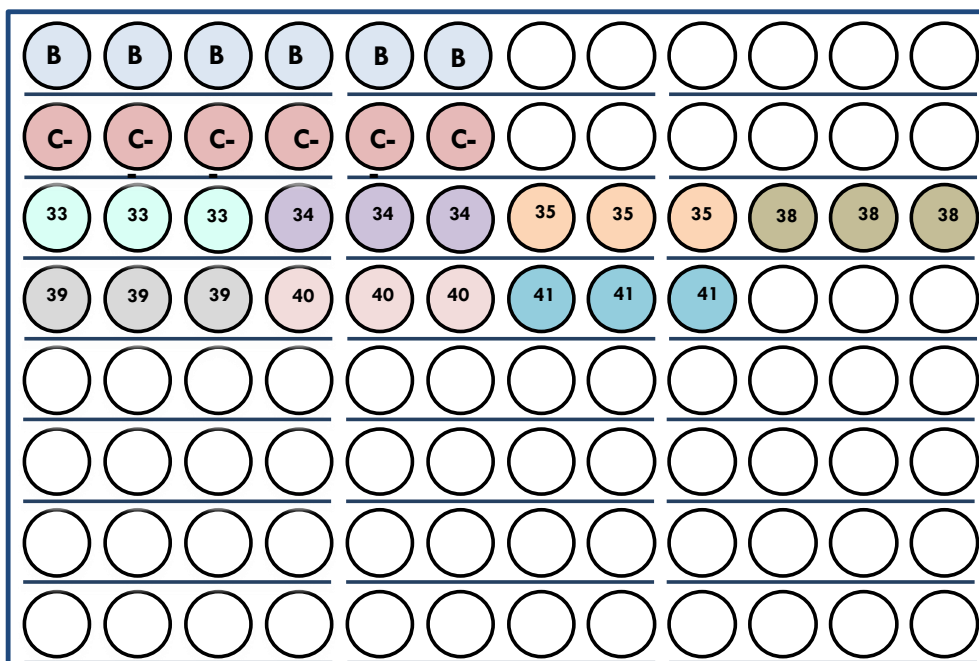


Figura 3.4. Diseño de una placa de 96Ø para ensayo de caspasas-3/7.

Los complejos testados son **33-35, 38-41** con una concentración 20 µM. B es el blanco y C- el control negativo.

Tal y como se recoge en la Figura 3.4, este test requiere de dos tipos de controles: un blanco y un control negativo. En los pocillos destinados al blanco no se van a sembrar células, testándose únicamente el medio de cultivo, junto con el vehículo del fármaco (DMSO, en este caso) y el reactivo de la caspasa. Esta medida es necesaria para medir la luminiscencia residual asociada a estos tres componentes. El control negativo es igual en composición que el blanco, pero éste sí tiene células sembradas. El valor de luminiscencia de estos controles supone el valor de luminiscencia basal de las células.

Tras 24 horas en incubación con los complejos, se añaden tanto a los pocillos tratados como a los controles arriba mencionados, 100 µl del reactivo de caspasa. La placa se cubre con una película de plástico selladora y se agita durante 30 s (300-500 rpm).

A continuación, se incuba la placa durante 1 hora a temperatura ambiente, y se lee la luminiscencia en un lector de placas (FLUOstar® Omega, BMG LABTECH).

A los valores de luminiscencia resultantes se les sustrae el valor medio calculado de los valores del blanco. Los resultados se obtienen en unidades de luminiscencia (RLU) y se representan como porcentaje respecto del control.

ESTUDIOS DE ESTRÉS OXIDATIVO

Para llevar a cabo los estudios de estrés oxidativo se necesita en primer lugar preparar las muestras mediante la extracción de proteínas del homogenado celular. Además, para la determinación del contenido de especies oxidadas, se debe calcular también el contenido de proteína de la muestra mediante el método de Bradford.

La determinación del estrés oxidativo en células Caco-2, tanto en proteínas como en lípidos, se lleva a cabo el 5º día post-siembra tras 24 h de incubación con los complejos de Au (20 µM).

