



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS**

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA INORGÁNICA

**Complejos *trans* de Pt(II) con aminas y
trifenilfosfina como fármacos antitumorales**

TESIS DOCTORAL

Francisco J. Ramos Lima

Madrid 2006

*A mis padres,
que siempre me han ayudado
por mucho que tropezara.*

Agradecimientos

Es difícil expresar mi agradecimiento a todas las personas que me han ayudado a lo largo de mi tesis doctoral, pero voy a intentarlo...

En primer lugar, quisiera agradecer a mis directoras de tesis, la Profesora Carmen Navarro-Ranninger y la Dra. Adoración Gómez Quiroga, por la dirección de este trabajo y su ayuda. Especialmente a Carmen por haberme escuchado cuando lo necesitaba y por darme la oportunidad de realizar uno de mis sueños, la investigación. Gracias Carmen, espero no haber defraudado tus expectativas.

Debo de agradecer a Ana, David y Raúl, de Resonancia Magnética Nuclear, a Cesar, Beatriz y Manu, de Difracción de R-X, por su gran ayuda y por haber sido tan majos conmigo. En general al equipo del SIDI, gracias.

A todo el grupo de Terapias Experimentales del CNIO, que se portó conmigo, durante el tiempo que estuve allí, como si fuera uno más de la familia. Especialmente a Fernando, Vicky, Bea, Oli y, como no, a Amancio Carnero, que me han enseñado muchísimo y estuvieron ahí en todo momento para lo que necesitara. Sois los mejores!

A toda la gente del día a día en la Facultad: Fernando, Alberto, Belén, Carmina y Maria Helena. A mis compañeros de penas y alegrías: Ana, Elena, Amparo y las que ya no están, Anita y Eva. A todo el Departamento de Química Inorgánica, incluidos los machotes de la segunda y mi queridísima Nani, por haberme mostrado un gran afecto y compartir conmigo las risas. A todos mil gracias por haberme ayudado tanto.

Po stráveném roce v České republice nemohu ani nechci zapomenout na všechny kamarády a kamarádky, které tam žijí. Srdečně bych chtěl poděkovat celému výzkumnému týmu Profesora Viktora Brabce, za pomocnou ruku a za vše co mě naučili. Mezi nimi hlavně Victoria Marini, se kterou jsem si velice dobře rozuměl. Nikdy nezapomenu na větu "experiment, který se nedělá třikrát, není experiment". Řekl mi to Olda Vrána, můj vynikající vedoucí a kamarád. Tisíce díky a kéž by mě naučili v Madridu tolik, jak on mě naučil v Brně.

Nevím jak vyjádřit všechny své city, které chovám vůči svým kamarádům, lépe řečeno...mé rodině! Sebastián, Henry, Luis Carlos, Mynor, Luis, Harvey, Kendall a Dani, všem děkuji za to, že jste mě naučili jak si užívat života. Nikdy na vás nezapomenu. Jdeme na pivo...!!!

A mis dos grandes amigos de Grecia, Petros Xristofis y a Maria Fanouraki, gracias Malakitas!!

A mis amigos de toda la vida, a los que conozco desde los cinco añitos. Gracias por llevar tanto tiempo aguantándome, que sé que es difícil.

Muchas gracias a Pilar, Raúl, Mimí y Ángeles, a los que quiero como a mi familia y siempre me han demostrado su cariño y afecto. No puedo olvidarme de los que ya no están con nosotros, Ismael y Loló muchas gracias por haberme querido tanto, nunca os olvidaré.

A mi mejor amiga, que es también la chica que mas quiero en el mundo, con la única que quiero estar y la que me ha dado fuerzas día a día para continuar. Virginia, gracias por haber estado durante estos diez años a mi lado, no sería quien soy sin estar contigo. Te quiero niña mia!!.

Por ultimo, a mis abuelos y mi familia, a los que más quiero y que siempre han estado para lo bueno y para lo malo. Al enano de mi hermano por enseñarme a controlar mi genio. A mi madre y mi padre que siempre me han ayudado y sé que seguirán haciéndolo aunque les falle, como he hecho tantas veces. Os quiero familia!!

En general a todos... GRACIAS POR ESTAR AHÍ!!!

Índice

1. Introducción	5
1.1. El cáncer	7
1.2. Historia del cisplatino	9
<i>1.2.1. Descubrimiento de su actividad</i>	<i>9</i>
<i>1.2.2. Limitaciones del cisplatino</i>	<i>9</i>
1.3. Mecanismo del cisplatino	12
<i>1.3.1. Mecanismo de acción</i>	<i>12</i>
<i>1.3.2. Muerte celular</i>	<i>16</i>
<i>1.3.3. Ciclo celular</i>	<i>17</i>
<i>1.3.4. p53: La proteína supresora de tumores</i>	<i>19</i>
<i>1.3.5. Mecanismos de reparación</i>	<i>20</i>
1.4. Resistencia al cisplatino	21
1.5. Compuestos antitumorales de platino con geometría <i>trans</i>	23
1.6. Fosfinas como ligandos	29
1.7. Planteamiento y objetivos.	32
1.8. Bibliografía.	34
2. Experimental	41
2.1 SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN	43
2.1.1. Materiales utilizados	43
2.1.2. Métodos experimentales de estudio	43
<i>2.1.2.1. Análisis químico y puntos de fusión</i>	<i>43</i>
<i>2.1.2.2. Espectroscopía Infrarroja</i>	<i>43</i>
<i>2.1.2.3. Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear</i>	<i>44</i>

2.1.2.4. Difracción de Rayos-X	44
2.1.3. Síntesis de los complejos de partida	45
2.1.3.1. Síntesis de los compuestos <i>cis</i> de platino(II)	45
2.1.3.1.1. <i>cis</i> -[PtCl ₂ (isopropilamina) ₂]	45
2.1.3.1.2. <i>cis</i> -[PtCl ₂ (NH ₃) ₂]	46
2.1.3.1.3. <i>cis</i> -[PtCl ₂ (PPh ₃) ₂]	46
2.1.3.2. Síntesis del <i>trans</i> -[Pt ₂ Cl ₂ (μ-Cl) ₂ (PPh ₃) ₂]	47
2.1.4. Síntesis de los compuestos <i>trans</i> de platino(II)	48
2.1.4.1. Compuestos <i>trans</i> -[PtCl ₂ (amina)(PPh ₃)]	48
2.1.4.2. Compuestos <i>trans</i> -[PtCl ₂ (amina)(amina')]	50
2.1.5. Caracterización estructural	52
2.1.5.1. Espectros de Infrarrojo.	52
2.1.5.2. Resonancia Magnética Nuclear	55
2.1.5.2.1. Compuestos <i>cis</i> de partida	55
2.1.5.2.2. <i>trans</i> -[Pt ₂ Cl ₂ (μ-Cl) ₂ (PPh ₃) ₂]	56
2.1.5.2.3. Compuestos <i>trans</i> -[PtCl ₂ (amina)(PPh ₃)]	56
2.1.5.2.4. Compuestos <i>trans</i> -[PtCl ₂ (amina)(amina')]	58
2.1.5.3. Difracción de Rayos-X	60
2.2. ESTUDIOS BIOQUÍMICOS	76
2.2.1. Materiales utilizados	76
2.2.2. Métodos experimentales de estudio	77
2.2.2.1. Líneas celulares y evaluación de la citotoxicidad	77
2.2.2.2. Citometría de Flujo	88
2.2.2.3. Microscopía Confocal.	91
2.2.2.4. Interacción con DNA	93
2.2.2.4.1. Polarografía de Pulso diferencial: Cinética de unión al DNA	93
2.2.2.4.2. Secuenciación de aductos Pt-DNA	94
2.2.2.4.3. Fluorescencia del EtBr: Aductos Pt-DNA	97
2.2.2.4.4. Espectroscopía de Absorción Atómica: Monoaductos Pt-DNA	98
2.2.2.4.5. Electroforesis Desnaturalizante: Aductos Intercatenarios	100

2.2.2.4.6. <i>Dicroísmo Circular: Distorsión del DNA</i>	101
2.2.2.4.7. <i>Electroforesis en gel de agarosa: Desenrollamiento Inducido</i>	103
2.2.2.4.8. <i>Reacción de los complejos de Pt con GSH y MT-2</i>	105
2.3. BIBLIOGRAFÍA	108
3. Discusión	111
3.1. Síntesis y caracterización de los complejos <i>trans</i> de Pt(II)	113
3.1.1. <i>trans-[PtCl₂(amina)(PPh₃)]</i>	114
3.1.2. <i>trans-[PtCl₂(amina)(amina')]</i>	130
3.2. Citotoxicidad	137
3.2.1. <i>Datos de citotoxicidad de los complejos</i>	137
3.2.2. <i>Papel de p53 en la respuesta a la citotoxicidad</i>	144
3.3. Ciclo celular	146
3.4. Imágenes de microscopía confocal	149
3.5. Interacción con DNA	151
3.6. Bibliografía	156
4. Conclusiones	161

1. Introducción

1.1. El cáncer	7
1.2. Historia del cisplatino	9
<i>1.2.1. Descubrimiento de su actividad</i>	9
<i>1.2.2. Limitaciones del cisplatino</i>	9
1.3. Mecanismo del cisplatino	12
<i>1.3.1. Mecanismo de acción</i>	12
<i>1.3.2. Muerte celular</i>	16
<i>1.3.3. Ciclo celular</i>	17
<i>1.3.4. p53: La proteína supresora de tumores</i>	19
<i>1.3.5. Mecanismos de reparación</i>	20
1.4. Resistencia al cisplatino	21
1.5. Compuestos antitumorales de platino con geometría <i>trans</i>	23
1.6. Fosfinas como ligandos	29
1.7. Planteamiento y Objetivos	32
1.8. Bibliografía	34

1.1. El cáncer

La palabra cáncer proviene del término griego *karkinoma* dado por Hipócrates en el siglo IV a.C., y del equivalente latino *cancer*, por analogía con el crecimiento radial infiltrante de algunos tumores de mama, a modo del cuerpo de un cangrejo.

El cáncer es un grupo de más de cien enfermedades distintas con más de mil variedades histopatológicas que comparten, como característica común, el crecimiento excesivo y descontrolado de células que invaden y dañan tejidos y órganos, provocando finalmente la muerte del individuo.¹

Este grupo de enfermedades tiene un origen multigénico y multifactorial distinto, pero con un mismo punto de partida, mutaciones en el DNA que producen que las células cancerígenas no respondan a señales de control, e interacciones que ocurren en tejidos normales.²

Estas mutaciones pueden aparecer en tres tipos de genes: los proto-oncogenes, los genes supresores de tumores y los genes de reparación del DNA.

Los proto-oncogenes son genes normales, con funciones importantes en la señalización celular a diferentes niveles (figura 1.1), que al mutar originan proteínas con función alterada que estimulan el crecimiento o la invasividad celular. Estos genes mutados son los conocidos oncogenes.

Los genes supresores de tumores tienen como función controlar el ciclo de división celular, evitando el crecimiento excesivo y promoviendo el mantenimiento de las características que especifican la localización de las células en un lugar determinado. Las mutaciones en estos genes producen proteínas no funcionales o falta de su expresión, induciendo la aparición de cáncer.

Los genes de reparación del DNA son los responsables de subsanar los errores producidos en la replicación, y reparar alteraciones inducidas por agentes externos en la doble hélice. La mutación de estos genes conduce a la aparición de múltiples mutaciones en el genoma, que darán lugar a cáncer cuando estas mutaciones afecten a proto-oncogenes o genes supresores de tumores.¹

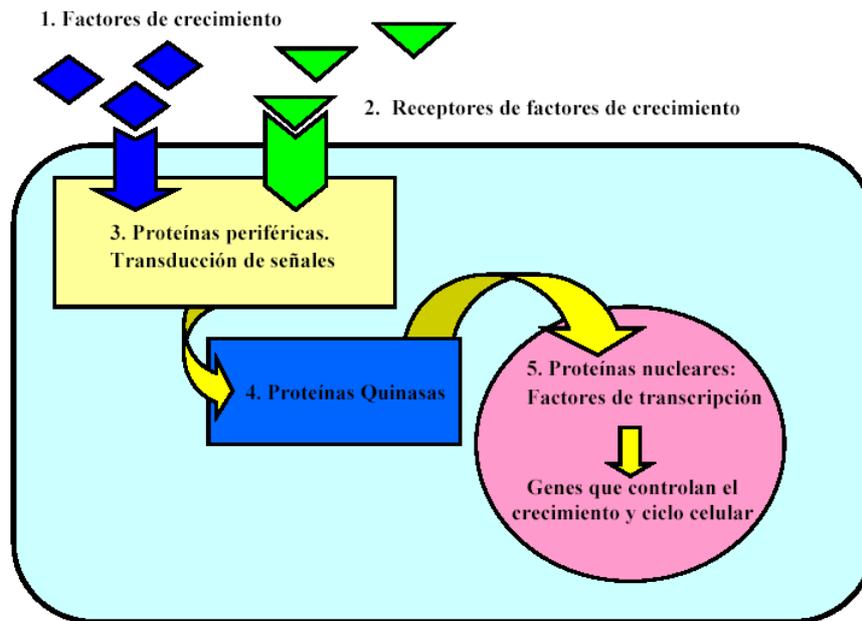


Figura 1.1: Niveles de actuación de los proto-oncogenes.

Las características morfológicas de las células tumorales incluyen un aumento de las células mitóticas, diferenciación celular incompleta y células con grandes núcleos y prominentes nucleolos. Algunas de las características bioquímicas de los tumores malignos son alteraciones en glicoproteínas y glicolípidos de la superficie celular, las cuales pueden ser reconocidas por el organismo como un agente extraño. Además, estas células secretan: factores de crecimiento (algunos de los cuales pueden producir estimulación autocrina), enzimas líticas (proteasas, colagenasas y glicosidasas), componentes de la matriz extracelular alterados (laminina, fibronectina) y receptores de éstos (integrinas). Las células cancerígenas tienen altos niveles de biosíntesis de ácidos nucleicos y de enzimas involucradas en estos procesos.³

Los principales tratamientos contra el cáncer se pueden dividir en cuatro grupos: cirugía, radioterapia, quimioterapia e inmunoterapia. Otros tratamientos del cáncer incluyen la inhibición de la angiogénesis y la terapia génica.⁴

El término quimioterapia fue definido por Ehrlich (Premio Nobel en Medicina 1908), como “*el uso de fármacos para hacer daño a un organismo invasor sin dañar al huésped*”.⁵

1.2. Historia del cisplatino

1.2.1. Descubrimiento de su actividad

El cisplatino, *cis*-diaminodichloroplatino(II) o *cis*-DDP, (figura 1.2) se conoce desde 1845,⁶ pero sus propiedades anticancerígenas no fueron descubiertas hasta 1964, cuando Barnett Rosenberg accidentalmente, mientras investigaba la influencia de un campo eléctrico generado por dos electrodos de platino en el crecimiento de bacterias *Escherichia coli*, observó la formación de grandes filamentos bacterianos, sin que se llegara a producir la división celular.⁷ Experimentos posteriores revelaron que el bloqueo de la replicación del DNA estaba relacionado con los productos formados por las reacciones electroquímicas de los electrodos de platino usados en el experimento.⁸ Los trabajos siguientes pusieron de manifiesto que de todos ellos sólo los productos de geometría *cis* y carga neutra eran activos; es decir, producían la filamentación e identificaron al *cis*-diaminodichloroplatino(II) como la especie responsable del efecto antiproliferativo.⁹

Estos resultados sugirieron que compuestos de platino con geometría *cis* podrían inhibir el crecimiento de las células tumorales sin producir una severa toxicidad para el huésped.¹⁰

En 1971 el cisplatino fue sometido a la primera prueba clínica y desde 1979 forma parte de la lista de fármacos aceptados por la FDA (Food and Drug Administration) para el tratamiento de varios tipos de cánceres humanos. El cisplatino es especialmente efectivo contra varios tipos de tumores sólidos, tales como el cáncer de testículo, ovario, cabeza y cuello, y pulmonar de célula pequeña. Así, el cáncer testicular, donde el cisplatino se utiliza en combinación con etopósido o bleomicina, tiene un porcentaje de cura entre el 80-99%.¹¹

1.2.2. Limitaciones del cisplatino

A pesar del notable éxito del cisplatino en el tratamiento del cáncer de testículo y ovario, existen significantes limitaciones de esta droga: (i) su escasa solubilidad, (ii) sus importantes efectos tóxicos que limitan la dosis a 100 mg/día (principalmente

nefrotoxicidad, náuseas y vómitos, ototoxicidad y neuropatía periférica), (iii) su inactividad frente a algunos de los más frecuentes tipos de tumores humanos (cáncer de colon, por ejemplo), y (iv) la incapacidad de la droga de producir remisiones de larga duración en una considerable proporción de tipos de tumores con respuesta al cisplatino (especialmente el cáncer de ovario) debido a la aparición de resistencia adquirida a esta droga.¹²

Estas limitaciones han llevado a la búsqueda de análogos estructurales que carezcan de esos efectos y mantengan la actividad terapéutica, dando lugar a complejos de segunda generación (figura 1.2); sin embargo, sólo unos pocos han conseguido llegar a estudios en fase clínica.^{13,14} El complejo diamino{1,1-ciclobutanodicarboxilato}platino(II), conocido como carboplatino, está siendo utilizado de forma rutinaria en clínica a nivel mundial. Actualmente han sido también aprobados para tratamiento antitumoral el nedaplatino en Japón y el oxaliplatino en EEUU y CEE.^{14,15}

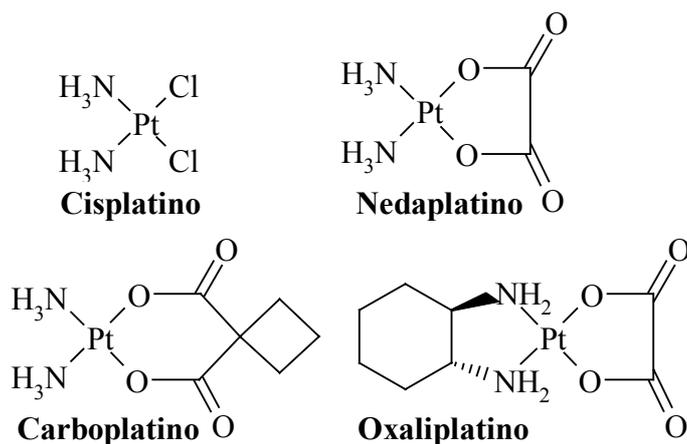


Figura 1.2: Complejos de platino con uso clínico.

En el carboplatino el átomo de platino forma parte de un anillo de 6 miembros, lo que conduce a una menor velocidad en la reacción de acuación necesaria para su activación. Esta diferencia en la activación conduce a diferencias en la toxicidad: el cisplatino es más reactivo y, por tanto, más tóxico que el carboplatino.¹⁶ Es decir, alteraciones en la estructura de los grupos salientes parecen influir en la distribución intracelular de los complejos de platino.

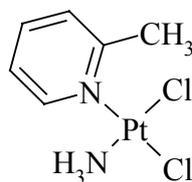
Actualmente no hay duda que los complejos de platino tienen como principal diana la molécula de DNA, aunque siguen existiendo un gran número de procesos que

todavía no se conocen con exactitud, como la inhibición de la síntesis de DNA, la supresión de la transcripción de RNA, efectos sobre el ciclo celular y la apoptosis.

En la interacción con el DNA los ligandos NH₃ determinan la estructura del aducto formado. Los aductos producidos por el cisplatino y el carboplatino son idénticos y mayoritariamente de tipo 1,2-GG intracatenario. Esto parece explicar sus muy similares patrones de sensibilidad antitumoral, con ligeras diferencias en la eficacia dependiendo del tipo de tumor.¹⁶

El oxaliplatino también produce el mismo tipo de interacción que el cisplatino, pero su mecanismo de acción y su patrón de resistencia es diferente. Se piensa que ciertas características especiales del ligando diaminociclohexano (DACH) influyen en la actividad de este compuesto frente a líneas resistentes al cisplatino aunque no se sabe a ciencia cierta su mecanismo de acción.¹⁷⁻²¹

El compuesto *cis*-aminodichloro(2-metilpiridina)platino(II), AMD473 (figura 1.3) fue diseñado con la idea de vencer la resistencia al cisplatino, producida por la detoxificación debido a la unión con glutatión (GSH) y otros tioles celulares, mediante el impedimento estérico provocado por la 2-metilpiridina a la vez que mantenía la capacidad de formar lesiones en el DNA.



***cis*-[PtCl₂(NH₃)(2-metilpiridina)]**

Figura 1.3: Complejo *cis*-aminodichloro(2-metilpiridina)platino(II), AMD473.

Este compuesto muestra una marcada actividad *in vitro* frente a tumores murinos y humanos, siendo de especial interés la baja resistencia en la línea celular A2780cisR (carcinoma de ovario humano), la cual presenta resistencia al cisplatino debido, entre otros, a los elevados niveles de glutatión.²²⁻²⁴ Debido a las prometedoras propiedades preclínicas que presentó este complejo, en 1997 comenzó la fase clínica I.²³

El cisplatino y las drogas de segunda generación son administradas de forma intravenosa. Los compuestos de Pt(IV) surgen como consecuencia de la búsqueda de

compuestos más solubles que se puedan administrar oralmente (figura 1.4), ya que la capacidad de administrar la droga oralmente daría mayor flexibilidad en la dosificación

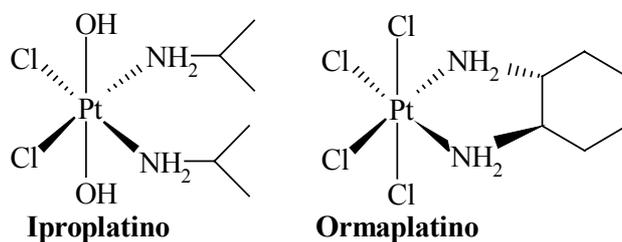


Figura 1.4: Ejemplo de complejos de Pt(IV).