PREPARACIÓN DE HOMOGENADOS CELULARES: EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS

Para la preparación de los homogenados celulares y la extracción de proteínas, se utiliza un buffer de lisis Tris-Manitol (Tris 2mM, manitol 50 mM) que contiene inhibidores de proteasas (Complete™, Mini Protease Inhibitor Cocktail Tablets, Roche), fluoruro de fenilmetilsulfonilo 100 µM, benzamida 25 µg/ml (para preservar las proteínas presentes en la muestra) y 2% de azida de sodio, para evitar contaminaciones.

Antes de proceder al raspado celular, la caja de 75 cm² debe lavarse dos veces con PBS para eliminar el medio con el tratamiento. A continuación, se adiciona el buffer Tris-Manitol sobre el tapiz celular y con un cepillo se raspa para arrastrar las células adheridas en el fondo de la caja. El tapiz raspado se recoge con una pipeta pasteur, y se lleva a un homogeneizador manual cónico Potter-Elvehjem. Después se realizan 40 subidas y bajadas con giro con la varilla en el Potter.

El contenido celular del Potter se sonica para optimizar la rotura de las células mediante ultrasonidos, por lo que se trasvasa a un tubo cónico, que se mantiene en hielo en todo momento. La sonicación, también en hielo, se hace con un retraso de 10 s entre pulsos (un total de 15 pulsos) para que el calor generado se disipe y no dañe la muestra.

Una vez sonicada la muestra, se centrifuga a 3000 g durante 10 min a 4°C para eliminar las mitocondrias y otros orgánulos y se recoge el sobrenadante, que es el que contiene las proteínas que se quieren analizar. Del sobrenadante, se toman alícuotas de 100 µl para la determinación del daño oxidativo en proteínas, 200 µl para determinación del daño oxidativo en lípidos, y 5 µl para cuantificar las proteínas totales utilizando el método de Bradford.

ESTRÉS OXIDATIVO EN PROTEÍNAS: DETERMINACIÓN DE GRUPOS CARBONILOS

De entre todos los biomarcadores posibles para la determinación de daño oxidativo en proteínas, se ha optado por la detección de especies carboniladas. Para ello, se ha utilizado el método basado en la reacción de los restos carbonilo producidos por la oxidación de proteínas, con la 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) para formar la 2,4-dinitrofenilhidrazona. Ésta es un producto estable que puede detectarse

mediante espectrofotometría UV, puesto que el grupo dinitrofenilo (DNP) absorbe luz ultravioleta a 375 nm con un coeficiente de extinción molar de $22.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, lo que permite calcular el contenido de grupos carbonilo total de una proteína o mezcla de proteínas por medida de la absorbancia a 375 nm.

Para la determinación de grupos carbonilos, se han diluido 100 μl del sobrenadante del homogenado celular anterior, con 1000 μl de Tris 50 mM, en un tubo eppendorf de 2 ml. A esta disolución se le añaden 200 μl de DNPH 10 mM y se incuban las muestras durante 1 h a 37°C , tiempo en el cual se producirá la reacción. Transcurrido ese tiempo, las muestras se enfrían en hielo, se homogenizan con el vortex y se añaden 325 μl de ácido tricloroacético (TCA) 50% frío para la precipitación de las proteínas.

A continuación, las muestras se incuban durante 10 min en hielo, y después se centrifugan a 3000 g durante 10 min a 4°C . Se elimina el sobrenadante y el pellet se suspende con 1 ml de etanol/etil acetato (1:1, v:v). Esta operación se realiza dos veces para eliminar la DNPH en exceso que no ha reaccionado con los restos carbonilo.

Por último, el pellet final se disuelve con 700 μl de guanidina 6M en HCl a pH 2, y se incuba durante 15 min a 37°C . Se realiza una última centrifugación de las muestras a 12.000 g durante 10 min a 4°C para precipitar los fragmentos insolubles, y se realiza la lectura de la absorbancia del sobrenadante a 375 nm, en cubeta de cuarzo. Como blanco, se utiliza la disolución de guanidina en HCl.

La concentración de carbonilos en la muestra se calcula mediante la ley de Beer-Lambert, y el contenido de carbonilos se expresa en unidades de nmol de carbonilos por mg de proteína.