Algunos compuestos de Pt(IV), como iproplatin y ormaplatin (también conocido como tetraplatin) entraron en ensayos clínicos; sin embargo, se abandonaron ya que se observó que causaban una severa neurotoxicidad en el caso del ormaplatin, y una falta de actividad en el caso del iproplatin.^{13,14}

1.3. Mecanismo del cisplatin

1.3.1. Mecanismo de acción

La actividad antitumoral de los complejos de platino está relacionada con su capacidad para formar aductos bifuncionales con el DNA (figura 1.5).^{16,25-27}

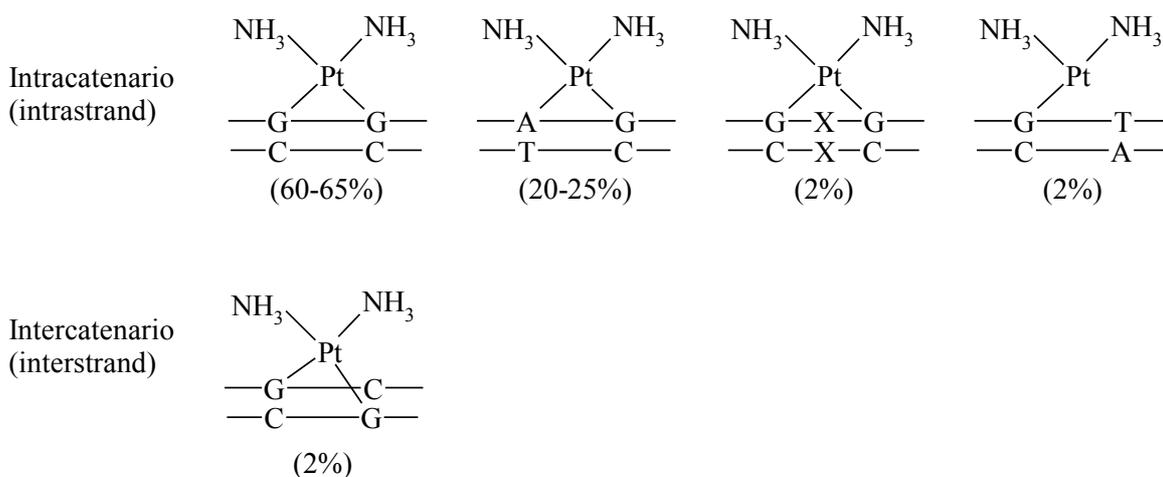


Figura 1.5: Tipos de aductos del cisplatin con el DNA. Imagen obtenida de Kelland, 2000.²⁸

La capacidad del cisplatino de enlazarse al DNA y distorsionar su estructura sugiere que podría interferir con el funcionamiento normal de esta importante biomolécula. La replicación y transcripción del DNA son esenciales para la división celular y la producción de proteínas. Cualquier alteración de estos procesos podría dar lugar a citotoxicidad. Por estas razones, los efectos de la platinación en las funciones del DNA han sido ampliamente investigados durante años, con la intención de entender mejor la actividad biológica de este fármaco.²⁹

Los aductos con el DNA del tipo 1,2-intracatenario parecen ser los responsables en mayor medida de la acción citotóxica del cisplatino, ya que estos representan entre el 80-90% de las lesiones totales.³⁰ Por razones geométricas, este tipo de aductos no pueden ser formados por el transplatino, lo cual podría explicar la ineficacia clínica de este isómero.

Los complejos de platino de uso clínico se administran por vía intravenosa. Una vez que el fármaco antitumoral se encuentra en la sangre, cierta cantidad será excretada a través de los riñones, provocando nefrotoxicidad, y otra parte llegará a la superficie de las células.

La alta concentración de cloruros en la sangre (≈ 100 mM) impide el intercambio de los grupos salientes de los complejos de platino por moléculas de agua. De este modo, el cisplatino llega a la superficie externa de las células como una molécula neutra.

Aunque todavía no se comprende del todo el mecanismo de entrada y salida del cisplatino en la célula, se piensa que el *cis*-DDP entra en la célula por difusión pasiva y en ocasiones por transporte activo gracias a la proteína transportadora de cobre CTR1.²⁵ En el citoplasma la baja concentración de cloruros (≈ 3 mM) permite la sustitución de los ligandos salientes mediante la reacción de acuación del cisplatino, formándose las especies activas. Posteriormente, mediante un proceso en dos etapas el complejo de platino se enlaza a su principal diana biológica produciendo los distintos aductos Pt-DNA (figura 1.6).^{28,31} Generalmente se acepta la idea de que estas lesiones son estables, aunque hay datos que apoyan la reorganización de los aductos.³²

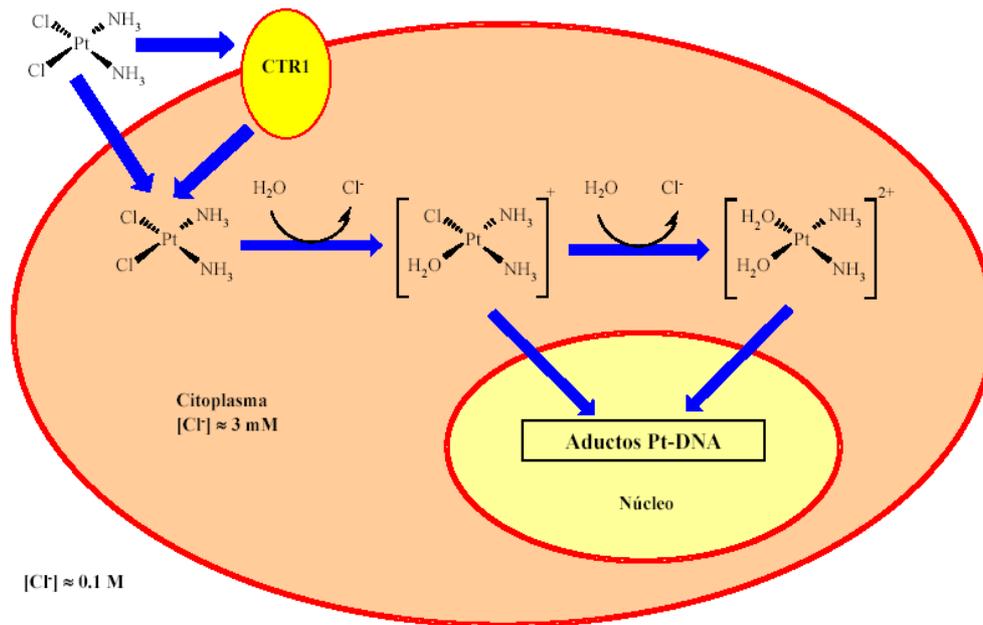


Figura 1.6: Entrada y equilibrios de aciación del cisplatino anteriores a su unión al DNA.

Las especies mono- y diacuo del cisplatino son más reactivas que la forma neutra. Este hecho hace que estas especies puedan reaccionar con muchos nucleófilos endógenos, tales como GSH, metalotioneína, metionina y proteínas. Al entrar el cisplatino en la célula se hace potencialmente más vulnerable a su inactivación citoplasmática por distintos componentes celulares.

El cisplatino, que consigue llegar a unirse de forma covalente con el DNA del núcleo, produce en un primer paso aductos monofuncionales con la posición N7 de las purinas, originando en un segundo paso lesiones bifuncionales, principalmente de tipo 1,2-intracatenarias.^{25,33,34}

La formación de aductos Pt-DNA producirá daños en la doble hélice, tales como inhibición de la replicación y transcripción. Sin embargo, aunque el cisplatino afecta a la replicación del DNA, no existe una correlación directa entre la citotoxicidad y la inhibición de la síntesis de DNA.³⁵

El daño producido en el DNA por el cisplatino activa varias rutas de señalización que contienen proteínas como ATR, p53, p73 y MAPK, culminando en muerte celular por activación del programa de apoptosis o en la reparación del DNA y, por tanto, en supervivencia celular (figura 1.7).³⁶

La activación del programa de apoptosis comienza por el reconocimiento del daño en el DNA. Este reconocimiento puede ser llevado a cabo por 20 proteínas candidatas, como por ejemplo hMSH2 o hMutS α , que forman parte del mecanismo de reparación MMR (MissMatch Repair); HMG1 y HMG2 (High Mobility Group) implicadas en la activación de p53; o hUBF (human Upstream Binding Factor) implicada en el inicio de la transcripción por la RNA polimerasa I.

Aunque las proteínas encargadas del reconocimiento del daño tienen como efecto más conocido la transducción de señales a otras proteínas, su relevancia biológica no está limitada únicamente a esta función. Un ejemplo es la proteína HMG1, la cual potencia la citotoxicidad debido a que actúa de escudo frente a la reparación del aducto.³⁷ Por otro lado, la proteína hUBF puede ser secuestrada por los aductos Pt-DNA impidiendo su participación en la transcripción.³⁸

Esto implica que las proteínas encargadas del reconocimiento del daño en el DNA podrían iniciar uno o más procesos aparentemente no relacionados entre sí, pero que culminarían en la activación de la apoptosis o la reparación del DNA. Esto está de acuerdo con el hecho de que el cisplatino produce detención de los procesos de replicación y transcripción, pero que ambos efectos no están necesariamente correlacionados de forma directa con la muerte celular.³⁸

Una de las rutas de señalización culmina en la activación de los puntos de control del ciclo celular con la parada total de dicho ciclo en la fase G₂/M, tras una detención transitoria de la fase S.³⁹ Esta parada del ciclo celular se realiza para intentar reparar el daño en el DNA mediante el mecanismo de reparación NER (Nucleotide Excision Repair). Si finalmente no se consigue reparar el daño la célula entrará en apoptosis.

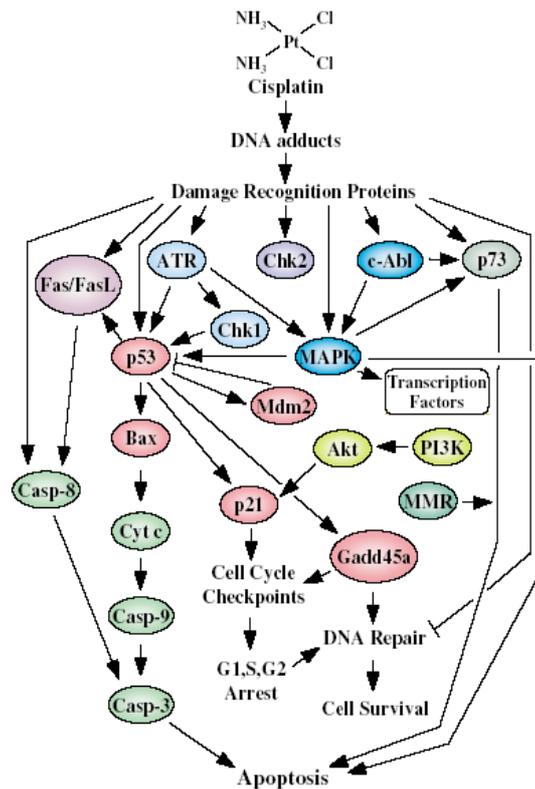


Figura 1.7: Esquema general de las vías de señalización inducidas por el cisplatino. Imagen obtenida de Siddik, 2003.³⁶

1.3.2. Muerte celular

El cisplatino induce dos tipos diferentes de muerte celular, necrosis y apoptosis, dependiendo de la cantidad de daño producido en el DNA, lo cual está lógicamente relacionado con la cantidad de *cis*-DDP a la que se expone la célula.^{25,40,41}

- a) La necrosis se caracteriza por un crecimiento del citoplasma que produce una rápida pérdida de la integridad de la membrana, llegando a producir finalmente la lisis de la célula como consecuencia de un cambio en el balance osmótico (figura 1.8). Este tipo de muerte celular se produce a concentraciones elevadas de cisplatino.⁴²
- b) La apoptosis, o muerte celular programada, se caracteriza por la reducción del volumen celular, condensación de la cromatina y formación de cuerpos apoptóticos con la activación de una endonucleasa endógena, reconocida por células fagocíticas (figura 1.8).⁴³ La apoptosis se produce tras una exposición a baja concentración de *cis*-DDP durante varios días.⁴⁴

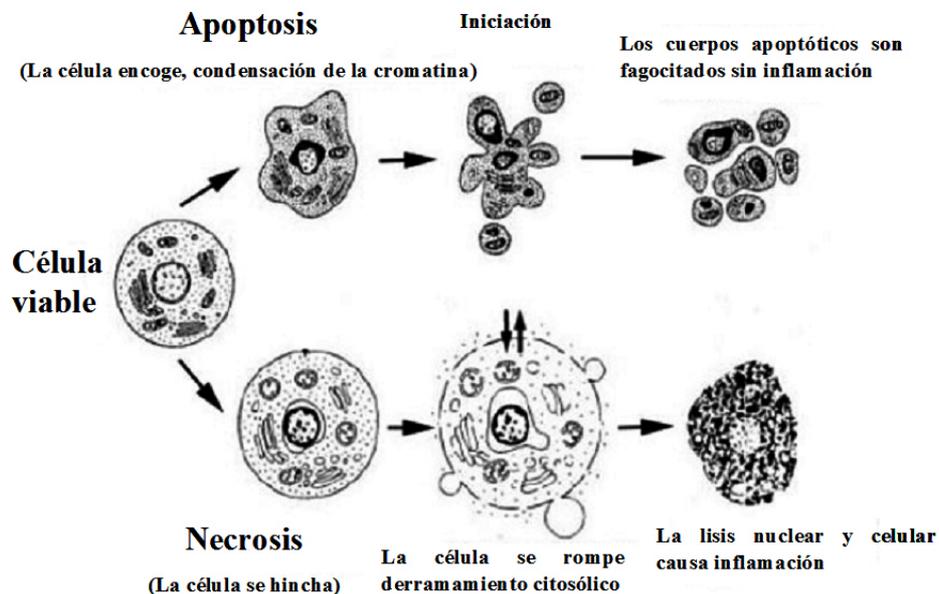


Figura 1.8: Representación esquemática de los procesos apoptótico y necrótico.

A nivel molecular, la apoptosis resulta de la activación de la familia de proteasas específicas de aspartato denominadas caspasas (CASP). CASP8 y CASP9 son activadas en un proceso de apoptosis temprana produciendo la posterior activación de otras caspasas, como la CASP3, además de liberar el citocromo c.⁴⁵

1.3.3. Ciclo celular

El ciclo celular comprende el conjunto de procesos por los que una célula da lugar a dos células hijas, y abarca el periodo entre dos divisiones mitóticas. Consta de cuatro fases: G_1 (estado de la célula previo a la replicación del DNA), S (tiempo durante el cual se produce la replicación del DNA), G_2 (periodo comprendido entre la replicación y la división celular) y M (mitosis de la célula para dar las dos células hijas). Hay células que pueden parar su progresión hacia la división en la fase G_1 y permanecer así, en estado de reposo, durante mucho tiempo. Este estado de reposo es lo que se denomina fase G_0 .¹

El ciclo celular tiene gran importancia en el control del crecimiento y la proliferación celular. La acumulación de alteraciones genéticas puede producir la desregulación del ciclo. La pérdida del control del ciclo celular puede dar lugar a células tumorales.⁴⁶

El control del ciclo celular se produce mediante mecanismos que aseguran la correcta transición y realización de las fases del ciclo celular. Estos mecanismos son los que se conocen como puntos de control o checkpoints (figura 1.9). Estos mecanismos pueden ser reversibles (fosforilación/ desfosforilación) o irreversibles (proteolisis).

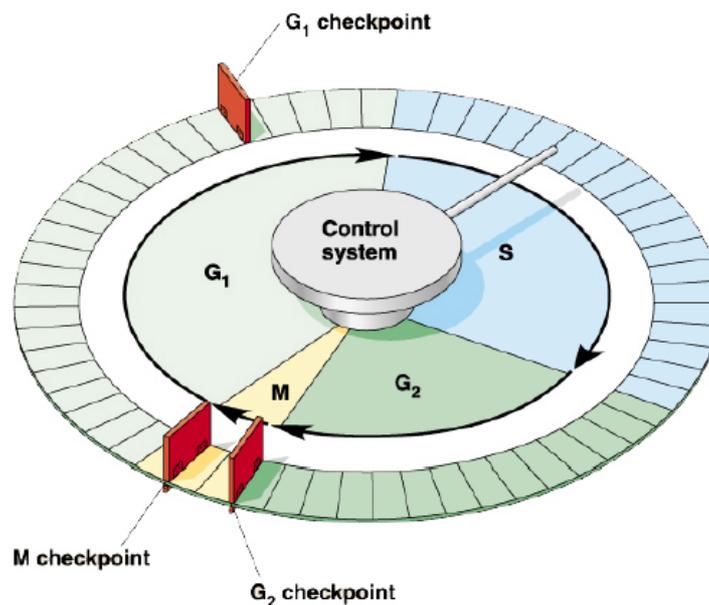


Figura 1.9: Esquema del ciclo celular y sus puntos de control.

Como se ha mencionado anteriormente, una de las vías de señalización del daño producido en el DNA por el cisplatino, culmina en la activación de los puntos de control del ciclo celular.

Los controladores bioquímicos de estos puntos de chequeo en el ciclo celular son las CDKs (Cyclin Dependent Kinase), las cuales son activadas por la unión a diferentes ciclinas. Los complejos CDK-ciclina son regulados por las proteínas CDIs que inhiben directamente la actividad quinasa de estos complejos (figura 1.10).⁴⁶ Gracias a los diferentes niveles de estos controladores bioquímicos, la célula puede detener su ciclo celular en los puntos de control de forma temporal para permitir, entre otras cosas, la activación del programa de apoptosis frente a daños en el DNA que no pueden ser reparados.⁴⁷

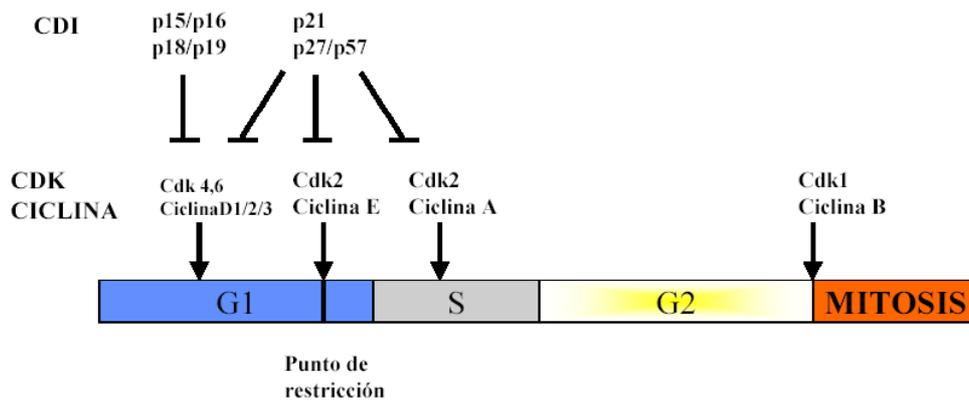


Figura 1.10: Complejos Cdk-ciclina, sus inhibidores CDI y nivel de actuación en el ciclo celular.

Una de las vías de señalización que produce el cisplatino culmina en la activación de uno de estos puntos de control, el cual induce una parada transitoria en la fase S, seguida de la inhibición de Cdk2-ciclina A, que producirá una parada más larga en G₂/M. No es frecuente la observación de muchas células en la fase G₀/G₁ tras un tratamiento con cisplatino debido en gran parte a que éstas quedan atrapadas en G₂/M.³⁶

Es generalmente aceptado que la parada del ciclo celular, como consecuencia del daño en el DNA, es necesaria para eliminar los aductos Pt-DNA mediante el mecanismo NER. Solamente si el daño es importante, la célula activa la apoptosis. Estos procesos de reparación, activación de los puntos de control y la apoptosis están colectivamente asociados a la proteína p53.⁴⁸

1.3.4. p53: La proteína supresora de tumores

La proteína p53 es así denominada porque codifica una proteína fosforilada con un peso de 53 kDa y está formada por cuatro subunidades idénticas alrededor de un átomo de Zn. Como se mencionó anteriormente, la parada del ciclo celular, la reparación y la apoptosis, están colectivamente asociadas con la proteína supresora de tumores p53.⁴⁹

p53 es activada en respuesta a varios tipos de señales de estrés celular para inhibir el crecimiento de las células. Las respuestas que produce p53 incluyen parada del ciclo celular, senescencia y apoptosis. Dependiendo de las circunstancias, también contribuye a reparar el daño sobre el DNA para rehabilitar a la célula y que continúe con su ciclo normal.⁵⁰ Sin embargo, en la mayoría de los casos la inducción de p53 conduce a una inhibición irreversible del ciclo celular por la activación de la apoptosis.

Un ejemplo de proteínas cuya transcripción es estimulada por p53 es la proteína p21^{CIP}, un inhibidor de CDKs (CDI), que se une a todos los complejos Cdk-ciclina de mamíferos. Como consecuencia, las células se detienen en G₀/G₁ (y G₂/M) hasta que el daño del DNA es reparado y las concentraciones de p53 y p21^{CIP} disminuyen. Si el daño en el DNA es extenso, p53 activa la expresión de genes que conducen a apoptosis.

Las células con pérdida en la función de p53 son deficientes en la reparación del DNA mediante los mecanismos NER y BER (Base Excision Repair).⁵¹⁻⁵³ Además, estas células sufren una pérdida en la ruta de señalización de daño en el DNA a través de dicha proteína.²⁵ Esto implica que las células con mutaciones en p53 no retrasan su entrada en S desde G₀/G₁ tras un daño leve del DNA, y no entran en apoptosis tras una lesión más extensa del DNA mediante la cascada de señales que desencadenaría p53.

El análisis de muchos tipos de tumores ha demostrado que en más de la mitad de ellos p53 se encuentra mutada con la pérdida de su actividad, o incluso con la adquisición de nuevas funciones que contribuyen al desarrollo del tumor.⁵⁰ El 95% de las mutaciones sufridas en la proteína p53 se producen en la región central, en la secuencia específica de unión al DNA. De hecho, la mayoría de las mutaciones en esta

zona afecta únicamente a seis aminoácidos (figura 1.11). Por otro lado, el 80% de los tumores resistentes al cisplatino presentan mutado el gen que codifica para p53.¹⁹

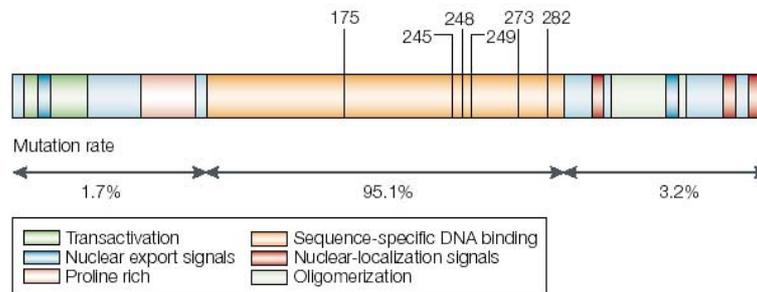


Figura 1.11: Estructura de p53 y mutaciones asociadas a tumores. Imagen obtenida de Vousden *et al.*, 2002.⁵⁰

1.3.5. Mecanismos de reparación

La formación y persistencia de los aductos Pt-DNA es necesaria para llegar a inducir apoptosis. Como otros muchos mecanismos celulares, los mecanismos de reparación no están en todas las líneas celulares resistentes al *cis*-DDP. Se ha demostrado que células deficientes en mecanismos de reparación son más sensibles al cisplatino que aquellas en las que este mecanismo es eficiente. La inactividad del transplatino se sabe que, entre otras causas, es debida a la rápida reparación de sus aductos con el DNA.

En células eucariotas, existen tres mecanismos de reparación del DNA dañado, aunque no todos tienen la misma importancia en la reparación o señalización del daño producido por los aductos Pt-DNA.