ESTRÉS OXIDATIVO EN LÍPIDOS: DETERMINACIÓN DE MDA+4-HDA

Al igual que sucedía con el estrés oxidativo en proteínas, existen numerosos biomarcadores indicadores de daño oxidativo en lípidos. Sin embargo, los subproductos de degradación que se forman son en su mayoría aldehídos (malonilaldehído) e hidroxiderivados (4-HDA o 4-HNE); por ello, la cuantificación de la concentración de malonilaldehído (MDA) y de 4-HDA (hidroxialquenos) representa un excelente indicador de peroxidación lipídica. Así, se ha utilizado un método basado en la reacción de un reactivo cromógeno, N-metil-2-fenilindol, con MDA o con 4-HDA, a una temperatura de 45°C . La condensación de una molécula de MDA o 4-HDA con dos moléculas de N-metil-2-fenilindol produce un cromóforo estable, en presencia de ácido metanilsulfónico, que absorbe a 586 nm, lo que permite su estudio por espectroscopía UV.

Para la cuantificación de MDA + 4-HDA se deben preparar los siguientes reactivos:

- .. **Tris 50 mM pH 7.4**
- .. **Reactivo R1:** 1-metil-2-fenilindol 10.3 mM en acetonitrilo.
- .. **Reactivo R1/ Metanol:** Dilución 3:1 (v/v) Reactivo R1 con metanol en proporción 3:1 (v/v).
- .. **Reactivo R2:** Ácido metanilsulfónico.
- .. **Reactivo S1:** 1,1,3,3-tetrametoxipropano 10 mM en Tris 50 mM pH 7.4.
- .. **Reactivo S1 diluido:** Reactivo S1 diluido en Tris 50 mM en proporción 1:100.

Para la determinación de la peroxidación lipídica por este método, se mezclan 200 μl del sobrenadante del homogenado obtenido por el método descrito anteriormente, con 650 μl de R1/Metanol en un tubo eppendorf de 2 ml y se homogeniza mediante vortex. Cada muestra se realiza por duplicado.

Además, se debe preparar una recta patrón (por duplicado), con el fin de poder determinar la concentración de MDA + 4-HDA en las muestras. En la Tabla 3.2 se indican los volúmenes y reactivos necesarios para la preparación de la recta patrón.

Tabla 3.2. Esquema de las cantidades de las disoluciones de la recta patrón para la determinación de MDA + 4-HDA.

Disoluciones	1	2	3	4	5	6
Reactivo S1 diluido (μl)	0	5	20	30	50	70
Tris 50 mM (μl)	300	295	280	270	250	230
Reactivo R1/metanol (μl)	975	975	975	975	975	975

Por último, se añade el reactivo R2 tanto a las muestras (150 μ l) como a las disoluciones de la recta de calibrado (225 μ l) y se homogeniza mediante vortex.

A continuación, todas las preparaciones se incuban a 45°C durante 40 min en un baño termostático. Después se centrifugan a 3000 g durante 10 min a 4°C. Se dejan reposar a temperatura ambiente y se mide la absorbancia del sobrenadante a 586 nm en un espectrofotómetro (*Helios Epsilon, Thermo Scientific*).

La concentración de carbonilos se calcula a través de la recta de calibrado, se representa la absorbancia de las disoluciones frente a la concentración del reactivo S1 diluido (mmolar). Los datos de absorbancia medidos para cada muestra se calculan por interpolación con dicha recta patrón. Finalmente, la concentración calculada de MDA + 4-HDA se expresa en nmol por mg de proteína.

DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS POR EL MÉTODO DE BRADFORD

El ensayo de Bradford es una técnica colorimétrica que permite calcular la cantidad de proteína en disolución basada en la absorbancia de la reacción entre el colorante Azul Brillante de Coomassie G-250 y los grupos carboxílicos y aminos de los aminoácidos de las proteínas. Cuando el colorante se une a las proteínas de la disolución se produce un cambio de color desde el marrón-rojo al azul, con el correspondiente cambio también en su máximo de absorción, cambia de 465 a 595 nm.

La cantidad de proteínas totales de la muestra problema se obtiene por interpolación en una curva patrón preparada con cantidades conocidas de albúmina de suero bovino (ASB). Para la realización de la curva patrón se utiliza ASB 1 mg/ml, preparándose varios puntos con concentración ascendente de ASB (por duplicado), tal como se muestra en la siguiente Tabla:

Tabla 3.3. Cantidades necesarias para la preparación de la recta patrón de ASB para el método de Bradford.

Disoluciones	1	2	3	4	5
ASB (μl)	0	2	5	10	15
Tris-Manitol (μl)	20	18	15	10	5
Bradford (ml)	1				

Las muestras se preparan en un tubo eppendorf de 1.5 ml donde se adicionan 5 μ l del homogenado celular obtenido por el procedimiento descrito anteriormente, 15 μ l del buffer Tris-Manitol y 1 ml de reactivo Bradford (atemperado previamente). Todas las muestras se homogenizan mediante vortex y tras 5 minutos, se mide su absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro. Las concentraciones de proteína en las muestras problema se determinan extrapolando los valores de absorbancia con los de la recta patrón, expresando el resultado final en mg por ml de proteína.

ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA TIORREDOXINA REDUCTASA

El método utilizado para evaluar la actividad enzimática de la TrxR, se basa en la reducción del ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB) con NADPH al ácido 5-tio-2-nitrobenzoico (TNB). Esta reacción sólo ocurre cuando la enzima está activa, y como resultado de la formación de TNB se produce un color amarillo intenso, que puede detectarse por espectroscopia UV a 412 nm.

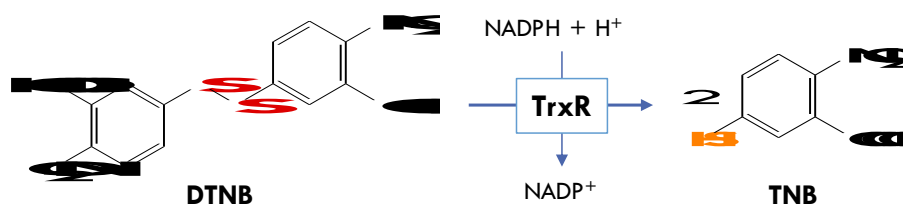


Figura 3.5. Reacción química para la evaluación de la actividad enzimática de la TrxR.

Para este ensayo se utilizó el kit comercial “Thioredoxin Reductase Assay Kit” de Sigma (Ref. CS0170), el cual contiene los productos necesarios para la preparación de los reactivos que se requieren para la medida de la actividad de la TrxR:

- 1 x Assay Buffer
- Disolución de DNTB: 39.6 mg/ml de DNTB en DMSO.
- Working Buffer: 100 mM K_3PO_4 con 10 mM EDTA y 0.24 mM NADPH. Este reactivo se prepara por adición de 50 μ l de la disolución de NADPH a 2 ml del Assay Buffer 5x. A continuación, con agua miliQ se lleva hasta un volumen final de 10 ml.
- Inhibidor de la tiorredoxina reductasa: se diluyen 10 μ l del Thioredoxin Reductase Inhibitor Solution 20 veces con DMSO hasta un volumen final de 200 μ l.
- Control positivo de tiorredoxina reductasa: 5 μ l de la Thioredoxin reductase se diluyen 20 veces con el 1x Assay Buffer hasta un volumen final de 100 μ l.

El kit incluye un inhibidor de la TrxR porque se debe cuantificar la reducción de DNTB a TNB con la TrxR inhibida, para poder determinar el porcentaje de reducción que se debe exclusivamente a la TrxR. De esta forma, a la absorbancia total registrada sin inhibidor se le resta la absorbancia medida con inhibidor.

La reacción antes mencionada se prepara en una cubeta de 1 ml añadiendo las cantidades de los reactivos, así como en el orden que se recoge en la Tabla 3.4.

Tabla 3.4. Preparación de las muestras para medir la actividad enzimática de la tiorredoxina reductasa.

Muestra	Working Buffer (μl)	1 x Assay Buffer (μl)	Enzima TrxR (μl)	Inhibidor de TrxR (μl)	DTNB (μl)
Blanco	900	70	0	0	30
Control positivo	900	60	10	0	30
Muestra	900	20	50	0	30
Muestra + Inhibidor	900	0	50	20	30

Una vez que se añaden los 30 μl de DNTB, se mezcla la disolución por inmersión y se mide la absorbancia a 412 nm en un espectrofotómetro (*U-2800A Spectrophotometer, Hitachi*) que nos permite medir la cinética de esta enzima. Para que la medida se estabilice se deja un retraso de 120 s y posteriormente se mide el cambio colorimétrico en intervalos de 10 s hasta llegar a los 300 s.