- a) Mecanismo BER (Base Excision Repair): La reparación se produce mediante la ruptura del enlace N-glicosídico entre la ribosa y la base dañada. La actividad de este mecanismo está asociada a los puntos de control de las fases G₀/G₁ y G₂/M a través de la proteína p53.⁵³⁻⁵⁵ Además, dependiendo de la cantidad de daño producido sobre el DNA, la proteína p53 activa este mecanismo u otras vías de señalización.⁵⁶

- b) Mecanismo MMR (MissMatch Repair): La reparación se produce por la sustitución de un fragmento de DNA. La actividad de este mecanismo está asociada a la fase S del ciclo celular, ya que repara las bases mal apareadas entre cadenas complementarias. El sistema de reparación MMR detecta los aductos Pt-DNA, a través de las proteínas hMSH2 o hMutS α , pero no puede eliminarlos. Al no poder reparar el daño, producido por el *cis*-DDP, activa las señales de apoptosis.³⁶ Por tanto, la pérdida de MMR puede hacer a las células más resistentes al cisplatino debido a la pérdida de la vía de señalización de la apoptosis.^{33,57,58}
- c) Mecanismo NER (Nucleotide Excision Repair): La reparación se produce por hidrólisis de los enlaces fosfodiéster a ambos lados de la lesión. Se elimina un fragmento de oligonucleótido y se sintetiza nuevo DNA para rellenar el hueco resultante.⁵⁹ Es el mecanismo más importante en la eliminación de aductos de platino y la posterior reparación del DNA, por lo que es uno de los factores implicados en la resistencia al cisplatino.^{36,57}

1.4. Resistencia al cisplatino

Una de las razones que limitan el uso clínico del cisplatino es la resistencia que determinados tumores presentan a esta droga. La resistencia al cisplatino puede ser intrínseca de las células o adquirida como consecuencia de una prolongada exposición al compuesto. Algunos tipos de cáncer presentan resistencia inherente al cisplatino y no responden al tratamiento; otros, como el de ovario, pueden responder inicialmente al tratamiento del cisplatino, pero con el tiempo pueden adquirir resistencia a la droga. Debido a su importancia clínica, el mecanismo de resistencia al cisplatino ha sido objeto de numerosos estudios.^{57,60}

A grandes rasgos, los mecanismos de resistencia surgen como consecuencia de cambios intracelulares que impiden la unión del cisplatino al DNA, que interfieren en la señalización del daño para la activación de la apoptosis, o ambos. La resistencia al cisplatino es un fenómeno multifactorial donde varios mecanismos de resistencia se encuentran al mismo tiempo dentro de la célula tumoral.^{57,61}

Las líneas celulares exhiben diferentes mecanismos que pueden justificar la resistencia adquirida al cisplatino. Estos mecanismos incluyen:

- a) Disminución de la acumulación de platino: Este efecto está normalmente asociado a una disminución de la entrada de Pt en la célula y a un aumento de la salida. Aunque los mecanismos exactos por los que ocurre este tipo de resistencia son bastante desconocidos, se piensa que están relacionados, en el caso de disminución de entrada de platino en la célula, con algunos cambios en el proceso de difusión pasiva y la presencia de algunos transportadores como CTR1 o canales iónicos en la membrana, y en el aumento en la salida de platino de la célula, por la actuación de algunas proteínas exportadoras como cMOAT.^{25,36,62}
- b) Niveles elevados de moléculas que contienen grupos tioles, como GSH o metalotioneína: Una vez que dentro de la célula tienen lugar las reacciones de aciación del cisplatino, éste puede interactuar con multitud de componentes citoplasmáticos antes de alcanzar su diana farmacológica. Se acepta que la reacción entre el GSH y el cisplatino es un factor importante de resistencia. Además, niveles elevados de GSH aumentan la reparación del DNA y producen un efecto inhibitorio sobre la apoptosis debido, entre otras, a un alto nivel de la proteína anti-apoptótica Bcl2.^{36,63}
- c) Aumento de la capacidad de reparación para eliminar las lesiones Pt-DNA: El mecanismo de reparación NER es el más frecuente a la hora de eliminar los aductos Pt-DNA, mientras que el mecanismo MMR, al intentar reparar la lesión y no ser capaz, activa la señalización de apoptosis.⁶⁴
- d) Mutaciones en la proteína p53: El daño producido por el cisplatino necesita la presencia de la proteína p53 para la activación del programa de apoptosis. La mutación, y por lo tanto inactivación, de dicha proteína produce resistencia al cisplatino debido a que no pueden ser activadas las diferentes rutas de señalización dependientes de p53.³⁶
- e) Inhibidores de la apoptosis: Algunos inhibidores apoptóticos, como XIAP (proteína que facilita la inhibición de la señalización de apoptosis producida por

las caspasas), al encontrarse sobre expresados aumentan la resistencia al cisplatino debido a que imposibilitan la función de las caspasas, independientemente del daño sobre el DNA.³⁶

1.5. Compuestos antitumorales de platino con geometría *trans*

El transplatino, estereoisómero del cisplatino, muestra un efecto citotóxico *in vitro* frente a células cancerígenas mucho menor que el cisplatino y no muestra actividad anticancerígena *in vivo*; es decir, cuando se administra a animales portadores de tumores, a las máximas dosis permitidas, sólo se observan efectos tóxicos y no antitumorales.

Este hecho se ha justificado por los diferentes tipos de aductos que forma este isómero con el DNA, ya que es incapaz de formar aductos 1,2-intracatenarios entre purinas adyacentes, que son las lesiones más importantes que produce el cisplatino.^{65,66} Además, otra explicación de la inactividad del transplatino es su alta reactividad química, que podría hacer al complejo susceptible de desactivación antes de su llegada al DNA.²⁹

En los años 70, Cleare tras una serie de experimentos con complejos de Pt y Pd postuló una serie de reglas referentes a la relación estructura-actividad: (i) los complejos con geometría *trans* son inactivos, (ii) como mínimo son necesarios un par de grupos salientes en geometría *cis*, (iii) los complejos no deben de tener carga, (iv) los grupos salientes deben tener suficiente fortaleza de enlace para disminuir efectos de toxicidad, y (v) los complejos con aminas primarias son más activos que con aminas secundarias y éstos más que con aminas terciarias.⁶⁷⁻⁶⁹

Sin embargo, en 1992 fueron publicados complejos de geometría *trans* de fórmula general *trans*-[PtCl₂(L)(L')], L = L' piridina, *N*-metilimidazol o tiazol; L = quinolina y L' = NH₃ o RR'SO, R = metil y R' = metil o fenilbencil, que presentaban actividad citotóxica (figura 1.12).^{70,71} Estos compuestos presentaron una citotoxicidad *in vitro* mayor que la de los correspondientes isómeros *cis* y, lo que es más importante, algunos de estos compuestos presentaban actividad en líneas celulares resistentes al cisplatino.⁷¹

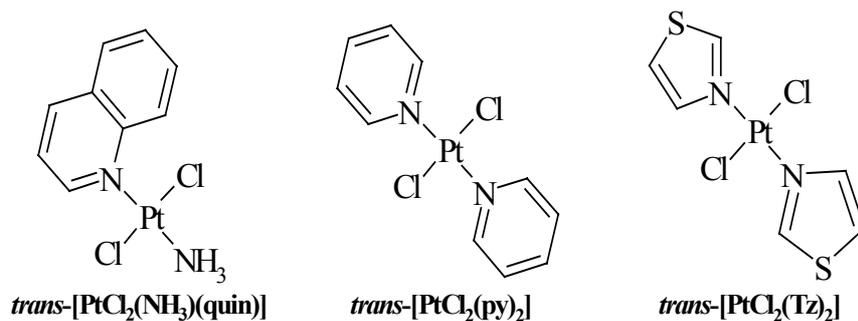


Figura 1.12: Ejemplo de primeros complejos de geometría *trans* con actividad citotóxica.

En 1993, se publicó el compuesto $trans\text{-[PtCl}_2\text{(E-iminoéter)}_2\text{]}$, el cual no sólo era más citotóxico que el correspondiente isómero *cis*, sino que por primera vez un compuesto *trans* presentaba actividad antitumoral *in vivo* (figura 1.13).⁷²⁻⁷⁴

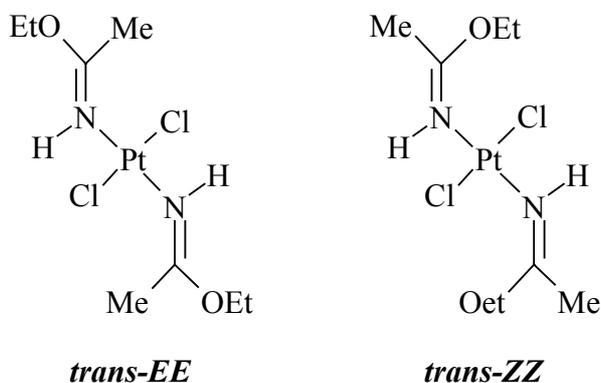


Figura 1.13: Ejemplos de complejos $trans\text{-[PtCl}_2\text{(iminoéter)}_2\text{]}$.

Los estudios realizados para evaluar la actividad antitumoral de estos compuestos, indican que la configuración del ligando iminoéter juega un papel importante.^{75,76} Estudios recientes han mostrado que la configuración del ligando, isómeros *E* o *Z*, modulan la actividad citotóxica tanto en complejos *cis* como *trans*.⁷⁷

Estudios bioquímicos y biofísicos de la interacción con el DNA y el complejo *trans-EE* (figura 1.13) apoyan que la unión a la doble hélice es de un modo diferente a la del transplatino y el cisplatino, formando preferentemente aductos monofuncionales cinéticamente estables.⁷⁸ Dado que el DNA es la principal diana farmacológica de los complejos de Pt(II), se postula que el diferente modo de unión con respecto al transplatino y cisplatino, es el factor responsable de la actividad biológica. El diferente modo de unión podría activar rutas de señalización que no consigue activar el transplatino.

Los complejos polinucleares de Pt(II) con ligandos diamina son otro claro ejemplo de complejos que rompen las reglas estructura-actividad. Estos complejos polinucleares, como por ejemplo el BBR3464 (figura 1.14), han mostrado muy buena actividad biológica. Además, complejos como el 1,1/c,c y 1,1/t,t (figura 1.14) presentan una citotoxicidad interesante puesto que, y al contrario de lo que ocurría con las especies mononucleares donde un isómero presentaba actividad antitumoral y el otro no, ambos isómeros dinucleares son activos, diferenciándose por su actividad en células resistentes al cisplatino. Además, presentan interacciones con el DNA diferentes a las conocidas hasta el momento.^{26,79,80}

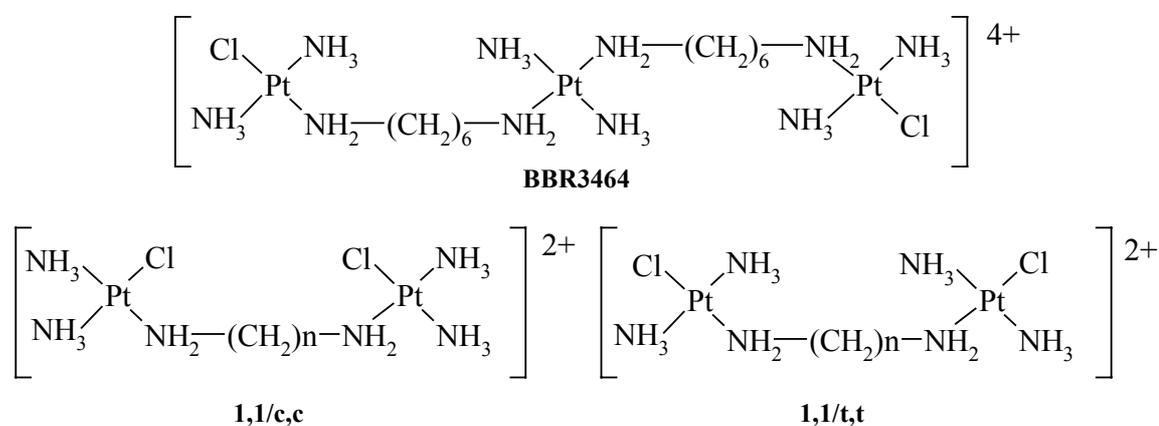


Figura 1.14: Estructura de complejos di y trinucleares de Pt.

Complejos como los isómeros *cis* y *trans* JM118 y JM334 (figura 1.15), los cuales presentan como ligandos la ciclohexilamina y el NH₃, son otro ejemplo de complejos de Pt(II) donde el isómero *trans* presenta mayor actividad citotóxica que el isómero *cis*.⁸¹

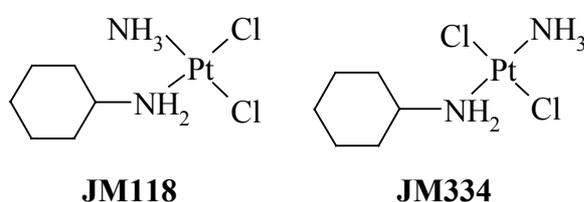


Figura 1.15: Complejos con el ligando ciclohexilamina.

En 1999, nuestro grupo de investigación mostró por primera vez que compuestos de Pt con distintas aminas alifáticas en *trans* presentaban una actividad citotóxica muy superior a la del transplatino.⁸²⁻⁸⁶

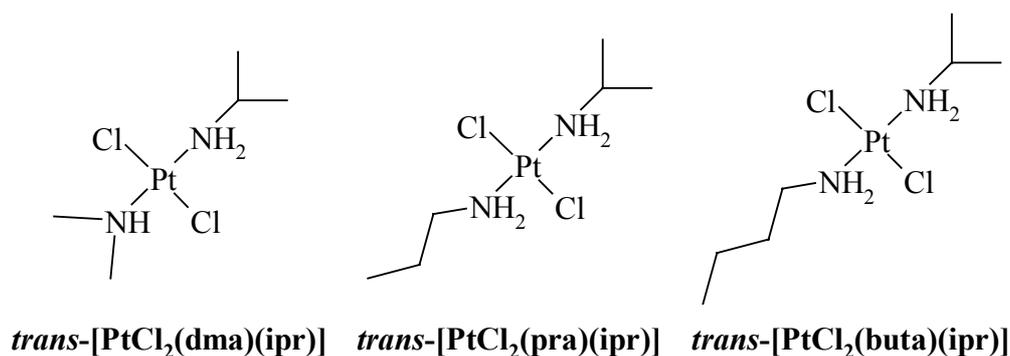


Figura 1.16: Ejemplos de complejos *trans* de Pt(II) con aminas alifáticas.

Complejos como los mostrados en la figura 1.16 presentaron una elevada actividad citotóxica en líneas celulares resistentes al *cis*-DDP que sobreexpresan el oncogen *ras*, observándose que su actividad citotóxica estaba relacionada con la capacidad para inducir apoptosis.^{82,83} Además, el complejo *trans*-[PtCl₂(dimetilamina)(isopropilamina)] presentó actividad antitumoral *in vivo* y una disposición a formar enlaces intercatenarios, que podría estar relacionada con la inducción de apoptosis por parte de este complejo.^{40,85}

Otros complejos de esta serie son el *trans*-[PtCl₂(NH₃)(1-metilpropilamina)] y *trans*-[PtCl₂(NH₃)(2-metilbutilamina)] (figura 1.17), los cuales presentan un carbono quiral en el ligando amina. Estos complejos son más potentes que el cisplatino en los pares de líneas celulares CH1/CH1cisR y A2780/A2780cisR. Además, estos complejos producen aductos Pt-DNA por los que las proteínas HMG1 presentan baja afinidad.⁸⁷

Estudios de hidrólisis han revelado que estos complejos de platino sufren fácilmente reacciones redox en disolución acuosa, que podrían estar implicadas en su mecanismo de acción biológica.⁸⁸

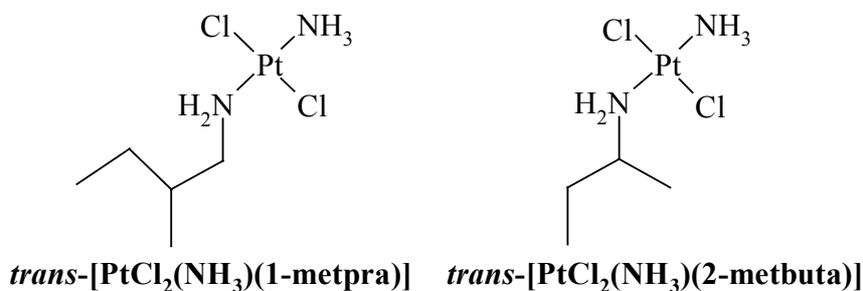


Figura 1.17: Estructura de los complejos *trans*-[PtCl₂(NH₃)(1-metilpropilamina)] y *trans*-[PtCl₂(NH₃)(2-metilbutilamina)].

Como consecuencia de lo indicado anteriormente, se acepta que los complejos de geometría *trans* pueden producir distintos tipos de aductos Pt-DNA que dan lugar a distintas distorsiones en la doble hélice, y con ello diferentes reconocimientos intracelulares con diferentes efectos citotóxicos.^{89,90}

En los últimos años se ha precipitado la búsqueda de nuevos complejos de geometría *trans*, donde se busca principalmente superar la resistencia al cisplatino, burlar la reparación del DNA y activar vías de señalización de la apoptosis.⁸⁹

Los ligandos 4-picolina, piperazina y piperidina, se pueden encontrar en complejos de Pt(II) en diferentes combinaciones que violan algunas de las reglas estructura-actividad mencionadas anteriormente (figura 1.18).⁹¹⁻⁹⁴ Estos compuestos y los complejos polinucleares mencionados anteriormente (figura 1.14) han puesto de manifiesto que es posible encontrar complejos activos cargados positivamente.

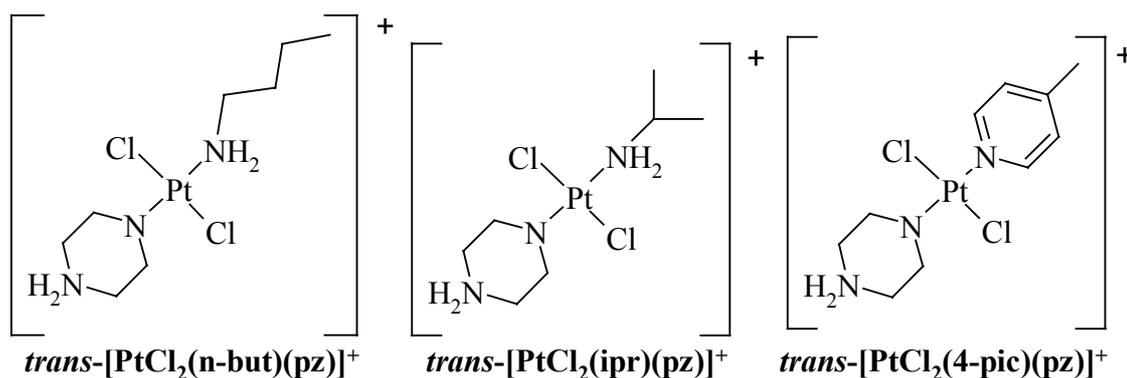


Figura 1.18: Ejemplos de diferentes ligandos en complejos de Pt(II) con actividad citotóxica.

El ligando piperazina: (i) presenta carga en el grupo NH_2 del anillo, aumentando así el carácter hidrofílico del complejo; (ii) es un ligando heterocíclico no plano, que puede flexionarse permitiendo mayor número de interacciones con el DNA; (iii) tiene un volumen estérico suficiente como para influir sobre la cinética y la citotoxicidad.

Otros ejemplos encontrados en la bibliografía son los complejos polinucleares que presentan el ligando intercalante N,N'-bis(aminoalquil)-1,4-diaminoantraquinona, y un solo grupo saliente por átomo de platino (figura 1.19). Estos complejos polinucleares han mostrado, también, muy buena actividad citotóxica y propiedades muy interesantes

como por ejemplo, una diferente distribución en el interior de células resistentes y no resistentes al cisplatino.^{95,96}

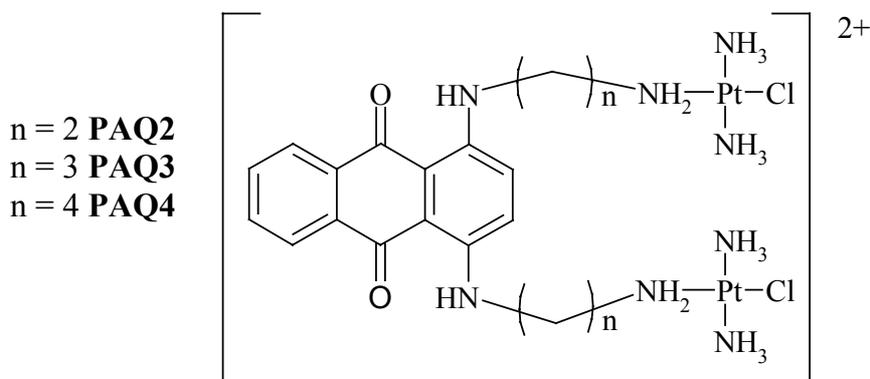


Figura 1.19: Ejemplos de diferentes complejos de Pt(II) polinucleares con actividad citotóxica.

En los últimos años existe una tendencia al uso, en complejos de platino, de ligandos con algún tipo de impedimento estérico que pueda influir en la cinética de la reacción de aciación o en la interacción con el DNA. Complejos con aminas planares que presentan grupos hidroxilo; poliaminas que pueden quelar al átomo de platino como la 1,3-propanodiamina, 1,4-butanodiamina o la espermidina, usada anteriormente en nuestro grupo de investigación;⁹⁷⁻⁹⁹ incluso ligandos iminoéter cíclicos, son ejemplos de nuevos complejos con ligandos con nitrógeno como átomo dador, que presentan actividad citotóxica (figura 1.20).^{77,100-102}

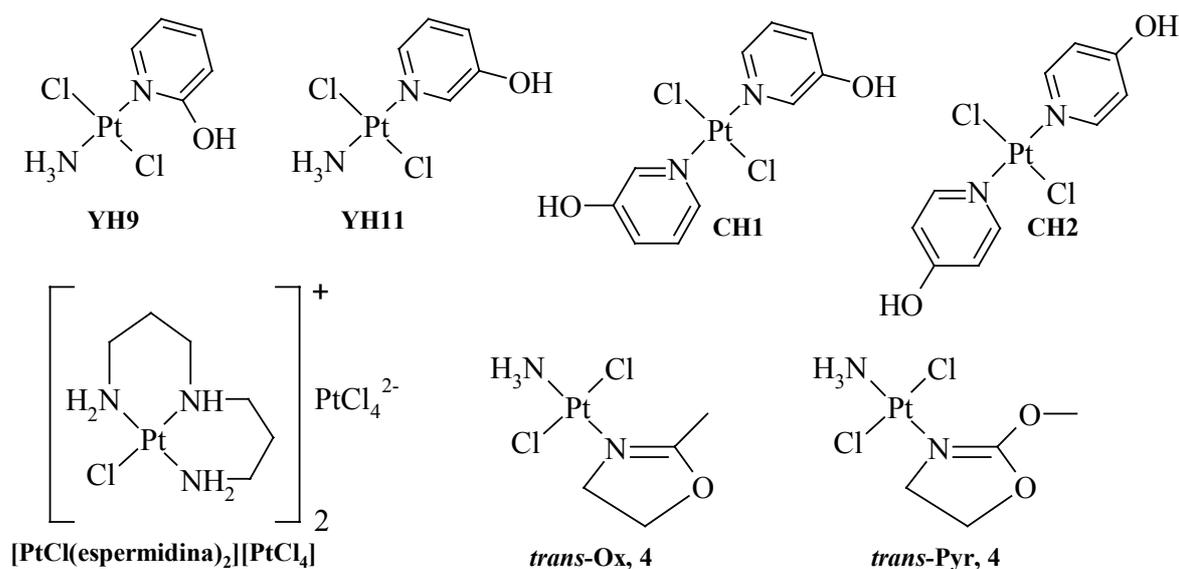


Figura 1.20: Ejemplos de nuevos de complejos de Pt(II) con actividad citotóxica.