La tasa de formación del color amarillo debida al TNB formado se determina midiendo el incremento en la absorción ($\Delta A_{412}/\text{min}$) para cada reacción. Luego, calculamos la actividad enzimática de la TrxR, teniendo en cuenta el $\epsilon_{\text{TNB}}(412 \text{ nm}) = 14.15 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, mediante la fórmula:

$$\text{Actividad Enzimática} = 2 \times \frac{\Delta A_{412}/\text{min}}{14.15} \times \text{Factor dilución}$$

Ecuación 3.5. Fórmula para el cálculo de la actividad enzimática.

Donde: $\Delta A_{412}/\text{min} (\text{TrxR}) = [\Delta A_{412}/\text{min} (\text{muestra}) - \Delta A_{412}/\text{min} (\text{muestra} + \text{inhibidor})]$, y el factor de dilución es 20.

Para el cálculo de la actividad enzimática se debe tener en cuenta la estequiometría de la reacción, así y dado que cada molécula de DNTB se forman 2 de TNB, se multiplica por dos. Una vez conocida la actividad enzimática, se calcula la actividad específica según la ecuación X, donde el resultado se expresa en unidades de TrxR/mg proteína.

$$\text{Actividad Específica} = \frac{\text{Actividad enzimática}}{\text{mg proteína}}$$

Ecuación 3.6. Fórmula para el cálculo de la actividad enzimática.

ESTUDIOS EN CULTIVOS PRIMARIOS

La realización de los experimentos relacionados con los cultivos primarios ha sido llevada a cabo bajo el procedimiento P43/17, aprobado por el Comisión de Experimentación Animal de la Universidad de Zaragoza.

MODELO MURINO DE CÁNCER DE COLON

El modelo murino de inducción de cáncer de colon se basa en la combinación de dos productos químicos: el azoximetano (AOM), que es un agente cancerígeno, y el dextrano sulfato de sodio (DSS), que produce inflamación. De esta forma, se utilizaron 15 ratones hembras CD1 (16 semanas, Envigo), a las que se inyectó intraperitonealmente con una única dosis de 12 mg/Kg de AOM el día 1, seguido de la administración de 3 ciclos de DSS (3% DSS de peso molecular 40 kDa (Sigma), 5 días y agua de bebida, 16 días) y luego, agua de bebida hasta el final del experimento. El DSS disuelto en agua es tóxico para el revestimiento epitelial del colon y produce colitis grave, que junto con el cancerígeno AOM favorece la proliferación de procesos tumorales.

Para comprobar el efecto del tratamiento, durante el periodo de administración del DSS (5días) y del agua (5 días después del DSS), se monitorizaron diariamente el peso de los animales y la cantidad de agua bebida por ellos. Los ratones mostraron durante el tratamiento pérdidas de peso de hasta un 10%, inapetencia e inactividad, lo que demostraba la efectividad del tratamiento y la supuesta aparición de lesiones tumorales en el colon. Para favorecer en todo lo posible el bienestar de los animales, durante el periodo de los ciclos de DSS, se les humedeció los pellets de la comida con agua y se les administró 1 ml de solución salina fisiológica por vía oral, con el fin de mejorar su hidratación. Sin embargo, lamentablemente algunos ratones no pudieron soportar el tratamiento y murieron antes de finalizarlo. En total, se utilizaron para obtener tumores de colon un total de 10 ratones. Los tumores de colon se aislaron de los ratones tratados con AOM/DSS a partir de las 10 semanas de haberse iniciado el protocolo.

CULTIVOS PRIMARIOS DE COLON DE RATÓN

Para este protocolo se requiere, en primer lugar, la preparación de tres medios distintos: medio de digestión enzimática (MDE), medio de cultivo completo (MCC) y medio de recogida y almacenamiento de tejido (MRA), que se preparan de acuerdo a la siguiente Tabla:

Tabla 3.5. Componentes y concentraciones del medio de digestión enzimática (MDE), del medio de cultivo completo (MCC) y el medio de almacenamiento de tejido (MRA).