Como se ha mostrado anteriormente y basándose en lo que se conoce hasta el momento, la mayoría de los ligandos amina que se buscan actualmente presentan grupos aromáticos, sustituyentes con átomos de oxígeno, aminas cíclicas o aminas alifáticas. Esto es debido a que se piensa que para producir efectos citotóxicos es necesario disminuir la reactividad que presenta la geometría *trans*. Al introducir impedimentos estéricos se podría disminuir la velocidad de acución con respecto al transplatino y, por lo tanto, la rápida desactivación de los complejos *trans* por moléculas endógenas de la célula, como la GSH. Además, estos impedimentos estéricos pueden modificar la forma de unión al DNA, produciendo distintos tipos de aductos Pt-DNA. La presencia de otros grupos en el ligando, como el hidroxilo, pueden favorecer el carácter hidrofílico de la molécula sin necesidad de cargar positivamente el complejo, y la formación de enlaces de hidrógeno que ayuden en la interacción con la doble hélice.¹⁰³

1.6. Fosfinas como ligandos

Una de las características fundamentales de las fosfinas terciarias (PR_3) es la presencia de un par electrónico libre en el átomo de fósforo, lo cual puede hacer que se comporten como bases. El gran tamaño y baja electronegatividad del P con respecto al N provoca una mayor polarizabilidad y aumento de su reactividad nucleofílica en comparación con las aminas (NR_3).

Las fosfinas terciarias son muy utilizadas como ligandos con metales de transición, pudiéndose encontrar en la bibliografía gran cantidad de referencias respecto a la síntesis, caracterización y reactividad de complejos metálicos con fosfinas. El átomo de fósforo presenta orbitales $3d$ vacíos que pueden interactuar con los orbitales d llenos del metal actuando como un ligando aceptor- π y, de este modo, se refuerza el enlace σ entre el metal y el átomo de fósforo.¹⁰⁴

La modificación de los sustituyentes de la fosfina terciaria puede causar cambios importantes en las propiedades químicas y físicas de sus complejos con metales de transición, incluyendo la distancia M-P. Aunque los efectos electrónicos de los

sustituyentes son importantes en dichas propiedades, el efecto estérico de dichos sustituyentes es el factor dominante en la mayoría de los casos.

Tolman, en 1977, introdujo el concepto de ángulo cónico, Θ , como una medida del volumen estérico (figura 1.21). Un gran número de parámetros, incluyendo constantes de equilibrio y desplazamientos químicos en RMN, han podido ser correlacionados con el ángulo cónico del ligando fosfina.^{105,106}

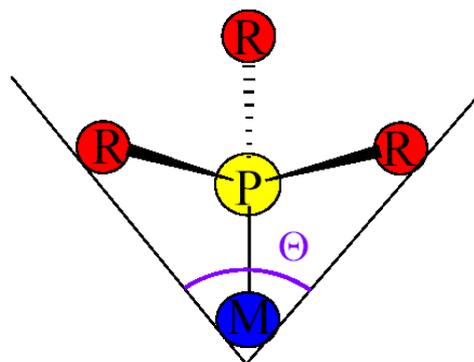


Figura 1.21: Representación esquemática del ángulo cónico de una fosfina

Los efectos estéricos, también, dominan la reactividad de muchos complejos de fosfinas con metales.¹⁰⁶ La presencia de varias fosfinas voluminosas en la misma esfera de coordinación puede facilitar la disociación, produciendo vacantes en la esfera de coordinación del metal.¹⁰⁷

Otro factor implicado en la reactividad de las fosfinas es el denominado efecto *trans*. El efecto *trans* es un principio básico de la química de la coordinación, el cual se refiere a la capacidad de un ligando de labilizar a otro ligando en posición *trans* con respecto al primero en un complejo planocuadrado u octaédrico.¹⁰⁸

Respecto a los efectos biológicos, se pueden encontrar complejos de Au(I) con ligandos fosfina que presentan actividad citotóxica en células tumorales.¹⁰⁹⁻¹¹² Además, complejos de Au(I) con fosfinas terciarias presentan propiedades antiartríticas.¹¹²

La actividad citotóxica de estos complejos se piensa que puede ser debida al carácter lipofílico del ligando fosfina, el cual permite al complejo de Au(I) atravesar la membrana plasmática de la célula con mayor facilidad produciendo una mayor acumulación de complejo en la célula.

Se ha analizado la actividad antitumoral de algunos complejos de platino con fosfinas por el NCI (National Cancer Institute) pero, en general, los complejos analizados no presentan una actividad antitumoral importante (tabla 1.1).

Ligando fosfina	Complejo analizado por el NCI
PPh₃	<i>cis</i> -[PtCl ₂ (PPh ₃) ₂]
	<i>trans</i> -[PtCl ₂ (PPh ₃) ₂]
	<i>cis</i> -[PtI ₂ (PPh ₃) ₂]
	<i>cis</i> -[Pt(N ₃) ₂ (PPh ₃) ₂]
	[Pt ₂ (PPh ₃) ₂ (μ-Cl) ₂ Cl ₂]
PBu₃	<i>trans</i> -[PtCl ₂ (P ⁿ Bu ₃) ₂]
	<i>trans</i> -[Pt(NO ₃) ₂ (P ⁿ Bu ₃) ₂]
	[Pt ₂ (P ⁿ Bu ₃) ₂ (μ-Cl) ₂ Cl ₂]
PMe₂Ph	<i>trans</i> -[PtCl ₂ (PMe ₂ Ph) ₂]

Tabla 1.1: Ejemplos de complejos de Pt(II) con ligandos fosfina cuya actividad citotóxica ha sido analizada su por el NCI.¹¹²

El complejo análogo del cisplatino con PPh₃, es decir *cis*-[PtCl₂(PPh₃)₂] es inactivo. Esta inactividad puede ser consecuencia del mayor efecto *trans* que presenta el átomo de P en comparación con el de N. Debido al efecto *trans*, el ligando trifenilfosfina produce una salida de los cloruros en la reacción de acuación demasiado rápida y, por lo tanto, la especie activa puede reaccionar pronto con biomoléculas que contienen grupos tioles, no permitiendo que llegue a la diana farmacológica de interés, el DNA.¹¹²

Por otro lado, si la actividad antitumoral de los complejos de Au(I) con fosfinas es atribuida al carácter lipofílico del ligando fosfina, entonces la cinética de la reacción de acuación será un factor crucial para que estos complejos lleguen a su diana.

Algunos complejos de Cu(I), Ag(I) y Au(I) con ligandos difosfinas han mostrado también actividad antitumoral.^{113,114}

Existen algunos ejemplos de complejos activos de platino con ligandos aminofosfina, los cuales se piensa que pueden interactuar de forma diferente con el DNA.¹¹⁵⁻¹¹⁸

Complejos de Pt(II) con fosfinas terciarias, como por ejemplo los compuestos *cis*-[PtCl₂(PPh₃)₂] y *trans*-[PtCl₂(PPh₃)₂], no mostraron actividad citotóxica. Se han estudiado también complejos de Pt(II) con ligandos aminofosfina, como se indicó anteriormente, pero no se ha estudiado la citotoxicidad en complejos que presenten en

torno al átomo de platino un ligando fosfina y un ligando amina. Aunque se han encontrado en la bibliografía compuestos de platino con ligandos fosfina y amina en geometría *trans*,¹¹⁹⁻¹²⁵ en ningún caso se ha estudiado su posible actividad biológica.

Por ejemplo, en 1992 se publicó que el complejo *trans*-[PtCl₂(NH₃)(quinolina)], presentaba actividad citotóxica (figura 1.12).⁷⁰ Se cree que debido a los impedimentos estéricos producidos por el ligando quinolina, la cinética de acuación es más lenta que la del transplatino. Además, se ha demostrado que la presencia del ligando quinolina produce aductos Pt-DNA diferentes a las del transplatino.^{66,126,127} Dos años antes, se publicó la síntesis del complejo *trans*-[PtCl₂(PEt₃)(quinolina)], pero nunca se ha estudiado su posible actividad antitumoral.¹²⁸

1.7. Planteamiento y Objetivos

En los últimos años se ha avanzado mucho en la comprensión del mecanismo molecular implicado en la acción antitumoral del cisplatino. Hoy se sabe que el mecanismo implica la unión del platino al DNA, produciendo un daño reconocido por la célula que la induce, por diferentes vías de señalización, a una muerte por apoptosis.

La búsqueda de drogas activas frente a tumores resistentes al cisplatino requiere el diseño de compuestos que puedan interaccionar con el DNA de forma distinta a como lo hace el *cis*-DDP.

Tras quedar obsoletas lo que se denominaban reglas estructura-actividad, y conocer la eficiencia de los complejos de geometría *trans*, se abre un nuevo campo de investigación donde el objetivo principal es el diseño de nuevos compuestos y conocer el mecanismo de acción de los mismos. El establecimiento de nuevas relaciones estructura-actividad (SAR) permitirá sintetizar mejores fármacos con un efecto citotóxico cada vez más dirigido a células tumorales.

En el planteamiento de esta tesis se ha tenido en cuenta que los ligandos voluminosos pueden disminuir la velocidad de acuación de los complejos *trans* de platino, que dichos ligandos podrían producir un mayor daño o distorsión en el DNA, y

que el carácter hidrofílico o lipofílico de dichos ligandos puede permitir una mejor entrada del complejo de platino en la célula.

Con este planteamiento, el objetivo de esta tesis ha sido determinar la actividad citotóxica como agentes antitumorales, de complejos de platino(II) con geometría *trans* y tratar de establecer relaciones estructura-actividad en función del tamaño y del carácter hidrofílico / lipofílico de los ligandos.

Para ello se ha llevado a cabo la síntesis de complejos de platino con los ligandos 3- ó 4-hidroximetilpiridina en *trans* al NH₃ o la isopropilamina. El ligando hidroximetilpiridina podría dar lugar a distorsiones en el DNA, debido al volumen del anillo aromático. Además, pensamos que el grupo hidroximetilo podría aumentar la hidrofilia del complejo y favorecer la formación de enlaces de hidrógeno que ayuden a la interacción con el DNA.¹⁰³

Por otra parte, se han sintetizado complejos de Pt(II) con diferentes aminas alifáticas en *trans* a la trifenilfosfina la cual, además de tener un gran volumen estérico, presenta un carácter lipofílico elevado, que puede producir efectos diferentes en la célula.

Una vez realizada la caracterización de los complejos mediante análisis químico elemental, espectroscopía IR, ¹H-RMN, ¹³C-RMN, ³¹P-RMN, ¹⁹⁵Pt-RMN y por difracción de rayos-X, y determinada la citotoxicidad, se han seleccionado los complejos más activos en células tumorales y menos tóxicos en células normales para estudiar su interacción con el DNA y las posibles modificaciones producidas sobre éste.

Puesto que la actividad citotóxica y la apoptosis están estrechamente relacionadas con el ciclo celular se realizaron estudios de citometría de flujo para observar las posibles alteraciones que producen los complejos seleccionados sobre el ciclo celular y su relación con la proteína p53, y establecer un posible mecanismo de acción.

1.8. Bibliografía

- (1) Muñoz, A. En: *Cáncer. Genes y Nuevas Terapias*; Hélice: Madrid, **1997**.
- (2) Curtis, H.; Barnes, S. N. En: *Biología*; 6th ed.; Médica Panamericana cop: Buenos Aires, **2000**.
- (3) Brugge, J.; Curran, T.; Harlow, E.; McCormick, F. En: *Origin of human cancer: a comprehensive review*; Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York, **1991**.
- (4) Franks, L. M. En: *Introduction to the cellular and molecular biology of cancer*; 2nd ed.; Oxford University Press: Oxford, **1991**.
- (5) Orvig, C.; Abrams, M. J. *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 2201.
- (6) Peyrone, M. *Ann. Chem. Pharm.* **1845**, *51*, 1.
- (7) Rosenber.B; Vancamp, L.; Krigas, T. *Nature.* **1965**, *205*, 698.
- (8) Rosenber.B; Vancamp, L.; Trosko, J. E.; Mansour, V. H. *Nature.* **1969**, *222*, 385.
- (9) Rosenber.B; Vancamp, L. *Cancer Res.* 1970, *30*, 1799.
- (10) Kociba, R. J.; Sleight, S. D.; Rosenber.B *Cancer Chemoth. Rep. 1.* **1970**, *54*, 325.
- (11) Giaccone, G. *Drugs.* **2000**, *59*, 9.
- (12) Kelland, L. R. *Crit. Rev. Oncol. Hemat.* **1993**, *15*, 191.
- (13) Lebwohl, D.; Canetta, R. *Eur. J. Cancer.* **1998**, *34*, 1522.
- (14) Wong, E.; Giandomenico, C. M. *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 2451.
- (15) Galanski, M.; Yasemi, A.; Slaby, S.; Jakupec, M. A.; Arion, V. B.; Rausch, M.; Nazarov, A. A.; Keppler, B. K. *Eur. J. Med. Chem.* 2004, *39*, 707.
- (16) O'Dwyer, P. J.; Stevenson, J. P.; Johnson, S. W. En: *Cisplatin. Chemistry and biochemistry of a leading anticancer drug*; Lippert, B., Eds; Wiley-VCH: Zurich, **1999**, 31.
- (17) Raymond, E.; Chaney, S. G.; Taamma, A.; Cvitkovic, E. *Ann. Oncol.* **1998**, *9*, 1053.
- (18) Raymond, E.; Faivre, S.; Woynarowski, J. M.; Chaney, S. G. *Semin. Oncol.* **1998**, *25*, 4.
- (19) Boulikas, T.; Vougiouka, M. *Oncol. Rep.* **2003**, *10*, 1663.
- (20) Luo, F. R.; Wyrick, S. D.; Chaney, S. G. *J. Biochem. Mol. Toxic.* **1999**, *13*, 159.

- (21) Scheeff, E. D.; Briggs, J. M.; Howell, S. B. *Mol. Pharmacol.* **1999**, *56*, 633.
- (22) Kelland, L. R.; Sharp, S. Y.; O'Neill, C. F.; Raynaud, F. I.; Beale, P. J.; Judson, I. R. *J. Inorg. Biochem.* **1999**, *77*, 111.
- (23) Holford, J.; Beale, P. J.; Boxall, F. E.; Sharp, S. Y.; Kelland, L. R. *Eur. J. Cancer.* **2000**, *36*, 1984.
- (24) Holford, J.; Sharp, S. Y.; Murrer, B. A.; Abrams, M.; Kelland, L. R. *Brit. J. Cancer.* **1998**, *77*, 366.
- (25) Wang, D.; Lippard, S. J. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2005**, *4*, 307.
- (26) Ho, Y. P.; Au-Yeung, S. C. F.; To, K. K. W. *Med. Res. Rev.* **2003**, *23*, 633.
- (27) Kelland, L. R. *Drug Resist. Update.* **2000**, *3*, 139.
- (28) Kelland, L. R. *Drugs.* **2000**, *59*, 1.
- (29) Jamieson, E. R.; Lippard, S. J. *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 2467.
- (30) Pinto, A. L.; Lippard, S. J. *Biochim. Biophys. Acta.* **1984**, *780*, 167.
- (31) Brabec, V.; Leng, M. P. *Natl. Acad. Sci.* **1993**, *90*, 5345.
- (32) Yang, D. Z.; Vanboom, S. S. G. E.; Reedijk, J.; Vanboom, J. H.; Farrell, N.; Wang, A. H. J. *Nat. Struct. Biol.* **1995**, *2*, 577.
- (33) Brabec, V. *Prog. Nucleic Acid Res.* **2002**, *71*, 1.
- (34) Sigel, A.; Sigel, H. En: *Metal Complexes in Tumor Diagnosis and as Anticancer Agents*; Marcel Dekker: New York, **2004**; Vol. 42.
- (35) Sorenson, C. M.; Eastman, A. *Cancer Res.* **1988**, *48*, 6703.
- (36) Siddik, Z. H. *Oncogene.* **2003**, *22*, 7265.
- (37) Huang, J. C.; Zamble, D. B.; Reardon, J. T.; Lippard, S. J.; Sancar, A. P. *Natl. Acad. Sci.* **1994**, *91*, 10394.
- (38) Jordan, P.; Carmo-Fonseca, M. *Cell. Mol. Life Sci.* **2000**, *57*, 1229.
- (39) Shapiro, G. I.; Harper, J. W. *J. Clin. Invest.* **1999**, *104*, 1645.
- (40) Perez, J. M.; Kelland, L. R.; Montero, E. I.; Boxall, F. E.; Fuertes, M. A.; Alonso, C.; Navarro-Ranninger, C. *Mol. Pharmacol.* **2003**, *63*, 933.
- (41) Lieberthal, W.; Triaca, V.; Levine, J. *Am. J. Physiol.* **1996**, *270*, 700.
- (42) Herceg, Z.; Wang, Z. Q. *Mutat. Res.-Fund. Mol. M.* **2001**, *477*, 97.
- (43) Wyllie, A. H.; Duncan, C.; Evans, I.; Rose, K. A.; Spandidos, D. A. *J. Pathol.* **1987**, *152*, A183.
- (44) Lieberthal, W.; Levine, J. S. *Am. J. Physiol.* **1996**, *271*, 477.
- (45) González, V. M.; Fuertes, M. A.; Alonso, C.; Pérez, J. M. *Mol. Pharmacol.* **2001**, *59*, 657.

- (46) De Falco, G.; Soprano, C.; Giordano, A. En: *Cell Cycle Inhibitors in Cancer Therapy*; Giordano, A., Soprano, K. J., Eds.; Humana Press Inc.: Totowa, New Jersey, **2003**.
- (47) Pietenpol, J. A.; Stewart, Z. A. *Toxicology*. **2002**, *181-182*, 475.
- (48) Bullock, A. N.; Fersht, A. R. *Nat. Rev. Cancer*. **2001**, *1*, 68.
- (49) Morgan, S. E.; Kastan, M. B. *Adv. Cancer Res*. **1997**, *71*, 1.
- (50) Vousden, K. H.; Lu, X. *Nat. Rev. Cancer*. **2002**, *2*, 594.
- (51) Balint, E.; Vousden, K. H. *Brit. J. Cancer*. **2001**, *85*, 1813.
- (52) Zhou, J.; Ahn, J.; Wilson, S. H.; Prives, C. *Embo J*. **2001**, *20*, 914.
- (53) Offer, H.; Zurer, I.; Banfalvi, G.; Reha'k, M.; Falcovitz, A.; Milyavsky, M.; Goldfinger, N.; Rotter, V. *Cancer Res*. **2001**, *61*, 88.
- (54) Offer, H.; Milyavsky, M.; Erez, N.; Matas, D.; Zurer, I.; Harris, C. C.; Rotter, V. *Oncogene*. **2001**, *20*, 581.
- (55) Seo, Y. R.; Jung, H. J. *Exp. Mol. Med*. **2004**, *36*, 505.
- (56) Offer, H.; Erez, N.; Zurer, I.; Tang, X.; Milyavsky, M.; Goldfinger, N.; Rotter, V. *Carcinogenesis*. **2002**, *23*, 1025.
- (57) Brabec, V.; Kasparkova, J. *Drug Resist. Update*. **2002**, *5*, 147.
- (58) Fink, D.; Nebel, S.; Norris, P. S.; Baergen, R. N.; Wilczynski, S. P.; Costa, M. J.; Haas, M.; Cannistra, S. A.; Howell, S. B. *Int. J. Cancer*. **1998**, *77*, 741.
- (59) Gillet, L. C. J.; Scharer, O. D. *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 253.
- (60) Fuertes, M. A.; Alonso, C.; Pérez, J. M. *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 645.
- (61) Siddik, Z. H.; Mims, B.; Lozano, G.; Thai, G. *Cancer Res*. **1998**, *58*, 698.
- (62) Kool, M.; de Haas, M.; Scheffer, G. L.; Scheper, R. J.; van Eijk, M. J.; Juijn, J. A.; Baas, F.; Borst, P. *Cancer Res*. **1997**, *57*, 3537.
- (63) Hockenbery, D. M.; Oltvai, Z. N.; Yin, X. M.; Milliman, C. L.; Korsmeyer, S. J. *Cell*. **1993**, *75*, 241.
- (64) Vaisman, A.; Varchenko, M.; Umar, A.; Kunkel, T. A.; Risinger, J. I.; Barrett, J. C.; Hamilton, T. C.; Chaney, S. G. *Cancer Res*. **1998**, *58*, 3579.
- (65) Eastman, A.; Jennerwein, M. M.; Nagel, D. L. *Chem. Biol. Interact.* **1988**, *67*, 71.
- (66) Zakovska, A.; Novakova, O.; Balcarova, Z.; Bierbach, U.; Farrell, N.; Brabec, V. *Eur. J. Biochem.* **1998**, *254*, 547.
- (67) Cleare, M. J. *Inorg. Perspect. Biol.* **1977**, *1*, 19.
- (68) Cleare, M. J. *Biochimie*. **1978**, *60*, 1038.

- (69) Cleare, M. J.; Hydes, P. C.; Malerbi, B. W.; Watkins, D. M. *Biochimie*. **1978**, *60*, 835.
- (70) Van Beusichem, M.; Farrell, N. *Inorg. Chem.* **1992**, *31*, 634.
- (71) Farrell, N.; Kelland, L. R.; Roberts, J. D.; Vanbeusichem, M. *Cancer Res.* **1992**, *52*, 5065.
- (72) Coluccia, M.; Nassi, A.; Loseto, F.; Boccarelli, A.; Mariggio, M. A.; Giordano, D.; Intini, F. P.; Caputo, P.; Natile, G. *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 510.
- (73) Coluccia, M.; Sava, G.; Loseto, F.; Nassi, A.; Boccarelli, A.; Giordano, D.; Alessio, E.; Mestroni, G. *Eur. J. Cancer.* **1993**, *29A*, 1873.
- (74) Coluccia, M.; Boccarelli, A.; Mariggio, M. A.; Cardellicchio, N.; Caputo, P.; Intini, F. P.; Natile, G. *Chem.-Biol. Interact.* **1995**, *98*, 251.
- (75) Boccarelli, A.; Coluccia, M.; Intini, F. P.; Natile, G.; Locker, D.; Leng, M. *Anti-Cancer Drug Des.* **1999**, *14*, 253.
- (76) Coluccia, M.; Nassi, A.; Boccarelli, A.; Giordano, D.; Cardellicchio, N.; Locker, D.; Leng, M.; Sivo, M.; Intini, F. P.; Natile, G. *J. Inorg. Biochem.* **1999**, *77*, 31.
- (77) Intini, F. P.; Boccarelli, A.; Francia, V. C.; Pacifico, C.; Sivo, M. F.; Natile, G.; Giordano, D.; De Rinaldis, P.; Coluccia, M. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2004**, *9*, 768.
- (78) Brabec, V.; Vrana, O.; Novakova, O.; Kleinwachter, V.; Intini, F. P.; Coluccia, M.; Natile, G. *Nucleic Acids Res.* **1996**, *24*, 336.
- (79) Brabec, V.; Kasparkova, J.; Vrana, O.; Novakova, O.; Cox, J. W.; Qu, Y.; Farrell, N. *Biochemistry.* **1999**, *38*, 6781.
- (80) Farrell, N.; Qu, Y.; Bierbach, U.; Valsecchi, M.; Menta, E. En: *Cisplatin. Chemistry and biochemistry of a leading anticancer drug*; Lippert, B., Eds; Wiley-VCH: Zurich, **1999**, 479.
- (81) O'Neill, C. F.; Hunakova, L.; Kelland, L. R. *Chem.-Biol. Interact.* **1999**, *123*, 11.
- (82) Montero, E. I.; Díaz, S.; González-Vadillo, A. M.; Pérez, J. M.; Alonso, C.; Navarro-Ranninger, C. *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 4264.
- (83) Pérez, J. M.; Montero, E. I.; González, A. M.; Álvarez-Valdes, A.; Alonso, C.; Navarro-Ranninger, C. *J. Inorg. Biochem.* **1999**, *77*, 37.
- (84) Pérez, J. M.; Montero, E. I.; González, A. M.; Solans, X.; Font-Bardia, M.; Fuertes, M. A.; Alonso, C.; Navarro-Ranninger, C. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 2411.
- (85) Montero, E. I.; Pérez, J. M.; Schwartz, A.; Fuertes, M. A.; Malinge, J. M.; Alonso, C.; Leng, M.; Navarro-Ranninger, C. *ChemBiochem.* **2002**, *3*, 61.

- (86) Pérez, J. M.; Montero, E. I.; Quiroga, A. G.; Fuertes, M. A.; Alonso, C.; Navarro-Ranninger, C. *M. B. D.* **2001**, *8*, 29.
- (87) Prokop, R.; Kasparkova, J.; Novakova, O.; Marini, V.; Pizarro, A. M.; Navarro-Ranninger, C.; Brabec, V. *Biochem. Pharmacol.* **2004**, *67*, 1097.
- (88) Pizarro, A. M.; Munk, V. P.; Navarro-Ranninger, C.; Sadler, P. J. *Angew. Chem. Int. Edit.* **2003**, *42*, 5339.
- (89) Natile, G.; Coluccia, M. *Coord. Chem. Rev.* **2001**, *216*, 383.
- (90) Perez, J. M.; Fuertes, M. A.; Alonso, C.; Navarro-Ranninger, C. *Crit. Rev. Oncol. Hemat.* **2000**, *35*, 109.
- (91) Khazanov, E.; Barenholz, Y.; Gibson, D.; Najajreh, Y. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 5196.
- (92) Kasparkova, J.; Marini, V.; Najajreh, Y.; Gibson, D.; Brabec, V. *Biochemistry.* **2003**, *42*, 6321.
- (93) Najajreh, Y.; Perez, J. M.; Navarro-Ranninger, C.; Gibson, D. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 5189.
- (94) Najajreh, Y.; Prilutski, D.; Ardeli-Tzaraf, Y.; Perez, J. M.; Khazanov, E.; Barenholz, Y.; Kasparkova, J.; Brabec, V.; Gibson, D. *Angew. Chem. Int. Edit.* **2005**, *44*, 2885.
- (95) Jansen, B. A. J.; Wielaard, P.; Kalayda, G. V.; Ferrari, M.; Molenaar, C.; Tanke, H. J.; Brouwer, J.; Reedijk, J. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2004**, *9*, 403.
- (96) Kalayda, G. V.; Jansen, B. A. J.; Molenaar, C.; Wielaard, P.; Tanke, H. J.; Reedijk, J. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2004**, *9*, 414.
- (97) Álvarez-Valdes, A.; Pérez, J. M.; López-Solera, I.; Lannegrand, R.; Continente, J. M.; Amo-Ochoa, P.; Camazon, M. J.; Solans, X.; Font-Bardia, M.; Navarro-Ranninger, C. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 1835.
- (98) Navarro-Ranninger, C.; Amo Ochoa, P.; Pérez, J. M.; González, V. M.; Masaguer, J. R.; Alonso, C. *J. Inorg. Biochem.* **1994**, *53*, 177.
- (99) Amo Ochoa, P.; González, V. M.; Pérez, J. M.; Masaguer, J. R.; Alonso, C.; Navarro-Ranninger, C. *J. Inorg. Biochem.* **1996**, *64*, 287.
- (100) Huq, F.; Daghriri, H.; Yu, J. Q.; Beale, P.; Fisher, K. *Eur. J. Med. Chem.* **2004**, *39*, 691.
- (101) Chowdhury, M. A.; Huq, F.; Abdullah, A.; Beale, P.; Fisher, K. *J. Inorg. Biochem.* **2005**, *99*, 1098.

- (102) Teixeira, L. J.; Seabra, M.; Reis, E.; da Cruz, M. T. G.; de Lima, M. C. P.; Pereira, E.; Miranda, M. A.; Marques, M. P. M. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 2917.
- (103) Reedijk, J. P. *Natl. Acad. Sci.* **2003**, *100*, 3611.
- (104) McAuliffe, C. A. En: *Comprehensive Coordination Chemistry*; Wilkinson, G., Gillard, R. D., McCleverty, J. A., Eds.; Pergamon Press: Oxford, **1987**; Vol. 2, 989.
- (105) Tolman, C. A. *Chem. Rev.* **1977**, *77*, 313.
- (106) Annibale, G.; Canovese, L.; Cattalini, L.; Marangoni, G.; Michelon, G.; Tobe, M. L. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **1983**, 775.
- (107) Mann, B. E.; Musco, A. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **1975**, 1673.
- (108) Hartley, F. R. *Chem. Soc. Rev.* **1973**, *2*, 163.
- (109) Shaw, C. F.; Beery, A.; Stocco, G. C. *Inorg. Chim.-Bioinorg.* **1986**, *123*, 213.
- (110) Simon, T. M.; Kunishima, D. H.; Vibert, G. J.; Lorber, A. *Cancer Res.* **1981**, *41*, 94.
- (111) Lorber, A.; Simon, T. M. *Clin. Pharmacol. Ther.* **1981**, *29*, 262.
- (112) Berners-Price, S. J.; Sadler, P. J. En: *Struct. Bonding*; Berlin, **1988**; Vol. 70, 27.
- (113) Berners-Price, S. J.; Girard, G. R.; Hill, D. T.; Sutton, B. M.; Jarrett, P. S.; Faucette, L. F.; Johnson, R. K.; Mirabelli, C. K.; Sadler, P. J. *J. Med. Chem.* **1990**, *33*, 1386.
- (114) Berners-Price, S. J.; Bowen, R. J.; McKeage, M. J.; Galettis, P.; Healy, P. C. *Coord. Chem. Rev.* **1999**, *185*, 823.
- (115) Neplechova, K.; Kasparikova, J.; Vrana, O.; Novakova, O.; Habtemariam, A.; Watchman, B.; Sadler, P. J.; Brabec, V. *Mol. Pharmacol.* **1999**, *56*, 20.
- (116) Margiotta, N.; Habtemariam, A.; Sadler, P. J. *Angew. Chem. Int. Edit.* **1997**, *36*, 1185.
- (117) Henderson, W.; Alley, S. R. *Inorg. Chim. Acta.* **2001**, *322*, 106.
- (118) Habtemariam, A.; Watchman, B.; Potter, B. S.; Palmer, R.; Parsons, S.; Parkin, A.; Sadler, P. J. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **2001**, 1306.
- (119) Ambuehl, J.; Pregosin, P. S.; Venanzi, L. M.; Consiglio, G.; Bachechi, F.; Zambonelli, L. *J. Organomet. Chem.* **1979**, *181*, 255.
- (120) Colquhoun, H. M.; Stoddart, J. F.; Williams, D. J. *J. Chem. Soc., Chem. Comm.* **1981**, 847.
- (121) Albinati, A.; Anklin, C. G.; Ganazzoli, F.; Ruegg, H.; Pregosin, P. S. *Inorg. Chem.* **1987**, *26*, 503.

- (122) Bachechi, F.; Cellai, L.; Sparapani, R.; Paradisi, M. P. *J. Chem. Res.-S.* **1989**, 8.
- (123) Cetinkaya, B.; Ozdemir, I.; Tahir, M. N.; Ulku, D. *J. Organomet. Chem.* **1998**, 561, 7.
- (124) de Sousa, G. F.; Filgueiras, C. A. L.; Mascarenhas, Y. P.; de Azevedo, W. F. *Transit. Metal. Chem.* **2002**, 27, 433.
- (125) Adams, C. J.; Anderson, K. M.; Baber, R. A.; Connelly, N. G.; Kandiah, M.; Orpen, A. G. *Dalton Trans.* **2004**, 3353.
- (126) Zou, Y.; Vanhouten, B.; Farrell, N. *Biochemistry.* **1993**, 32, 9632.
- (127) Brabec, V.; Neplechova, K.; Kasparkova, J.; Farrell, N. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2000**, 5, 364.
- (128) Albinati, A.; Pregosin, P. S.; Wombacher, F. *Inorg. Chem.* **1990**, 29, 1812.

2. Experimental

2.1. SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN	43
2.1.1. Materiales utilizados	43
2.1.2. Métodos experimentales de estudio	43
2.1.2.1. <i>Análisis químico y puntos de fusión</i>	43
2.1.2.2. <i>Espectroscopía Infrarroja</i>	43
2.1.2.3. <i>Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear</i>	44
2.1.2.4. <i>Difracción de Rayos-X</i>	44
2.1.3. Síntesis de los complejos de partida	45
2.1.3.1. <i>Síntesis de los compuestos cis de platino(II)</i>	45
2.1.3.1.1. <i>cis-[PtCl₂(isopropilamina)₂]</i>	45
2.1.3.1.2. <i>cis-[PtCl₂(NH₃)₂]</i>	46
2.1.3.1.3. <i>cis-[PtCl₂(PPh₃)₂]</i>	46
2.1.3.2. <i>Síntesis del trans-[Pt₂Cl₂(μ-Cl)₂(PPh₃)₂]</i>	47
2.1.4. Síntesis de los compuestos trans de platino(II)	48
2.1.4.1. <i>Compuestos trans-[PtCl₂(amina)(PPh₃)]</i>	48
2.1.4.2. <i>Compuestos trans-[PtCl₂(amina)(amina')]</i>	50
2.1.5. Caracterización estructural	52
2.1.5.1. <i>Espectros de Infrarrojo</i>	52
2.1.5.2. <i>Resonancia Magnética Nuclear</i>	55
2.1.5.2.1. <i>Compuestos cis de partida</i>	55
2.1.5.2.2. <i>trans-[Pt₂Cl₂(μ-Cl)₂(PPh₃)₂]</i>	56
2.1.5.2.3. <i>Compuestos trans-[PtCl₂(amina)(PPh₃)]</i>	56
2.1.5.2.4. <i>Compuestos trans-[PtCl₂(amina)(amina')]</i>	58
2.1.5.3. <i>Difracción de Rayos-X</i>	60
2.2. ESTUDIOS BIOQUÍMICOS	76

2.2.1. Materiales utilizados	76
2.2.2. Metodos experimentales de estudio	77
2.2.2.1. <i>Líneas celulares y evaluación de la citotoxicidad</i>	77
2.2.2.2. <i>Citometría de Flujo</i>	88
2.2.2.3. <i>Microscopía Confocal</i>	91
2.2.2.4. <i>Interacción con DNA</i>	93
2.2.2.4.1. <i>Polarografía de Pulso diferencial: Cinética de unión al DNA</i>	93
2.2.2.4.2. <i>Secuenciación de aductos Pt-DNA</i>	94
2.2.2.4.3. <i>Fluorescencia del EtBr: Aductos Pt-DNA</i>	97
2.2.2.4.4. <i>Espectroscopía de Absorción Atómica: Monoaductos Pt-DNA</i>	98
2.2.2.4.5. <i>Electroforesis Desnaturalizante: Aductos Intercatenarios</i>	100
2.2.2.4.6. <i>Dicroísmo Circular: Distorsión del DNA</i>	101
2.2.2.4.7. <i>Electroforesis en gel de agarosa: Desenrollamiento Inducido</i>	103
2.2.2.4.8. <i>Reacción de los complejos de Pt con GSH y MT-2</i>	105
2.3. BIBLIOGRAFÍA	108

2.1. SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN

2.1.1. Materiales utilizados

Los productos de partida se han utilizado sin previa purificación. El tetracloroplatinato(II) de potasio fue suministrado por Sigma-Aldrich. La trifenilfosfina, el amoníaco, así como, las aminas 3-hidroximetilpiridina y 4- hidroximetilpiridina; isopropilamina; 1-metilpropilamina, racémico, R y S; 2-metilbutilamina, racémico y S fueron suministrados por Sigma-Aldrich.

Los disolventes fueron suministrados por Merk, Panreac, BDH, Probus y Aroca. Todos ellos se purifican por métodos estándar y se mantienen sobre tamiz molecular de 3 o 4 Å, dependiendo del disolvente.

Los disolventes deuterados acetona-d₆, DMSO-d₆, CDCl₃ y D₂O fueron suministrados por Merck.

2.1.2. Métodos experimentales de estudio

2.1.2.1. Análisis químico y puntos de fusión

Los análisis elementales de C, H, N y O se han realizado en un microanalizador Perkin Elmer 2400 Serie II. Los puntos de fusión se midieron en un aparato Gallenkamp.

2.1.2.2. Espectroscopía Infrarroja

Los espectros vibracionales de IR entre 4000 y 200 cm⁻¹ han sido registrados en un espectrofotómetro Perkin-Elmer 1600, Series FTIR, empleando suspensiones de nujol en ventanas de CsI.

2.1.2.3. Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear

Los espectros de RMN fueron registrados en un espectrofotómetro Bruker AMX-300 equipado con una sonda multinuclear inversa de 5 mm, utilizando acetona-d₆, DMSO-d₆, acetonitrilo-d₃, CDCl₃ y D₂O, como disolventes, en función del compuesto.

La asignación de las señales se realiza sobre la base de los desplazamientos químicos, el valor de integración de las señales, su multiplicidad y el valor de las constantes de acoplamiento espín-espín.

Los valores de los desplazamientos químicos se dan en unidades δ (ppm), y los valores de las constantes de acoplamiento en Hz.

Las referencias de los espectros de resonancia de los núcleos ¹H son: tetrametilsilano como referencia interna, dioxano en los espectros de D₂O y los picos residuales de los disolventes deuterados, producidos por moléculas no deuteradas, en el caso de acetona-d₆, DMSO-d₆ y CDCl₃. En el caso de los espectros de resonancia de los núcleos ¹⁹⁵Pt se usa como referencia externa K₂PtCl₆.

2.1.2.4. Difracción de Rayos-X

En los casos en los que se han obtenido monocristales de los complejos adecuados para determinar su estructura por DRX, se han utilizado los siguientes equipos.

Difractómetro MAR345. Los parámetros de la celdilla unidad se determinan a partir del centrado automático de un número de reflexiones e intervalo del ángulo θ necesario para cada compuesto, que se refina posteriormente por mínimos cuadrados. Las intensidades se miden utilizando un monocromador de grafito MoK α , utilizando un barrido $\omega/2\theta$. De las reflexiones medidas, sólo se asumen como observadas las que cumplen la condición $I > 2\sigma(I)$. Se corrigen los efectos Lorentz y polarización, así como la absorción.¹

Difractómetro de tres círculos Bruker SMART 6000 CCD con un ánodo de cobre (Cu K α radiación, $\lambda = 1.54178 \text{ \AA}$) generador de rayos X MAC Science y óptica Gobel.² Se realizan correcciones empíricas de absorción con el programa SADABS gracias a la

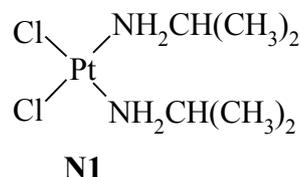
redundancia en la medida de las reflexiones.^{1,3} El número de reflexiones medidas está casi siempre por encima de 10.000. Los parámetros de la celda unidad se obtienen por refinamiento de reflexiones del conjunto completo de datos, los cuales se integran con el programa SAINT para corregir los efectos de polarización y de Lorentz.⁴

El software que se utiliza para resolver y refinar la estructura es SHELXTL 6.10.⁵ Las estructuras se resuelven por métodos directos y cuando estos no dan una solución satisfactoria, se resuelven por el método de Patterson. Todos los átomos, salvo los hidrógenos, se refinan con parámetros de desplazamiento anisotrópicos.

2.1.3. Síntesis de los complejos de partida

2.1.3.1. Síntesis de los compuestos *cis* de platino(II)

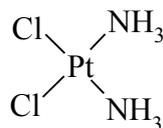
2.1.3.1.1. *cis*-[PtCl₂(isopropilamina)₂]



A una suspensión de K₂PtCl₄ (560 mg, 1.43 mmol) en THF/H₂O (4/2), se añaden 4 equivalentes de NH₂CH(CH₃)₂ (458 μL, 5.37 mmol). La mezcla se mantiene con agitación a temperatura ambiente y oscuridad durante 24 h. El producto precipitado se separa por filtración. Se lava con agua, etanol y éter etílico. Este producto, *cis*-[PtCl₂(isopropilamina)₂], aparece impurificado con una pequeña cantidad del isómero *trans*, que se elimina lavando repetidas veces con cloroformo.

Sólido blanco. Rendimiento 60%. Análisis químico calculado para C₆H₁₈N₂Cl₂Pt: C: 18.76%, H: 4.74%, N: 7.29%. Encontrado: C: 18.63%, H: 4.79%, N: 7.40%. Datos de IR ver tabla 2.1. Datos de RMN ver tabla 2.5.

2.1.3.1.2. *cis*-[PtCl₂(NH₃)₂]

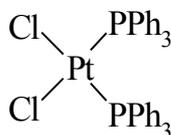


***cis*-DDP**

La síntesis de este reactivo se lleva a cabo mediante una combinación de las síntesis descritas anteriormente.^{6,7} K₂PtCl₄ (250mg, 0.60 mmol) disuelto en agua (3 mL) se hace reaccionar con un exceso de KI (800 mg, 4.8 mmol) durante 30 min a temperatura ambiente. A continuación, la disolución obtenida se hace reaccionar con 2.5 equivalentes de NH₃ (101.7 μL, 1.5 mmol) obteniéndose un precipitado amarillo que se lava con agua: *cis*-[PtI₂(NH₃)₂] (272 mg, 93%). A una suspensión amarilla de *cis*-[PtI₂(NH₃)₂] (200 mg, 0.41 mmol) en agua (6 mL) se le añaden 1.95 equivalentes de AgNO₃ (137.9 mg, 0.81 mmol) y la mezcla se deja reaccionar 24 horas a temperatura ambiente y en oscuridad. Se filtra el AgI formado y, a continuación, se añade a la disolución incolora un exceso del 10%, respecto al *cis*-[PtI₂(NH₃)₂], de KCl (65.04 mg, 0.86 mmol). Posteriormente, al enfriar la disolución a 0 °C se forma un precipitado amarillo, que se lava con agua, etanol y éter etílico (100 mg, 85 %).

Sólido amarillo. Rendimiento 69 %. Análisis químico calculado para H₆N₂Cl₂Pt: H: 2.02%, N: 9.34%. Encontrado: H: 2.09%, N: 9.12%. Datos de IR ver tabla 2.1. ¹⁹⁵Pt-RMN (DMSO-d₆)(ppm): -2399.

2.1.3.1.3. *cis*-[PtCl₂(PPh₃)₂]



P1

La síntesis de este reactivo está basada en el método original de Jensen, con diversas modificaciones.⁸

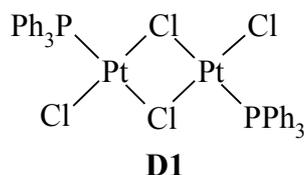
Una disolución en etanol (2.5 ml) de PPh₃ (1.263 g, 4.82 mmol) se añade sobre una disolución en agua (2.5 ml) de K₂PtCl₄ (1.0 g, 2.4 mmol) y se mantiene en agitación durante 24 h en la oscuridad a temperatura ambiente. El producto, un precipitado

amarillo pálido, se lava con agua, etanol y éter etílico. El sólido seco se lava con CHCl_3 , quedando un producto blanco (isómero *cis*) y una disolución amarilla (isómero *trans*). La disolución amarilla se deja en reposo durante un par de días y en presencia de luz visible, observándose la formación de más precipitado blanco. Esta isomerización del complejo amarillo *trans*- $[\text{PtCl}_2(\text{PPh}_3)_2]$ al isómero *cis* de color blanco es catalizada por luz visible.⁹

Sólido blanco. Rendimiento 98%. Análisis químico calculado para $\text{C}_{36}\text{H}_{30}\text{Cl}_2\text{P}_2\text{Pt}$: C: 54.60%, H: 3.82%. Encontrado: C: 54.05%, H: 3.73%. Datos de IR ver tabla 2.1. Datos de RMN ver tabla 2.6.

2.1.3.2. Síntesis del *trans*- $[\text{Pt}_2\text{Cl}_2(\mu\text{-Cl})_2(\text{PPh}_3)_2]$

Esta síntesis se basa en los métodos de F. R. Hartley y R. J. Goodfellow.^{10,11}



La síntesis del dímero *trans*- $[\text{Pt}_2\text{Cl}_2(\mu\text{-Cl})_2(\text{PPh}_3)_2]$ (**D1**), se realiza por reacción de *cis*- $[\text{PtCl}_2(\text{PPh}_3)_2]$ (1,1 g, 1.4 mmol) con PtCl_2 (390 mg, 1.46 mmol) en naftaleno (4.0 g, 31.2 mmol), que al calentar por encima de 87 °C, se funde y actúa como disolvente. Se mezclan ambos reactivos en un mortero que posteriormente se transfieren a un matraz. Se refluxe con agitación a 160 °C durante 15 min. Una vez terminada la reacción se lava con abundante éter etílico para eliminar el naftaleno usado como disolvente, y posteriormente se lava con CHCl_3 para obtener un precipitado naranja (isómero *trans*) y una disolución amarilla (isómero *cis*). Cuando la disolución amarilla se calienta cambia a naranja, con la formación de más precipitado del isómero *trans*. Por último se lava el precipitado naranja con etanol y acetona para eliminar impurezas.

Sólido naranja. Rendimiento: 90%. Análisis químico calculado para $\text{C}_{36}\text{H}_{30}\text{Cl}_4\text{P}_2\text{Pt}_2$: C: 40.93%, H: 2.86%. Encontrado: C: 40.96, H: 2.79. Datos de IR ver tabla 2.2. Datos de RMN ver tabla 2.7. Difracción de R-X ver tablas 2.19 y 2.20.

2.1.4. Síntesis de los compuestos *trans* de platino(II)

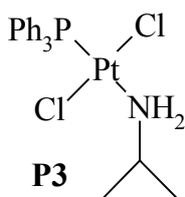
La síntesis de los compuestos *trans*-Pt(II) se lleva a cabo usando la diferencia en el efecto *trans* de los ligandos, fosfina, amina y haluro en los complejos de platino(II) previos, para conseguir la sustitución selectiva y, por tanto, el control de la estereoquímica.

2.1.4.1. Compuestos *trans*-[PtCl₂(amina)(PPh₃)]

Una vez se ha obtenido el complejo *trans*-[Pt₂Cl₂(μ-Cl)₂(PPh₃)₂] es necesaria la ruptura de los puentes cloro, para la obtención los complejos de fórmula general *trans*-[PtCl₂(amina)(PPh₃)], con la adición de la cantidad estequiométrica de la amina correspondiente.

Los complejos de fórmula general *trans*-[PtCl₂(amina)(PPh₃)] se sintetizan y purifican por el método de Chatt con variaciones:¹² A una suspensión de 0.150 mmol de *trans*-[Pt₂Cl₂(μ-Cl)₂(PPh₃)₂] en acetona, se añaden 2 equivalentes de la amina correspondiente. Se mantiene en agitación durante 30 min a temperatura ambiente, obteniéndose una disolución amarilla. A continuación se elimina la acetona bajo presión reducida y se añade éter dietílico, donde los compuestos *trans*-[PtCl₂(amina)(PPh₃)] son solubles, dando una disolución amarilla. La disolución se filtra para eliminar las impurezas insolubles. Por último, se forma un precipitado amarillo cristalino al eliminar el disolvente a temperatura ambiente o bajo presión reducida.