Casa Comercial	Compuesto	MDE	MCC	MRA
Thermo Fisher	DMEM	25 ml	40 ml	25 ml
Thermo Fisher	Suero Fetal Bovino (SFB)	125 µl	10 ml	250 µl
Thermo Fisher	Penicilina/Estreptomicina (10 ⁴ U/ml/10 ⁴ µg/ml)	250 µl	500 µl	250 µl
Thermo Fisher	Anti/Anti 100x (Antibiótico-Antimicótico)	250 µl	500 µl	250 µl
Thermo Fisher	Gentamicina (50 mg/ml)	25 µl	50 µl	250 µl
Thermo Fisher	Glutamina (200 mM)	250 µl	500 µl	
Sigma	Insulina (100 UI/ml)	25 µl	50 µl	
Thermo Fisher	Colagenasa I (20 mg/ml)	50 µl		
Sigma	EFG (50 µg/ml)	5 µl	10 µl	
Roche, Sigma	Dispasa I (40 mg/ml)	50 µl		

Los ratones, tras pesarlos y anotar los síntomas clínicos externos, se sacrifican por dislocación cervical. A continuación, se colocan decúbito supino y se limpia el abdomen con etanol. Utilizando material quirúrgico estéril, se realiza una incisión por la línea alba, para acceder a la cavidad abdominal, con cuidado de no tocar el tejido. Se corta por el esófago y se tira agarrando por el estómago con ayuda de una pinza. Después, se corta por el recto y se estira para que salga todo el paquete intestinal.

A continuación, se coloca todo el aparato digestivo en una placa de Petri con PBS. Se corta el colon, el segmento de intestino localizado entre el ciego y el ano, y se abre en sentido longitudinal con unas tijeras de microcirugía. Se lava con PBS el contenido intestinal y se coloca el colon estirado, con la serosa hacia arriba, sobre un papel de aluminio. Con ayuda de un papel secante se le da la vuelta para que los tumores localizados en la mucosa queden a la vista. Se localizan los tumores en el colon con la ayuda de una lupa. Los tumores se seccionan con 2-3 mm de tejido normal para no dañar el tejido tumoral y se sumergen inmediatamente en medio MRA, donde pueden estar hasta 3h a temperatura ambiente.

Además, se tomaron también muestras de pulmón para aislar los fibroblastos como control positivo de la técnica, las cuales también se sumergieron inmediatamente en medio MRA.

El tejido de un tumor completo o un trozo de tumor de 4-9 mm² almacenado en MRA se tritura con ayuda de dos bisturís en un volumen total de 1 ml de MDE en una placa de plástico circular estéril de 10 cm². Los trocitos de la muestra deben de ser lo suficientemente pequeños como para que pasen por una pipeta de 10 ml.

Una vez molida la muestra, se introduce en un falcon estéril de 15 ml que contiene 5 ml de MDE y se incuban de 4 h, a 150 rpm a 37°C en un incubador con agitación.

Transcurrido ese tiempo, las muestras se centrifugan 5 min a 540 g, y se retira el sobrenadante de MDE. El pellet se resuspende en 2 ml de DMEM. Este paso se repite dos veces. Las células tumorales se resuspenden finalmente en 2ml de MCC. La suspensión de células en MCC se filtra con un filtro de células de Nylon estéril de 100 μm en un Falcon de 50 ml.

A continuación, se procede al conteo de las células presentes, utilizando la cámara de Neubauer. Se obtuvieron conteos de 600.000-3 \cdot 10⁶ células/ml. Las células tumorales se sembraron en una placa de 96 \emptyset , a una concentración entre 100.000-300.000 células/pocillo. Las células se incubaron sin tocarlas durante dos días en la estufa a 37°C y posteriormente, el medio de cultivo MCC se cambiaba cada dos o tres días.

A los 7 días post-siembra, se llevaron a cabo con estas células los estudios de apoptosis en los que se determinaba la presencia de fosfatidilserina mediante marcaje con 7-AAD y Anexina V-FITC en el citómetro de flujo.

ANÁLISIS DE DATOS Y HERRAMIENTAS INFORMÁTICAS

Los datos obtenidos que se obtuvieron de cada ensayo y/o medida se registraron y trataron con el programa Microsoft Excel de Microsoft Office. Una vez se había realizado en tratamiento matemático, se utilizó el programa de análisis estadísticos Prism 5.02 de Graphpad Software.

En el caso de los estudios de viabilidad celular, se realizaron test ANOVA de 1 vía y un post-análisis Bonferroni para evaluar diferencias entre la viabilidad celular y la dosis administrada del complejo de Au. Asimismo, para el cálculo de IC₅₀ se realizaron análisis lineales no regresivos. Para el resto de estudios de apoptosis y sus mecanismos asociados, se comparó cada uno de los tratamientos con los complejos de Au con muestras control sin tratar mediante una prueba t de Student no pareada. Los resultados se expresaron como media \pm el error estándar de la media (EEM). Se consideró un intervalo de confianza del 95%, estableciendo el grado de significación en $p < 0.05$.