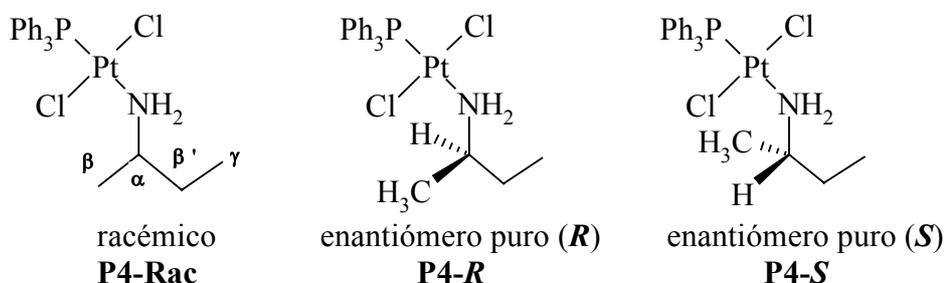
trans-[PtCl₂(isopropilamina)(PPh₃)], **P3**



Sólido amarillo. Rendimiento: 90%. P.f.: 211- 212 °C. Análisis químico calculado para: C₂₁H₂₄NCl₂PPt: C: 42.94%, H: 4.12%, N: 2.38%. Encontrado: C: 42.90%, H:

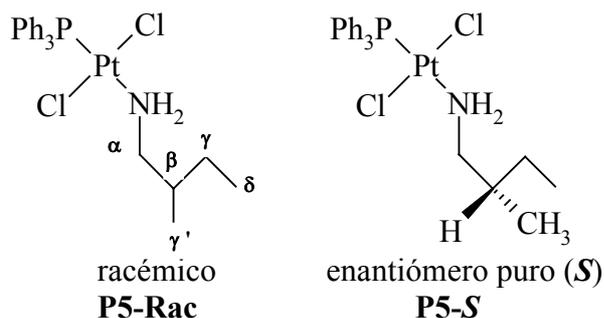
4.16%, N: 2.42%. Datos de IR ver tabla 2.3. Datos de RMN ver tabla 2.8 y 2.9. Difracción de R-X ver tablas 2.21, 2.22 y 2.23.

trans-[PtCl₂(L)(PPh₃)], **P4**. L = 1-metilpropilamina: racémico, *R* y *S*



Sólidos amarillos. Rendimientos: 72 % (complejo **P4-Rac**), 61 % (complejo **P4-R**) y 50 % (complejo **P4-S**). P.f.: 162-164. Análisis químico calculado para: C₂₂H₂₆NCl₂Pt: C: 43.9%, H: 4.35%, N: 2.33%. Encontrado: C: 43.76%, H: 4.12%, N: 2.24%. [α]_D²⁰: -48,4 (complejo **P4-R**), [α]_D²⁰: +48,4 (complejo **P4-S**). Datos de IR ver tabla 2.3. Datos de RMN ver tabla 2.10, 2.11 y 2.12. Difracción de R-X ver tablas de la 2.24 a la 2.28.

trans-[PtCl₂(L)(PPh₃)], **P5**. L = 2-metilbutilamina: racémico y *S*



Sólidos amarillos. Rendimientos: 70% (complejo **P5-Rac**) y 65% (complejo **P5-S**). P.f.: 139-140 °C. Análisis químico calculado para: C₂₃H₂₈NCl₂Pt: C: 44.8%, H: 4.58%, N: 2.27%. Encontrado: C: 44.70%, H: 4.53%, N: 2.29%. Datos de IR ver tabla 2.3. Datos de RMN ver tabla 2.10, 2.11 y 2.12. Difracción de R-X ver tablas de la 2.29 a la 2.33.

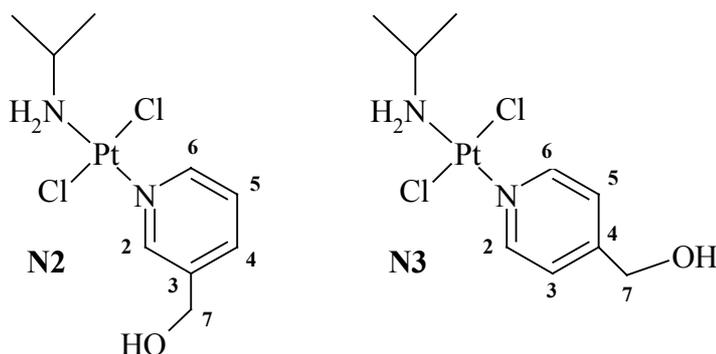
2.1.4.2. Compuestos *trans*-[PtCl₂(amina)(amina')]

La síntesis de los compuestos *trans*-[PtCl₂(amina)(amina')] se lleva a cabo usando el diferente efecto *trans* de los ligandos amina y cloruro en los complejos de platino(II), para conseguir la sustitución selectiva.

trans-[PtCl₂(isopropilamina)(3-hidroximetilpiridina)], **N2**

trans-[PtCl₂(isopropilamina)(4-hidroximetilpiridina)], **N3**

A una suspensión de *cis*-[PtCl₂(isopropilamina)₂], **N1**, (150 mg, 0.39 mmol) en agua (3 mL) se le añaden 4 equivalentes de 3-hidroximetilpiridina (170 mg, 1.56 mmol) o 2 equivalentes de 4-hidroximetilpiridina (85 mg, 0.78 mmol). La mezcla se mantiene con agitación a una temperatura de 85 °C durante aproximadamente 24 horas, hasta que la mezcla de reacción cambia a una disolución ligeramente amarilla. Se enfría la disolución a temperatura ambiente, se añade en exceso HCl concentrado (0.5 ml, ~12 equivalentes) y se mantiene de nuevo a una temperatura de 85 °C con agitación durante 48 h. Después de este tiempo se deja enfriar a temperatura ambiente, observándose la aparición de cristales amarillos. Para mejorar el rendimiento la disolución restante se concentra, en el rotavapor, obteniendo más precipitado de color amarillo que se recrystaliza en CHCl₃ y posteriormente en agua a baja temperatura. El sólido amarillo, *trans*-[PtCl₂(isopropilamina)(L)], se lava finalmente con agua fría y éter etílico.



N2: *trans*-[PtCl₂(isopropilamina)(3-hidroximetilpiridina)]. Sólido amarillo. Rendimiento: 30%. Análisis químico calculado para C₉H₁₆ON₂Cl₂Pt: C: 24.89%, H: 3.71%, N: 6.45%. Encontrado: C: 24.73%, H: 3.72%, N: 6.49. Datos de IR ver tabla 2.4.

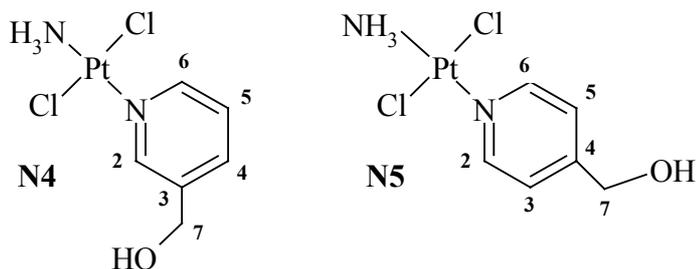
Datos de RMN ver tabla 2.13, 2.14 y 2.15. Difracción de R-X ver tablas 2.34, 2.35 y 2.36.

N3: *trans*-[PtCl₂(isopropilamina)(4-hidroximetilpiridina)]. Sólido amarillo. Rendimiento: 38%. Análisis químico calculado para C₉H₁₆ON₂Cl₂Pt: C: 24.89%, H: 3.71%, N: 6.45%. Encontrado: C: 24.82%, H: 3.72%, N: 6.47%. Datos de IR ver tabla 2.4. Datos de RMN ver tabla 2.13, 2.14 y 2.15. Difracción de R-X ver tablas 2.37, 2.38 y 2.39.

trans-[PtCl₂(NH₃)(3-hidroximetilpiridina)], **N4**

trans-[PtCl₂(NH₃)(4-hidroximetilpiridina)], **N5**

Una suspensión de *cis*-DDP (150 mg, 0.498 mmol) en agua (3 ml) se trata con 4 equivalentes de 3-hidroximetilpiridina (217 mg, 1.99 mmol) o 2 equivalentes de 4-hidroximetilpiridina (108 mg, 0.996 mmol). La mezcla se agita a 85 °C durante 48 h, hasta tener una disolución ligeramente amarilla. Se enfría la disolución a temperatura ambiente, se añade en exceso HCl concentrado (0.5 ml, ~12 equivalentes), se mantiene a una temperatura de 85 °C con agitación durante 48 h. A continuación se deja enfriar la disolución a temperatura ambiente y se elimina el agua en el rotavapor. El precipitado amarillo que se forma, se disuelve en EtOH y se filtra para eliminar impurezas. Una vez eliminado el EtOH se redisuelve en agua caliente obteniendo un precipitado amarillo cristalino después de su almacenamiento a baja temperatura. Se filtra y se seca con éter etílico.



N4: *trans*-[PtCl₂(NH₃)(3-hidroximetilpiridina)]. Rendimiento: 34%. Análisis químico calculado para C₆H₁₀ON₂Cl₂Pt: C: 18.37%, H: 2.57%, N: 7.14%. Encontrado: C: 18.63%, H: 2.73%, N: 7.19%. Datos de IR ver tabla 2.4. Datos de RMN ver tabla 2.16, 2.17 y 2.18.

N5: *trans*-[PtCl₂(NH₃)(4-hidroximetilpiridina)]. Rendimiento: 30%. Análisis químico calculado para C₆H₁₀ON₂Cl₂Pt: C: 18.37%, H: 2.57%, N: 7.14%. Encontrado: C: 18.81%, H: 2.06%, N: 7.25%. Datos de IR ver tabla 2.4. Datos de RMN ver tabla 2.16, 2.17 y 2.18.

2.1.5. Caracterización estructural

2.1.5.1. Espectros de Infrarrojo

Esta técnica analítica permite discernir entre la geometría *cis* y *trans* de los complejos de Pt(II).

Según se deduce de la teoría de grupos, un complejo de geometría planocuadrada de fórmula general *cis*-[PtCl₂L₂] pertenece al grupo de simetría C_{2v}, el cual presenta los modos A₁ y B₁ activos en infrarrojo, tanto para la tensión Pt-Cl como para la tensión Pt-L. De este modo, la geometría *cis* puede ser confirmada por la aparición de dos bandas de tensión, asimétrica y simétrica, del enlace Pt-Cl.

Asimismo, los complejos planocuatros de fórmula general *trans*-[PtCl₂L₂] pertenecen al grupo D_{2h} el cual sólo presenta un modo activo en infrarrojo, tanto para la tensión Pt-Cl, como para la tensión Pt-L. En este caso la confirmación de la geometría *trans* consiste en la observación de una banda para la tensión Pt-Cl y otra para la tensión Pt-L.

Las bandas Pt-N y Pt-P no son siempre fáciles de ser diferenciadas del ruido o de otras bandas de los ligandos y, por tanto, ser asignadas con claridad en el espectro. Más significativas son las bandas que aparecen en la zona de 350 a 270 cm⁻¹, correspondientes a las vibraciones de tensión Pt-Cl que nos ayudan a deducir si un complejo es de geometría *cis* o *trans*, como se muestra en la figura 2.1.

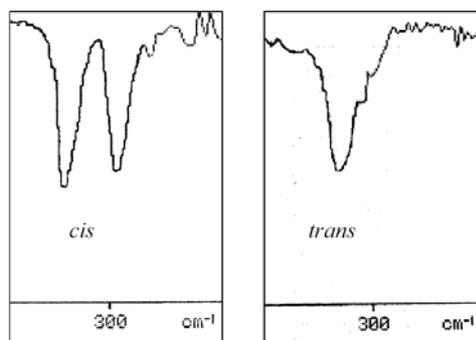


Figura 2.1: Bandas Pt-Cl para complejos *cis* y *trans*-[PtCl₂(PPh₃)₂].

Por lo tanto, en los compuestos descritos en el apartado 2.1.3.1. observamos los siguientes valores de frecuencia.

Compuesto	$\nu_{\text{Pt-Cl}}$	$\nu_{\text{Pt-L}}$
N1	322, 316	440 ^b
<i>cis</i> - DDP	328, 324	--- ^a
P1	317, 292	464, 445

Tabla 2.1: Frecuencias $\nu_{\text{Pt-Cl}}$ de IR (cm^{-1}) de los compuestos *cis* de partida. ^a: no apreciable; ^b: banda ancha.

En el caso del complejo *trans*- $[\text{Pt}_2\text{Cl}_2(\mu\text{-Cl})_2(\text{PPh}_3)_2]$, **D1**, (figura 2.2), es posible asignar dos bandas $\nu(\text{Pt-Cl})_{\mu}$ y $\nu(\text{Pt-Cl})_{\mu'}$ correspondientes a la tensión de vibración Pt-Cl puente con un ligando fosfina o un ligando Cl^- terminal en *trans* respectivamente. Además, es posible ver la banda $\nu(\text{Pt-Cl})_{\tau}$ correspondiente a la tensión de vibración Pt-Cl terminal.^{13,14} Como se puede observar en la tabla 2.2, las frecuencias de vibración $\nu(\text{Pt-Cl})_{\mu}$ y $\nu(\text{Pt-Cl})_{\mu'}$ son más bajas que la frecuencia de vibración $\nu(\text{Pt-Cl})_{\tau}$.¹⁵

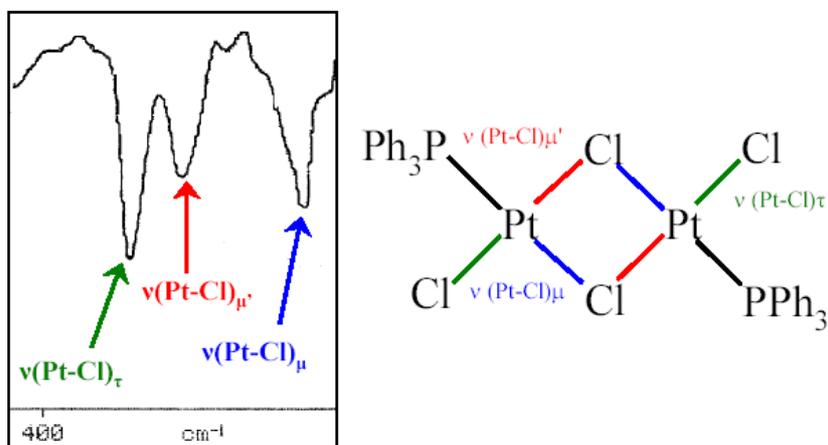


Figura 2.2: Diferentes bandas Pt-Cl asignables a *trans*- $[\text{Pt}_2\text{Cl}_2(\mu\text{-Cl})_2(\text{PPh}_3)_2]$, **D1**.

Compuesto	$\nu(\text{Pt-Cl})_{\mu}$	$\nu(\text{Pt-Cl})_{\mu'}$	$\nu(\text{Pt-Cl})_{\tau}$
D1	260	321	355

Tabla 2.2: Frecuencias de IR (cm^{-1}) del compuesto dímero.

Los compuestos de fórmula general *trans*- $[\text{PtCl}_2(\text{amina})(\text{PPh}_3)]$ presentan, como predice la teoría de grupos y se muestra, como ejemplo, en la siguiente figura, una

banda para la tensión $\nu(\text{Pt-Cl})$, que se recoge en la tabla 2.3. Los complejos de fórmula general $\text{trans-}[\text{PtCl}_2(\text{amina})(\text{amina}')]]$ al pertenecer al grupo de simetría D_{2h} , también presentan una sola banda para la tensión $\nu(\text{Pt-Cl})$ (tabla 2.4).

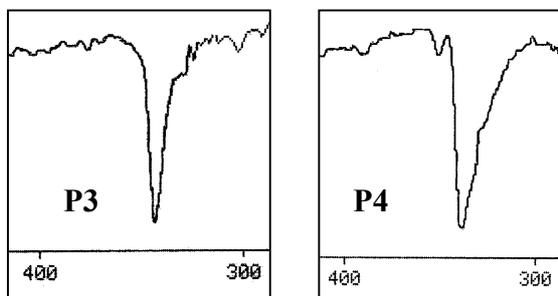


Figura 2.3: Tensión $\nu(\text{Pt-Cl})$ para los complejos P3 y P4.

Aunque han sido asignadas las bandas Pt-N y Pt-P, sólo se tendrán en cuenta las bandas Pt-Cl para la asignación de la geometría, ya que son las más útiles para diferenciar los isómeros *cis* o *trans*.

Compuestos	$\nu_{\text{Pt-Cl}}$	$\nu_{\text{Pt-P}}$	$\nu_{\text{Pt-N}}$
P3	344	453	428
P4	346	449	430
P5	340	453	432

Tabla 2.3: Frecuencias de IR (cm^{-1}) de los compuestos $\text{trans-}[\text{PtCl}_2(\text{amina})(\text{PPh}_3)]$ en la zona de 500-300 cm^{-1} .

Compuestos	$\nu_{\text{Pt-Cl}}$	$\nu_{\text{Pt-N}}$
N2	340	444 ^b
N3	339	443 ^b
N4	338	--- ^a
N5	339	440 ^b

Tabla 2.4: Frecuencias de IR (cm^{-1}) de los compuestos $\text{trans-}[\text{PtCl}_2(\text{amina})(\text{amina}')]]$ en la zona de 500-300 cm^{-1} . ^a: no apreciable; ^b: banda ancha.

2.1.5.2. Resonancia Magnética Nuclear

Aunque mediante esta técnica no es posible discernir si el compuesto sintetizado es *cis* o *trans*, es una técnica imprescindible ya que con ella podemos conocer el entorno de los distintos átomos que forman la molécula de interés. Además, nos muestra la pureza del compuesto.

Si se comparan los desplazamientos químicos de los distintos átomos en los ligandos libres con los desplazamientos químicos de los mismos átomos tras la coordinación al átomo de platino, se observa que las señales sufren un desapantallamiento tras la coordinación, los núcleos resuenan a frecuencias más altas (campos más bajos). Estos desplazamientos, así como la variación en las constantes de acoplamiento dependen de la distancia de los átomos con respecto al átomo de Pt.

2.1.5.2.1. Compuestos *cis* de partida

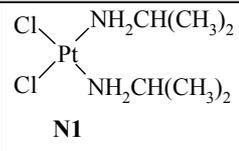
 N1	NH ₂	CH	(CH ₃) ₂
¹ H-RMN	4.75 sa, 2H	3.09 hp, 1H ³ J _{HC-NH} = 6.5	1.20 d, 6H; ³ J _{HC-NH} = 6.5
¹³ C-RMN	---	47.5 s	23.4 s

Tabla 2.5: ¹H-RMN y ¹³C-RMN del complejo *cis*-[PtCl₂(isopropilamina)₂] (N1) en DMSO-d₆. Constantes de acoplamiento (J) en Hz. Desplazamiento químico en ppm. sa = singlete ancho, s = singlete, d = doblete, hp = heptuplete.

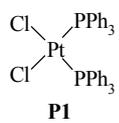
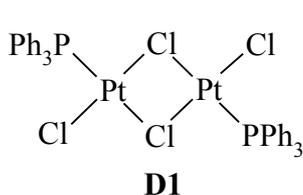
 P1	HC _{orto}	HC _{meta}	HC _{para}	C _{ipso}
¹ H-RMN	7.49 m, 12H	7.25 m, 12H	7.32 m, 6H	
¹³ C-RMN	114.28 s	120.85 s	117.29 s	--- ^a
³¹ P-RMN		14.81 J _{P-Pt} = 3673		
¹⁹⁵ Pt-RMN		-4720 d, J _{Pt-P} = 3684		

Tabla 2.6: ¹H-RMN, ¹³C-RMN, ³¹P-RMN y ¹⁹⁵Pt-RMN del complejo *cis*-[PtCl₂(PPh₃)₂] (P1) en DMSO-d₆. ^a: no se observa. Constantes de acoplamiento (J) en Hz. Desplazamiento químico en ppm. s = singlete; m = multiplete.

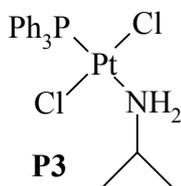
2.1.5.2.2. *trans*-[Pt₂Cl₂(μ-Cl)₂(PPh₃)₂]



D1	HC_{orto}	HC_{meta}	HC_{para}
¹ H-RMN	7.71 m, 12H	7.46 m, 12H	7.67 m, 6H
³¹ P-RMN		3.60	J _{P-Pt} = 4100
¹⁹⁵ Pt-RMN		-3827 d,	J _{Pt-P} = 4091

Tabla 2.7: ¹H-RMN, ³¹P-RMN y ¹⁹⁵Pt-RMN del complejo *trans*-[Pt₂Cl₂(μ-Cl)₂(PPh₃)₂] (**D1**) en acetonitrilo-d₃. Constantes de acoplamiento (J) en Hz. Desplazamiento químico en ppm. m = multiplete, d = doblete.

2.1.5.2.3. *Compuestos trans*-[PtCl₂(amina)(PPh₃)]

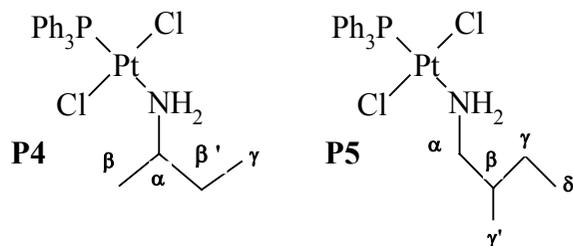


Compuesto	³¹ P-RMN	¹⁹⁵ Pt-RMN
P3	11.92 J _{P-Pt} = 3597	-3793 d, J _{P-Pt} = 3608

Tabla 2.8: ³¹P-RMN y ¹⁹⁵Pt-RMN del complejo **P3** en acetona-d₆. Constantes de acoplamiento (J) en Hz. Desplazamiento químico en ppm. d = doblete.

		CH_{orto}	CH_{meta}	CH_{para}	CH	CH₃	NH₂	C_{ipso}
¹ H-RMN	P3	7.70 m, 6H	7.44 m, 9H		3.59 hp, 1H ³ J _{H-H} = 6.5	1.39 d, 6H ³ J _{H-H} = 7	3.97 sa, 2H	---
¹³ C-RMN	P3	135.5 d, ² J _{C-P} = 10.2	128.6 d, ³ J _{C-P} = 11.1	131.4 d, ⁴ J _{C-P} = 2.4	47.1 s	24.5 s	---	130.4 d, J _{C-P} = 62.2

Tabla 2.9: ¹H-RMN y ¹³C-RMN del complejo **P3** en acetona-d₆. Constantes de acoplamiento (J) en Hz. Desplazamiento químico en ppm. sa = singlete ancho; d = doblete; m = multiplete; hp = heptuplete.



Compuesto	³¹ P-RMN	¹⁹⁵ Pt-RMN
P4	11.96 J _{P-Pt} = 3603	-3793 d, J _{P-Pt} = 3610
P5	11.96 J _{P-Pt} = 3598	-3803 d, J _{P-Pt} = 3625

Tabla 2.10: ³¹P-RMN y ¹⁹⁵Pt-RMN de los complejos **P4** y **P5** en acetona-d₆. Constantes de acoplamiento (J) en Hz. Desplazamiento químico en ppm. d = doblete.