BIBLIOGRAFÍA

1. Uson, R.; Laguna, A.; Laguna, M.; Briggs, D. A.; Murray, H. H.; Fackler, J. P., (Tetrahydrothiophene)Gold(I) or Gold(III) Complexes. *Inorg. Synth.* **2007**, *26*, 7.
2. Bauer, A.; Mitzel, N. W.; Schier, A.; Schmidbaur, H.; Rankin, D. W. H., Tris(dimethylamino)phosphane as a New Ligand in Gold(I) Chemistry: Synthesis and Crystal Structures of $[(\text{Me}_2\text{N})_3\text{P}]\text{AuCl}$, $\{[(\text{Me}_2\text{N})_3\text{PAu}]_3\text{O}\}^+\text{BF}_4^-$, $\{[(\text{Me}_2\text{N})_3\text{PAu}]_3\text{NP}(\text{NMe}_2)_3\}^{2+}$ $\{\text{BF}_4\}^-$ and the Precursor Molecule $(\text{Me}_2\text{N})_3\text{PNSiMe}_3$. *Chemische Berichte* **1997**, *30* (4), 5.
3. Janzen, D. E.; Doherty, S. R.; VanDerveer, D. G.; Hinkle, L. M.; Benefield, D. A.; Vashi, H. M.; Grant, J. G., Cyclometallated gold(III) complexes with a trithiacrown ligand: Solventless Au(III) cyclometallation, intramolecular gold-sulfur interactions, and fluxional behavior in 1,4,7-trithiacyclononane Au(III) complexes. *Journal of Organometallic Chemistry* **2014**, *755*, 10.
4. Constable, E. C.; Leese, T. A., Cycloaurated derivatives of 2-phenylpyridine. *J. Organomet. Chem.* **1984**, *363* (3), 5.