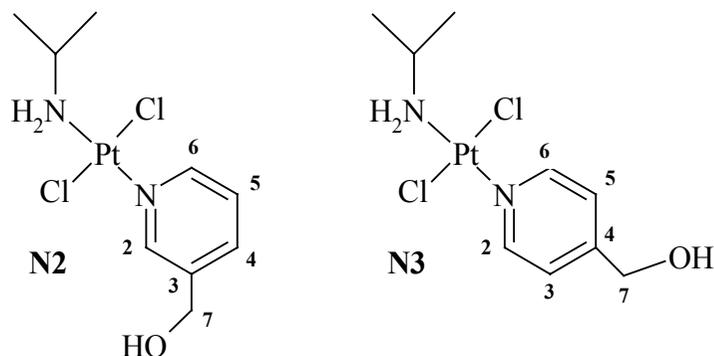
Compuesto	NH ₂	α-CH	β-CH ₃	β'-CH ₂	γ-CH ₃	CH _{orto}	CH _{meta}	CH _{para}	
P4	3.9 sa, 2H	3.36 m 1H	1.40 d 3H ³ J _{H-H} = 6.5	1.93 y 1.6 m, 2H	1.00 t, 3H ³ J _{H-H} = 7.5	7.70 m 6H	7.44 m, 9H		
Compuesto	NH ₂	α-CH ₂	β-CH	γ-CH ₂	γ'-CH ₃	δ-CH ₃	CH _{orto}	CH _{meta}	CH _{para}
P5	3.9 sa, 2H	3.0 y 2.8 m, 2H	1.98 m, 1H	1.3 y 1.6 m, 2H	1.02 d, 3H ³ J _{H-H} = 7.7	0.95 t, 3H ³ J _{H-H} = 7.4	7.70 m 6H	7.44 m, 9H	

Tabla 2.11: ¹H-RMN de los complejos **P4** y **P5** en acetona-d₆. Constantes de acoplamiento (J) en Hz. Desplazamiento químico en ppm. sa = singlete ancho; d = doblete; m = multiplete; t = triplete.

Compuesto	α-CH	β-CH ₃	β'-CH ₂	γ-CH ₃	CH _{ipso}	CH _{orto}	CH _{meta}	CH _{para}	
P4	52.33 s	21.32 s	31.50 s	10.44 s	130.37 d, J _{C-P} = 62	135.56 d, ² J _{C-P} = 10.3	128.64 d, ³ J _{C-P} = 11	131.47 d, ⁴ J _{C-P} = 2.6	
Compuesto	α-CH ₂	β-CH	γ-CH ₂	γ'-CH ₃	δ-CH ₃	CH _{ipso}	CH _{orto}	CH _{meta}	CH _{para}
P5	36.44 s	50.52 s	27.42 s	17.33 s	11.38 s	130.37 d, J _{C-P} = 62	135.56 d, ² J _{C-P} = 10.3	128.64 d, ³ J _{C-P} = 11	131.47 d, ⁴ J _{C-P} = 2.5

Tabla 2.12: ¹³C-RMN de los complejos **P4** y **P5** en acetona-d₆. Constantes de acoplamiento (J) en Hz. Desplazamiento químico en ppm. s = singlete, d = doblete.

2.1.5.2.4. Compuestos *trans*-[PtCl₂(amina)(amina')]



Compuesto	¹⁹⁵ Pt-RMN
N2	-2091.7
N3	-2090.9

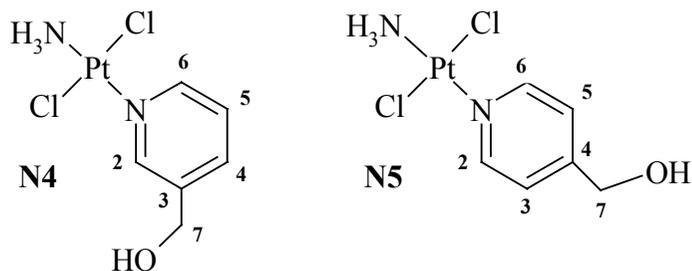
Tabla 2.13: ¹⁹⁵Pt-RMN de los complejos N2 y N3 en CDCl₃. Desplazamiento químico en ppm.

Compuesto	NH ₂	CH	CH ₃	2-CH	3-CH o 3-C	4-CH o 4-C	5-CH	6-CH	7-CH ₂	-OH
N2	3.52 sa, 2H	3.43 hp, 1H ³ J _{H-H} = 6.4	1.45 d, 6H ³ J _{H-H} = 6.4	8.89 s, 1H	---	7.79 d, 1H ³ J _{H-H} = 8.0	7.27 dd, 1H ³ J _{H-H} = 5.8 ³ J _{H-H} = 8.0	8.75 d, 1H ³ J _{H-H} = 5.8	4.72 d, 2H ³ J _{HC-OH} = 6.03	2.08 t, 1H ³ J _{HC-OH} = 6.03
N3	3.48 sa, 2H	3.45 hp, 1H ³ J _{H-H} = 6.4	1.45 d, 6H ³ J _{H-H} = 6.4	8.78 m, 1H ³ J _{H-H} = 6.5	7.26 d, 1H ³ J _{H-H} = 6.5	---	7.26 d, 1H ³ J _{H-H} = 6.5	8.78 d, 1H ³ J _{H-H} = 6.5	4.76 d, 2H ³ J _{HC-OH} = 6.03	2.10 t, 1H ³ J _{HC-OH} = 6.03

Tabla 2.14: ¹H-RMN de los complejos N2 y N3 en CDCl₃. Constantes de acoplamiento (J) en Hz. Desplazamiento químico en ppm. sa = singlete ancho; d = doblete; m = multiplete; t = triplete; hp = heptuplete.

Compuesto	CH	CH ₃	2-CH	3-CH o 3-C	4-CH o 4-C	5-CH	6-CH	7-CH ₂
N2	48.99	23.99	151.70	138.48	136.49	124.91	152.20	61.57
N3	48.69	24.01	152.53	122.62	152.54	122.62	152.53	62.59

Tabla 2.15: ¹³C-RMN de los complejos N2 y N3 en CDCl₃. Desplazamiento químico en ppm. Todas las señales encontradas son singletes.



Compuesto	¹⁹⁵ Pt-RMN
N4	-2226
N5	-2228

Tabla 2.16: ¹⁹⁵Pt-RMN de los complejos N4 y N5 en D₂O. Desplazamiento químico en ppm.

Compuesto	NH ₃	2-CH	3-CH o 3-C	4-CH o 4-C	5-CH	6-CH	7-CH ₂	-OH
N4	3.73 sa, 3H	8.67 s, 1H	---	7.88 d, 1H ³ J _{H-H} = 7.8	7.42 dd, 1H ³ J _{H-H} = 5.8 ³ J _{H-H} = 7.7	8.60 d, 1H ³ J _{H-H} = 5.8	4.70 s, 2H	--- ^a
N5	3.71 sa, 3H	8.61 d, 2H ³ J _{H-H} = 6.7	7.39 d, 2H ³ J _{H-H} = 6.7	---	7.39 d, 2H ³ J _{H-H} = 6.7	8.61 d, 2H ³ J _{H-H} = 6.7	4.73 s, 2H	--- ^a

Tabla 2.17: ¹H-RMN de los complejos N4 y N5 en D₂O. Constantes de acoplamiento (J) en Hz. Desplazamiento químico en ppm. sa = singlete ancho; s = singlete d = doblete; dd = doblete de dobletes ^a: no se observa.

Compuesto	2-CH	3-CH o 3-C	4-CH o 4-C	5-CH	6-CH	7-CH ₂
N4	152.16	140.55	137.14	125.44	152.42	61.37
N5	153.56	123.00	155.45	122.89	153.14	62.44

Tabla 2.18: ¹³C-RMN de los complejos N4 y N5 en D₂O. Desplazamiento químico en ppm.

2.1.5.3. Difracción de Rayos-X

Compuesto **D1**: *trans*-[Pt₂Cl₂(μ-Cl)₂(PPh₃)₂]

Fórmula empírica	C ₃₆ H ₃₀ Cl ₄ P ₂ Pt ₂
Peso molecular	1056.53
Temperatura	100(2) K
Longitud de onda	1.54178 Å
Sistema cristalino	Monoclínico
Grupo espacial	P2 ₁ /c
Parámetros de la celdilla unidad	a = 10.6485(10) Å α = 90°. b = 16.9355(15) Å β = 100.600(3)°. c = 12.1092(11) Å γ = 90°.
Volumen	2146.5(3) Å ³
Z	2
Densidad (calculada)	2.004 Mg/m ³
Coefficiente de absorción	18.672 mm ⁻¹
F(000)	1232
Tamaño del cristal	0.006 x 0.006 x 0.003 mm ³
Rango de θ en la recogida de datos	4.22° a 71.39°.
Rango de h, k, l	-12 ≤ h ≤ 12, -20 ≤ k ≤ 20, -14 ≤ l ≤ 14
Reflexiones recogidas	15057
Reflexiones independientes	4066 [R(int) = 0.0569]
Total completado de θ = 71.39°	97.2 %
Corrección de absorción	Semi-empírica desde equivalentes
Método de refinamiento	Mínimos cuadrados en F ²
Datos / restricciones / parámetros	4066 / 0 / 235
Bondad del ajuste en F ²	0.981
Índices R finales [I > 2σ(I)]	R1 = 0.0307, wR2 = 0.0677
Índices R (todos los datos)	R1 = 0.0448, wR2 = 0.0728
Densidad residual mayor y menor	1.266 y -0.816 e.Å ⁻³

Tabla 2.19: Datos experimentales y de refinamiento estructural para el compuesto **D1**.

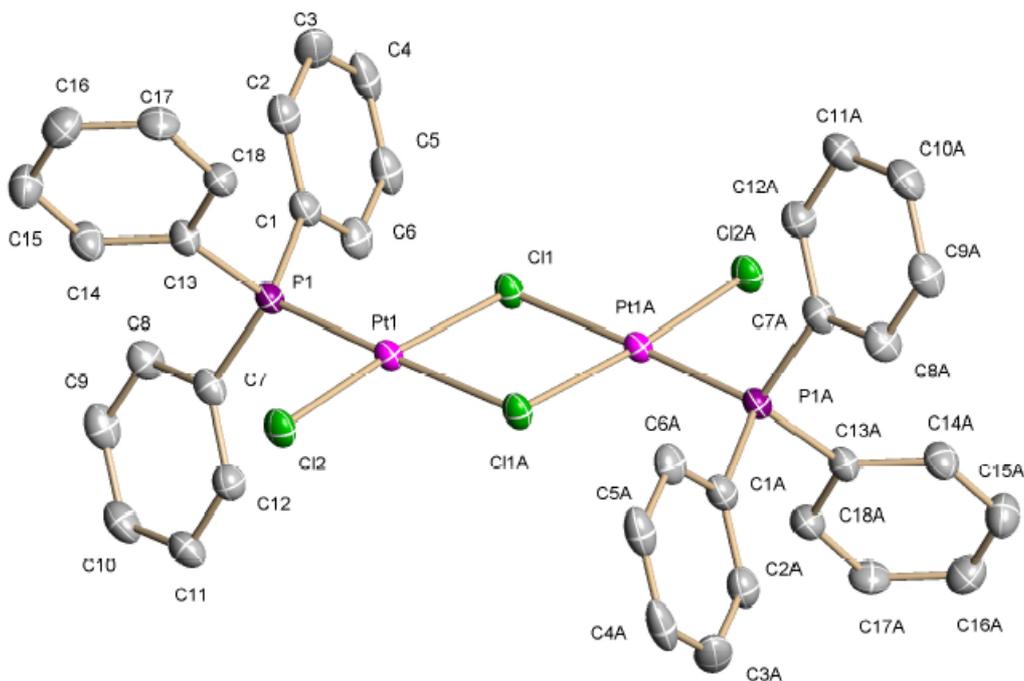


Figura 2.4: Diagrama ORTEP del compuesto *trans*-[Pt₂Cl₂(μ-Cl)₂(PPh₃)₂], **D1**.

Pt(1)-P(1)	2.2105(13)	P(1)-Pt(1)-Cl(2)	88.52(5)
Pt(1)-Cl(2)	2.2861(11)	P(1)-Pt(1)-Cl(1)	96.73(4)
Pt(1)-Cl(1)	2.3146(11)	Cl(2)-Pt(1)-Cl(1)	174.49(5)
Pt(1)-Cl(1A)#1	2.4058(12)	P(1)-Pt(1)-Cl(1A)#1	177.73(5)
Cl(1)-Pt(1A)#1	2.4058(12)	Cl(2)-Pt(1)-Cl(1A)#1	91.45(4)
Pt(1)···Pt(1A) #1	3.526	Cl(1)-Pt(1)-Cl(1A)#1	83.38(4)
		Pt(1)-Cl(1)-Pt(1A)#1	96.62(4)

Tabla 2.20: Distancias (Å) y ángulos (°) para el compuesto **D1**. Transformaciones de simetría usadas para generar átomos equivalentes: #1 -x+1,-y+2,-z.

Compuesto **P3**: *trans*-[PtCl₂(isopropilamina)(PPh₃)]

Fórmula empírica	C ₂₁ H ₂₄ NCl ₂ PPt
Peso Fórmula	587.37
Temperatura	100(2) K
Longitud de onda	1.54178 Å
Sistema cristalino	Triclínico
Grupo espacial	P-1
Parámetros de la celdilla unidad	a = 9.43590(10) Å α = 94.6760(10)°. b = 10.87710(10) Å β = 105.9090(10)°. c = 11.80650(10) Å γ = 112.72°.
Volumen	1050.701(17) Å ³
Z	2
Densidad (calculada)	1.857 Mg/m ³
Coefficiente de absorción	15.578 mm ⁻¹
F(000)	568
Tamaño del cristal	0.15 x 0.12 x 0.08 mm ³
Rango de θ en la recogida de datos	3.98° a 70.65°.
Rango de h, k, l	-11 ≤ h ≤ 11, -13 ≤ k ≤ 12, -14 ≤ l ≤ 14
Reflexiones recogidas	6750
Reflexiones independientes	3483 [R(int) = 0.0246]
Total completado de θ = 70.65°	86.2 %
Corrección de absorción	SADABS v. 2.03
Método de refinamiento	Mínimos cuadrados en F ²
Datos / restricciones / parámetros	3483 / 0 / 332
Bondad del ajuste en F ²	1.100
Índices R finales [I > 2σ(I)]	R1 = 0.0232, wR2 = 0.0606
Índices R (todos los datos)	R1 = 0.0235, wR2 = 0.0609
Densidad residual mayor y menor	1.606 y -1.581 e.Å ⁻³

Tabla 2.21: Datos experimentales y de refinamiento estructural para el compuesto **P3**.

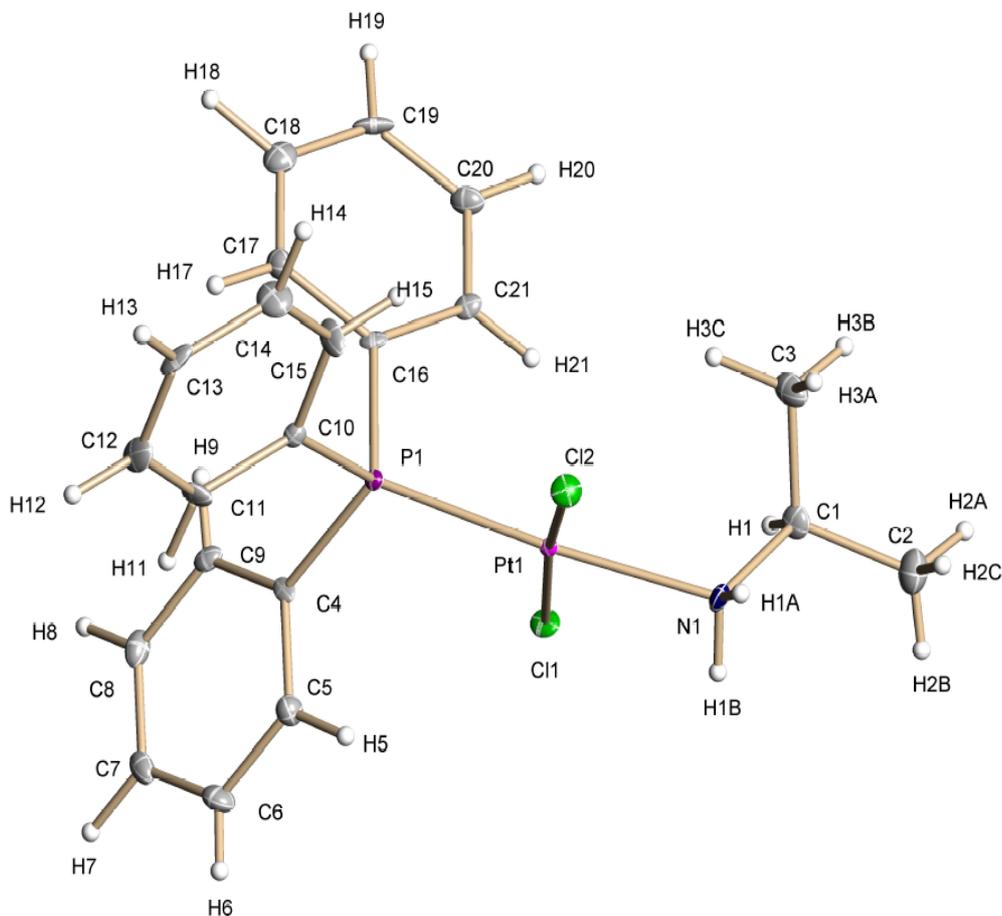


Figura 2.5: Diagrama ORTEP del compuesto *trans*-[PtCl₂(isopropilamina)(PPh₃)], **P3**.

Pt(1)-N(1)	2.127(3)	N(1)-Pt(1)-P(1)	173.94(10)
Pt(1)-P(1)	2.2396(9)	N(1)-Pt(1)-Cl(1)	88.13(11)
Pt(1)-Cl(1)	2.2949(9)	P(1)-Pt(1)-Cl(1)	89.33(3)
Pt(1)-Cl(2)	2.2990(9)	N(1)-Pt(1)-Cl(2)	86.61(11)
		P(1)-Pt(1)-Cl(2)	96.30(3)
		Cl(1)-Pt(1)-Cl(2)	173.28(3)

Tabla 2.22: Distancias (Å) y ángulos (°) para el compuesto **P3**.

D-H...A	d(D-H)	d(H...A)	d(D...A)	∠(DHA)
N(1)-H(1B)...Cl(2)#1	0.87	2.67	3.465(4)	152

Tabla 2.23: Enlace de hidrógeno para el compuesto **P3**. Transformaciones de simetría usadas para generar átomos equivalentes: #1 -x+1, -y+2, -z+2.

Compuesto **P4-Rac**: *trans*-[PtCl₂(1-metilpropilamina)(PPh₃)]

Fórmula empírica	C ₂₂ H ₂₆ NCl ₂ PPt
Peso Fórmula	601.40
Temperatura	293(2) K
Longitud de onda	0.71069 Å
Sistema cristalino	Triclínico
Grupo espacial	P $\bar{1}$
Parámetros de la celdilla unidad	a = 9.7310(10) Å α = 94.08°. b = 11.0710(10) Å β = 106.8260(10)°. c = 12.0930(10) Å γ = 112.17°.
Volumen	1130.68(18) Å ³
Z	2
Densidad (calculada)	1.766 Mg/m ³
Coefficiente de absorción	6.519 mm ⁻¹
F(000)	584
Tamaño del cristal	0.1 x 0.1 x 0.2 mm ³
Rango de θ en la recogida de datos	2.42° a 24.99 °.
Rango de h, k, l	0 ≤ h ≤ 11, -13 ≤ k ≤ 12, -14 ≤ l ≤ 13
Reflexiones recogidas	5329
Reflexiones independientes	3170 [R(int) = 0.0216]
Corrección de absorción	Semi-empírica desde equivalentes
Método de refinamiento	Mínimos cuadrados en F ²
Datos / restricciones / parámetros	3170/18/286
Bondad del ajuste en F ²	1.084
Índices R finales [I > 2σ(I)]	R1 = 0.0425, wR2 = 0.1074
Índices R (todos los datos)	R1 = 0.0463, wR2 = 0.1117
Densidad residual mayor y menor	0.848 y -0.874 e.Å ⁻³

Tabla 2.24: Datos experimentales y de refinamiento estructural para el compuesto **P4-Rac**.

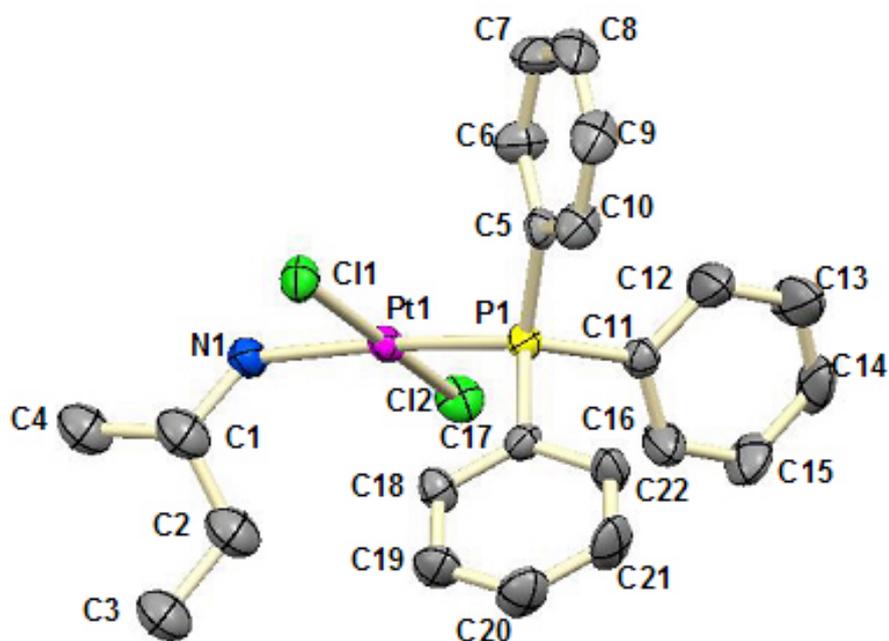


Figura 2.6: Diagrama ORTEP del compuesto *trans*-[PtCl₂(1-metilpropilamina)(PPh₃)], **P4-Rac**.

Pt(1)-N(1)	2.144(8)	N(1)-Pt(1)-P(1)	173.5(3)
Pt(1)-P(1)	2.243(2)	N(1)-Pt(1)-Cl(1)	87.0(3)
Pt(1)-Cl(1)	2.295(3)	P(1)-Pt(1)-Cl(1)	96.26(9)
Pt(1)-Cl(2)	2.287(3)	N(1)-Pt(1)-Cl(2)	87.0(3)
		P(1)-Pt(1)-Cl(2)	90.06(9)
		Cl(1)-Pt(1)-Cl(2)	172.72(9)

Tabla 2.25: Distancias (Å) y ángulos (°) para el compuesto **P4-Rac**.

D-H...A	d(D-H)	d(H...A)	d(D...A)	<(DHA)
N(1)-H(1A)...Cl(1)#1	0.86	2.67	3.496(9)	160

Tabla 2.26: Enlace de hidrógeno para el compuesto **P4-Rac**. Transformaciones de simetría usadas para generar átomos equivalentes: #1 1-x, -y, 1-z.