CONCLUSIONES

- Se han estudiado diferentes métodos para la obtención de derivados ciclometalados de Au(III): $[\text{AuCl}_2(\text{CN})]$ (CN: 2-tolilpiridina (tpy), 2-fenilpiridina (ppy) y 2-bencilpiridina (bzp)), sin que se haya podido encontrar un método general que haya permitido su obtención; y consecuentemente su posible extensión a otros ligandos. Asimismo, ha sido necesario optimizar procedimientos para cada uno de ellos, de forma que los derivados con 2-tolil y 2-fenil piridina, se han obtenido por calentamiento en estado sólido; mientras que el derivado con 2-bencil piridina se ha obtenido por reacción a reflujo en mezcla de MeCN/agua, optimizada a una relación 1:4.
- A partir de los derivados anteriores, se han sintetizado derivados ciclometalados por sustitución de uno o dos (generalmente dos) grupos cloruro, por otros ligandos. De esta forma, se han obtenido diferentes complejos con fórmula $[\text{AuX}_2(\text{CN})]$ X: 2-mercaptopirimidina, 4,6-dimetil-2-mercaptopirimidina, 2-tiouracilo, tiourea, acetato, L-fenilalanina, D/L-metionina, *p*-tolilacetileno y 2-etinilpiridina. Dichos complejos se han caracterizado por las técnicas habituales de caracterización estructural, incluido difracción de rayos X para el complejo: $[\text{Au}(\text{C}\equiv\text{Ctolilpy})(\text{tpy})]$.
- En todos los productos anteriores de Au(III), junto con complejos de Au(I) de fórmula general $[\text{AuX}(\text{P}(\text{N}(\text{Me})_3)_2)]$ X: 2-mercaptopiridina, 2-mercaptopirimidina, 4,6-dimetil-2-mercaptopirimidina, 2-Mercaptobenzotiazol, 2-mercaptotiazolina, 2-mercaptobenzimidazol, 2-tiouracilo, fenilacetileno, tolilacetileno, 4-metoxi-fenilacetileno, 4-Cl-fenilacetileno, 4-Br-fenilacetileno, 2-etinil piridina y 3-etinil piridina, se han evaluado sus propiedades ADME: solubilidad en agua, coeficiente de reparto en octanol-agua, estabilidad en condiciones fisiológicas e interacción con proteínas de transporte. Además, se han caracterizado por difracción de rayos X los derivados de Au(I), $[\text{Au}(2\text{-Mercapto-4,6-dimetilpirimidina})\text{HMPT}]$, $[\text{Au}(2\text{-Mercaptobenzotiazol})\text{HMPT}]$, $[\text{Au}(4\text{-OMe-fenilacetileno})\text{HMPT}]$ y $[\text{Au}(\text{Tolilacetileno})\text{HMPT}]$. Estos derivados mencionados, presentan inicialmente unas propiedades que aconsejan testarlos como posibles agentes antitumorales.
- Todos estos derivados, al ser testados en la línea celular de carcinoma de colon humano, Caco-2/TC7, presentan valores de IC_{50} que, en el caso de los derivados de Au(I) varían entre 3.08 y 7.40 ± 0.20 μM , lo que les hace ser mejores que el *cis*-platino (45.6 ± 8.08), y buenos candidatos para futuros estudios. En el caso de de los complejos de Au(III), sólo los derivados $[\text{Au}(\text{Spym})(\text{ppy})]$, $[\text{AuCl}(2\text{-TU})\text{L}]$ L=tpy y bzp, $[\text{Au}(\text{tolilacetileno})_2\text{tpy}]$ y $[\text{Au}(\text{Phe})(\text{ppy})]\text{Cl}$ presentan actividad citotóxica para estas células tumorales.
- Tan importante o más, que la posible actividad citotóxica frente a células tumorales, es que los derivados que van a seleccionarse, no presenten actividad frente a células normales. Así, sólo los derivados de Au(I): ($[\text{Au}(2\text{-Mercaptobenzimidazol})\text{HMPT}]$ y $[\text{Au}(2\text{-Tiouracil})\text{HMPT}]$), con unidades tiol; y los complejos: $[\text{Au}(\text{Fenilacetileno})\text{HMPT}]$, $[\text{Au}(4\text{-Br-fenilacetileno})\text{HMPT}]$, $[\text{Au}(4\text{-Cl-fenilacetileno})\text{HMPT}]$, $[\text{Au}(2\text{-etinilpiridina})\text{HMPT}]$ y $[\text{Au}(3\text{-etinilpiridina})\text{HMPT}]$, con unidades alquinilo, que mostraban efecto sobre células tumorales, no muestran efecto sobre la viabilidad celular en células Caco-2 confluyentes al 100%, que se comportan como células epiteliales normales.

7. Se han estudiado los mecanismos de acción para los complejos de Au(I) eficaces de forma selectiva para las células tumorales: estudios de ciclo celular, apoptosis y estrés oxidativo; resultando que los complejos [Au(C≡CR)HMPT] R:4-cloro-fenil, 4-bromo-fenil, 2-piridina y 3-piridina son complejos proapoptóticos mediante la externalización de fosfatidilserina en la membrana celular. A su vez, también son compuestos que alteran del ciclo celular, mientras [Au(C≡CR)HMPT] R:4-cloro-fenil, 4-bromo-fenil y 3-piridina, lo hacen en la fase G₂/M, R:2-piridina lo hace en la fase S.
8. Estudios del efecto del estrés oxidativo en las principales biomoléculas, lípidos y proteínas, concluye que los derivados testados no infringen daño oxidativo en proteínas pero sí en lípidos. Esta oxidación en los lípidos de membrana podría ser el resultado de la inhibición sobre la enzima antioxidante tioredoxina reductasa, observada por parte de los complejos de Au(I) estudiados (a excepción del derivado con 2-mercaptobenzimidazol).
9. En un intento por confirmar los resultados en un modelo más cercano al tumor real, se han realizado estudios de detección de fosfatidilserina en células obtenidas por cultivos primarios de tumores de colon de ratón. Los resultados obtenidos indican que todos los complejos de Au(I) testados, inducen la muerte celular programa por esta vía de señalización. La discrepancia observada con los estudios *in vitro*, se explican a que en efecto son estudios distintos, y sin lugar a dudas los cultivos primarios son un modelo más realista al cáncer de colon *in vivo*. Estos resultados refuerzan las buenas propiedades de estos derivados como alternativa a la quimioterapia actual.