Compuesto **P4-S**: *trans*-[PtCl₂(*S*-1-metilpropilamina)(PPh₃)]

Fórmula empírica	C ₂₂ H ₂₆ NCl ₂ PPt
Peso Fórmula	601.40
Temperatura	293(2) K
Longitud de onda	0.71069 Å
Sistema cristalino	Monoclínico
Grupo espacial	P2 ₁
Parámetros de la celdilla unidad	a = 9.2170(10) Å α = 90°. b = 13.7940(10) Å β = 95.107(10)°. c = 17.8690(10) Å γ = 90°.
Volumen	2262.8(3) Å ³
Z	4
Densidad (calculada)	1.765 Mg/m ³
Coefficiente de absorción	6.515 mm ⁻¹
F(000)	1168
Tamaño del cristal	0.1 x 0.1 x 0.2 mm ³
Rango de θ en la recogida de datos	2.40° a 25.01 °.
Rango de h, k, l	0 ≤ h ≤ 10, 0 ≤ k ≤ 16, -21 ≤ l ≤ 21
Reflexiones recogidas	16358
Reflexiones independientes	3747 [R(int) = 0.0385]
Corrección de absorción	Semi-empírica desde equivalentes
Método de refinamiento	Mínimos cuadrados en F ²
Datos / restricciones / parámetros	3747/ 1/487
Bondad del ajuste en F ²	1.083
Índices R finales [I > 2σ(I)]	R1 = 0.0300, wR2 = 0.0645
Índices R (todos los datos)	R1 = 0.0344, wR2 = 0.0676
Densidad residual mayor y menor	0.601 y -0.676 e.Å ⁻³

Tabla 2.27: Datos experimentales y de refinamiento estructural para el compuesto **P4-S**.

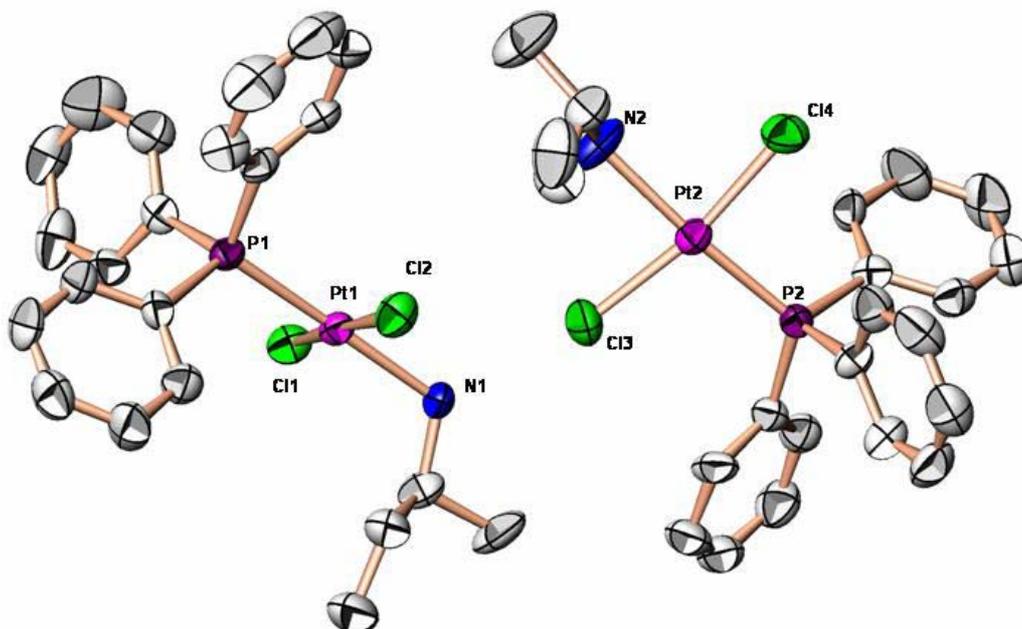


Figura 2.7: Diagrama ORTEP del compuesto *trans*-[PtCl₂(*S*-1-metilpropilamina)(PPh₃)], **P4-S**.

Pt(1)-N(1)	2.096 (11)	Pt(2)-N(2)	2.180 (12)
Pt(1)-P(1)	2.261 (3)	Pt(2)-P(2)	2.211 (3)
Pt(1)-Cl(1)	2.287 (3)	Pt(2)-Cl(3)	2.312 (3)
Pt(1)-Cl(2)	2.291 (3)	Pt(2)-Cl(4)	2.294 (3)
N(1)-Pt(1)-P(1)	177.3 (3)	N(2)-Pt(2)-P(2)	174.7 (4)
N(1)-Pt(1)-Cl(1)	87.8 (3)	N(2)-Pt(2)-Cl(3)	84.5 (4)
P(1)-Pt(1)-Cl(1)	94.35 (11)	P(2)-Pt(2)-Cl(3)	99.18 (12)
N(1)-Pt(1)-Cl(2)	87.3 (3)	N(2)-Pt(2)-Cl(4)	85.5 (4)
P(1)-Pt(1)-Cl(2)	90.55 (11)	P(2)-Pt(2)-Cl(4)	90.72 (13)
Cl(1)-Pt(1)-Cl(2)	174.62 (13)	Cl(3)-Pt(2)-Cl(4)	169.99 (14)

Tabla 2.28: Distancias (Å) y ángulos (°) para el compuesto **P4-S**.

Compuesto **P5-Rac**: *trans*-[PtCl₂(2-metilbutilamina)(PPh₃)]

Fórmula empírica	C ₂₃ H ₂₈ NCl ₂ PPt
Peso Fórmula	615.42
Temperatura	293(2) K
Longitud de onda	0.71069 Å
Sistema cristalino	Ortorrómbico
Grupo espacial	Pbn2 ₁
Parámetros de la celdilla unidad	a = 9.918(3) Å α = 90°.
	b = 25.172(6) Å β = 90°.
	c = 39.027(6) Å γ = 90°.
Volumen	9743(4) Å ³
Z	16
Densidad (calculada)	1.678 Mg/m ³
Coefficiente de absorción	6.054 mm ⁻¹
F(000)	4800
Tamaño del cristal	0.1 x 0.1 x 0.2 mm ³
Rango de θ en la recogida de datos	2.09° a 29.96°.
Rango de h, k, l	0 ≤ h ≤ 13, 0 ≤ k ≤ 35, -6 ≤ l ≤ 54
Reflexiones recogidas	15487
Reflexiones independientes	14315 [R(int) = 0.0280]
Total completado de θ = 29.96°	99.9 %
Corrección de absorción	Semi-empírica desde equivalentes
Método de refinamiento	Mínimos cuadrados en F ²
Datos / restricciones / parámetros	14315/ 83/865
Bondad del ajuste en F ²	0.748
Índices R finales [I > 2σ(I)]	R1 = 0.0382, wR2 = 0.0500
Índices R (todos los datos)	R1 = 0.0967, wR2 = 0.0910
Densidad residual mayor y menor	0.792 y -0.459 e.Å ⁻³

Tabla 2.29: Datos experimentales y de refinamiento estructural para el compuesto **P5-Rac**.

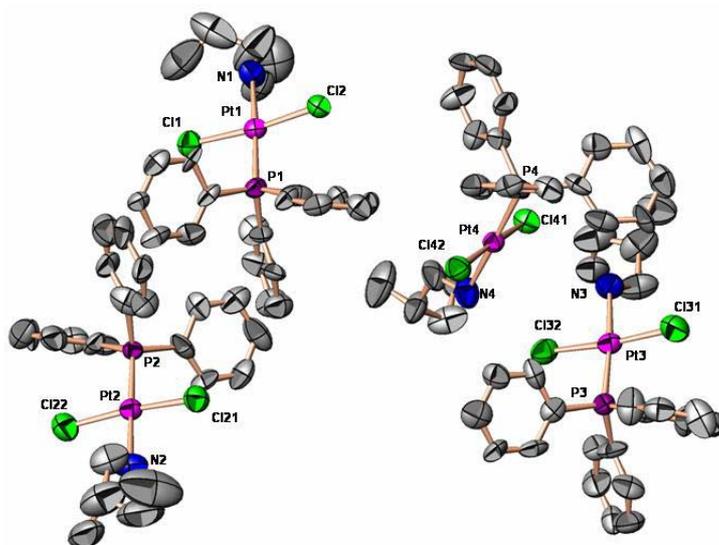


Figura 2.8: Diagrama ORTEP del compuesto *trans*-[PtCl₂(2-metilbutilamina)(PPh₃)], **P5**.

Pt1		Pt2	
Pt(1)-N(1)	2.167(2)	Pt(2)-N(2)	2.161(2)
Pt(1)-P(1)	2.249(6)	Pt(2)-P(2)	2.233(5)
Pt(1)-Cl(11)	2.316(6)	Pt(2)-Cl(21)	2.306(6)
Pt(1)-Cl(12)	2.272(6)	Pt(1)-Cl(22)	2.295(8)
N(1)-Pt(1)-P(1)	176.6(5)	N(2)-Pt(2)-P(2)	177.7(6)
N(1)-Pt(1)-Cl(11)	86.6(5)	N(2)-Pt(2)-Cl(21)	85.8(6)
P(1)-Pt(1)-Cl(11)	90.2(6)	P(2)-Pt(2)-Cl(21)	92.6(2)
N(1)-Pt(1)-Cl(12)	87.1 (5)	N(2)-Pt(2)-Cl(22)	86.5 (6)
P(1)-Pt(1)-Cl(12)	96.1(2)	P(2)-Pt(2)-Cl(22)	95.0(2)
Cl(11)-Pt(1)-Cl(12)	173.5(2)	Cl(21)-Pt(2)-Cl(22)	172.2(6)
Pt3		Pt4	
Pt(3)-N(3)	2.167(2)	Pt(4)-N(4)	2.150(2)
Pt(3)-P(3)	2.246(6)	Pt(4)-P(4)	2.225(5)
Pt(3)-Cl(31)	2.326(6)	Pt(4)-Cl(41)	2.315(6)
Pt(3)-Cl(32)	2.295(7)	Pt(4)-Cl(42)	2.301(6)
N(3)-Pt(3)-P(3)	174.7(5)	N(4)-Pt(4)-P(4)	178.4(5)
N(3)-Pt(3)-Cl(31)	83.1(5)	N(4)-Pt(4)-Cl(41)	88.1(5)
P(3)-Pt(3)-Cl(31)	91.6(2)	P(4)-Pt(4)-Cl(41)	90.9(2)
N(3)-Pt(3)-Cl(32)	90.0 (5)	N(4)-Pt(4)-Cl(42)	85.8 (5)
P(3)-Pt(3)-Cl(32)	95.2(2)	P(4)-Pt(4)-Cl(42)	95.2(2)
Cl(31)-Pt(3)-Cl(32)	173.3(2)	Cl(41)-Pt(4)-Cl(42)	174.0(2)

Tabla 2.30: Distancias (Å) y ángulos (°) para el compuesto **P5-Rac**.

Compuesto **P5-S**: *trans*-[PtCl₂(*S*-2-metilbutilamina)(PPh₃)]

Fórmula empírica	C ₂₃ H ₂₈ NCl ₂ PPt
Peso Fórmula	615.42
Temperatura	100(2) K
Longitud de onda	1.54178 Å
Sistema cristalino	Monoclínico
Grupo espacial	P2 ₁
Parámetros de la celdilla unidad	a = 9.46800(10) Å α = 90°. b = 24.8419(3) Å β = 91.3400(10)°. c = 9.85810(10) Å γ = 90°.
Volumen	2318.02(4) Å ³
Z	4
Densidad (calculada)	1.763 Mg/m ³
Coefficiente de absorción	14.153 mm ⁻¹
F(000)	1200
Tamaño del cristal	0.10 x 0.06 x 0.04 mm ³
Rango de θ en la recogida de datos	3.56° a 66.43°.
Rango de h, k, l	-10 ≤ h ≤ 11, -29 ≤ k ≤ 28, -11 ≤ l ≤ 11
Reflexiones recogidas	11075
Reflexiones independientes	6119 [R(int) = 0.0383]
Total completado de θ = 66.43°	94.9 %
Corrección de absorción	SADABS v. 2.03
Método de refinamiento	Mínimos cuadrados en F ²
Datos / restricciones / parámetros	6119 / 1 / 509
Bondad del ajuste en F ²	1.047
Índices R finales [I > 2σ(I)]	R1 = 0.0612, wR2 = 0.1522
Índices R (todos los datos)	R1 = 0.0627, wR2 = 0.1539
Densidad residual mayor y menor	5.674 y -2.578 e.Å ⁻³

Tabla 2.31: Datos experimentales y de refinamiento estructural para el compuesto **P5-S**.

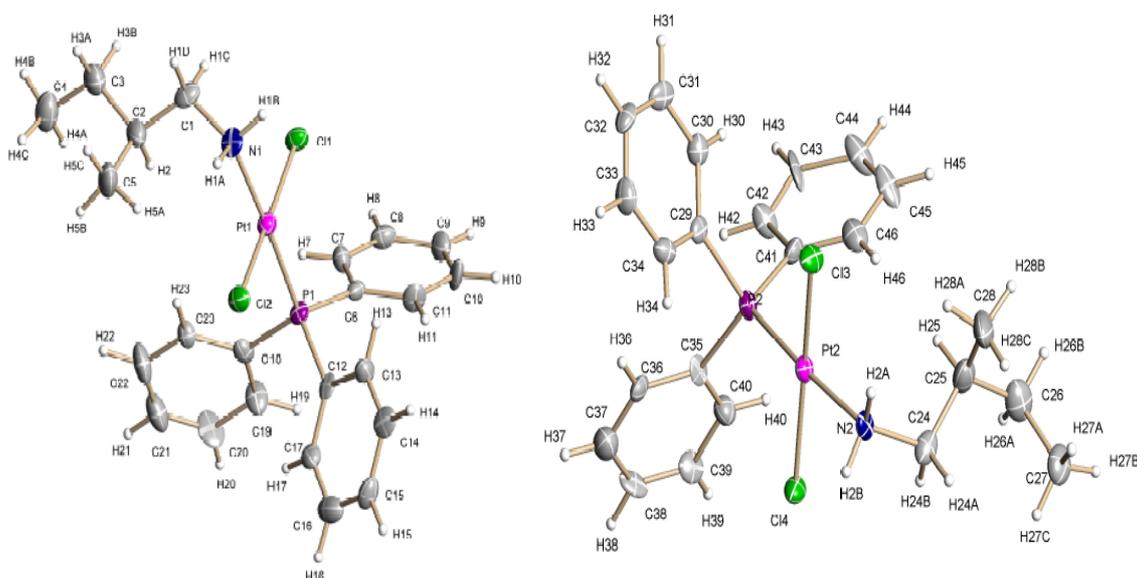


Figura 2.9: Diagrama ORTEP del compuesto *trans*-[PtCl₂(*S*-2-metilbutilamina)(PPh₃)], **P5-S**.

Pt(1)-N(1)	2.116(12)	Pt(2)-N(2)	2.104(12)
Pt(1)-P(1)	2.239(3)	Pt(2)-P(2)	2.229(4)
Pt(1)-Cl(1)	2.292(3)	Pt(2)-Cl(3)	2.300(4)
Pt(1)-Cl(2)	2.303(3)	Pt(2)-Cl(4)	2.293(3)
N(1)-Pt(1)-P(1)	177.2(4)	N(2)-Pt(2)-P(2)	175.5(3)
N(1)-Pt(1)-Cl(1)	88.1(3)	N(2)-Pt(2)-Cl(3)	87.1(4)
P(1)-Pt(1)-Cl(1)	93.49(13)	P(2)-Pt(2)-Cl(3)	93.07(14)
N(1)-Pt(1)-Cl(2)	85.9(3)	N(2)-Pt(2)-Cl(4)	86.2(4)
P(1)-Pt(1)-Cl(2)	92.75(13)	P(2)-Pt(2)-Cl(4)	94.15(14)
Cl(1)-Pt(1)-Cl(2)	172.68(13)	Cl(3)-Pt(2)-Cl(4)	170.44(13)

Tabla 2.32: Distancias (Å) y ángulos (°) para el compuesto **P5-S**.

D-H...A	d(D-H)	d(H...A)	d(D...A)	<(DHA)
N(1)-H(1B)...Cl(3)#1	0.92	2.37	3.200(13)	149.7
N(2)-H(2B)...Cl(2)	0.92	2.39	3.263(12)	159.0

Tabla 2.33: Enlaces de hidrógeno para el compuesto **P5-S**. Transformaciones de simetría usadas para generar átomos equivalentes: #1 x, y, z-1.

Compuesto N2: *trans*-[PtCl₂(isopropilamina)(3-hidroximetilpiridina)]

Fórmula empírica	C ₉ H ₁₆ ON ₂ Cl ₂ Pt
Peso Fórmula	434.23
Temperatura	296(2) K
Longitud de onda	1.54178 Å
Sistema cristalino	Triclínico
Grupo espacial	P-1
Parámetros de la celdilla unidad	a = 7.07610(10) Å α = 78.0880(10)°. b = 8.46530(10) Å β = 76.2620(10)°. c = 12.03260(10) Å γ = 74.9680(10)°.
Volumen	668.086(14) Å ³
Z	2
Densidad (calculada)	2.159 Mg/m ³
Coefficiente de absorción	23.156 mm ⁻¹
F(000)	408
Tamaño del cristal	0.12 x 0.03 x 0.02 mm ³
Rango de θ en la recogida de datos	3.83° a 70.13°.
Rango de h, k, l	-7 ≤ h ≤ 8, -8 ≤ k ≤ 9, -14 ≤ l ≤ 14
Reflexiones recogidas	4292
Reflexiones independientes	2227 [R(int) = 0.0415]
Total completado de θ = 70.13°	87.3 %
Corrección de absorción	SADABS v. 2.03
Método de refinamiento	Mínimos cuadrados en F ²
Datos / restricciones / parámetros	2227 / 0 / 179
Bondad del ajuste en F ²	1.058
Índices R finales [I > 2σ(I)]	R1 = 0.0257, wR2 = 0.0653
Índices R (todos los datos)	R1 = 0.0264, wR2 = 0.0659
Densidad residual mayor y menor	2.043 y -0.723 e.Å ⁻³

Tabla 2.34: Datos experimentales y de refinamiento estructural para el compuesto N2.

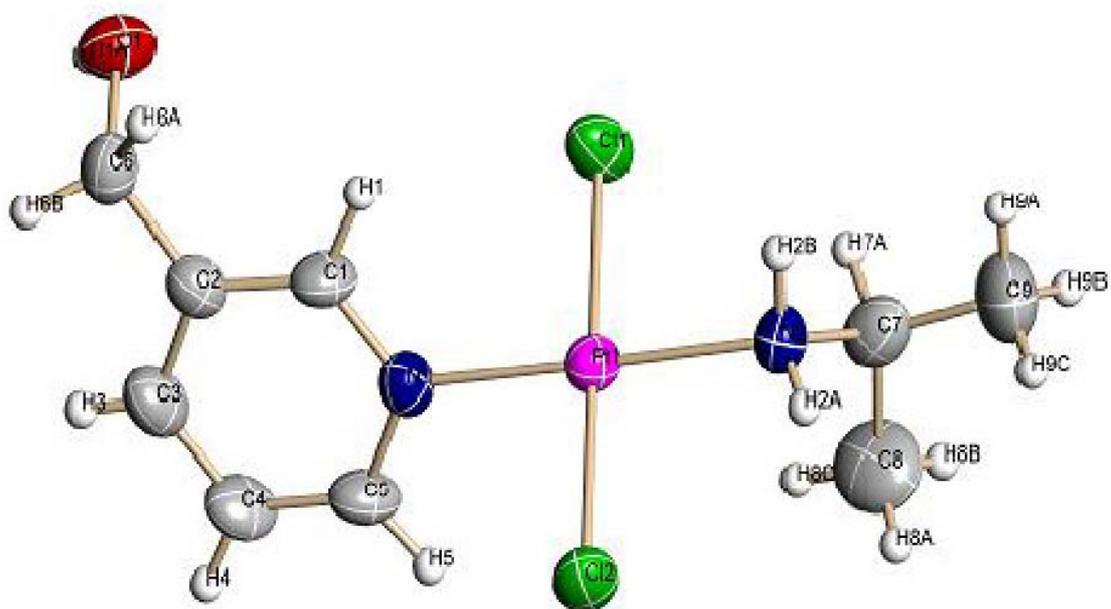


Figura 2.10: Diagrama ORTEP del compuesto *trans*-[PtCl₂(isopropilamina)(3-hidroximetilpiridina)], N2.

Pt(1)-N(1)	2.027(5)	N(1)-Pt(1)-N(2)	178.63(15)
Pt(1)-N(2)	2.067(5)	N(1)-Pt(1)-Cl(1)	89.76(13)
Pt(1)-Cl(1)	2.3044(13)	N(2)-Pt(1)-Cl(1)	89.88(15)
Pt(1)-Cl(2)	2.2936(13)	N(1)-Pt(1)-Cl(2)	90.05(13)
		N(2)-Pt(1)-Cl(2)	90.31(15)
		Cl(1)-Pt(1)-Cl(2)	179.75(4)

Tabla 2.35: Distancias (Å) y ángulos (°) para el compuesto N2.

D-H...A	d(D-H)	d(H...A)	d(D...A)	<(DHA)
O(1)-H(1A)...Cl(1)#1	0.73	2.56	3.241(5)	157
N(2)-H(2A)...Cl(2)#2	0.82	2.72	3.521(5)	164
N(2)-H(2B)...O(1)#3	0.97	2.05	2.996(7)	165

Tabla 2.36: Enlaces de hidrógeno para el compuesto N2. Transformaciones de simetría usadas para generar átomos equivalentes: #1 -x+1, -y+1, -z+2 #2 -x, -y+1, -z+1 #3 -x, -y+1, -z+2.

Compuesto **N3**: *trans*-[PtCl₂(isopropilamina)(4-hidroximetilpiridina)]

Fórmula empírica	C ₉ H ₁₆ ON ₂ Cl ₂ Pt
Peso Fórmula	434.23
Temperatura	296(2) K
Longitud de onda	1.54178 Å
Sistema cristalino	Monoclínico
Grupo espacial	P2 ₁ /n
Parámetros de la celdilla unidad	a = 7.8879(2) Å α = 90°. b = 9.8851(2) Å β = 98.321(2)°. c = 17.5442(5) Å γ = 90°.
Volumen	1353.57(6) Å ³
Z	4
Densidad (calculada)	2.131 Mg/m ³
Coefficiente de absorción	22.858 mm ⁻¹
F(000)	816
Tamaño del cristal	0.11 x 0.09 x 0.05 mm ³
Rango de θ en la recogida de datos	5.10° a 70.53°.
Rango de h, k, l	-8 ≤ h ≤ 9, -11 ≤ k ≤ 12, -21 ≤ l ≤ 20
Reflexiones recogidas	8301
Reflexiones independientes	2442 [R(int) = 0.0349]
Total completado de θ = 70.53°	94.1 %
Corrección de absorción	SADABS v. 2.03
Método de refinamiento	Mínimos cuadrados en F ²
Datos / restricciones / parámetros	2442 / 0 / 140
Bondad del ajuste en F ²	1.191
Índices R finales [I > 2σ(I)]	R1 = 0.0354, wR2 = 0.0879
Índices R (todos los datos)	R1 = 0.0376, wR2 = 0.0891
Densidad residual mayor y menor	1.342 y -1.043 e.Å ⁻³

Tabla 2.37: Datos experimentales y de refinamiento estructural para el compuesto **N3**.

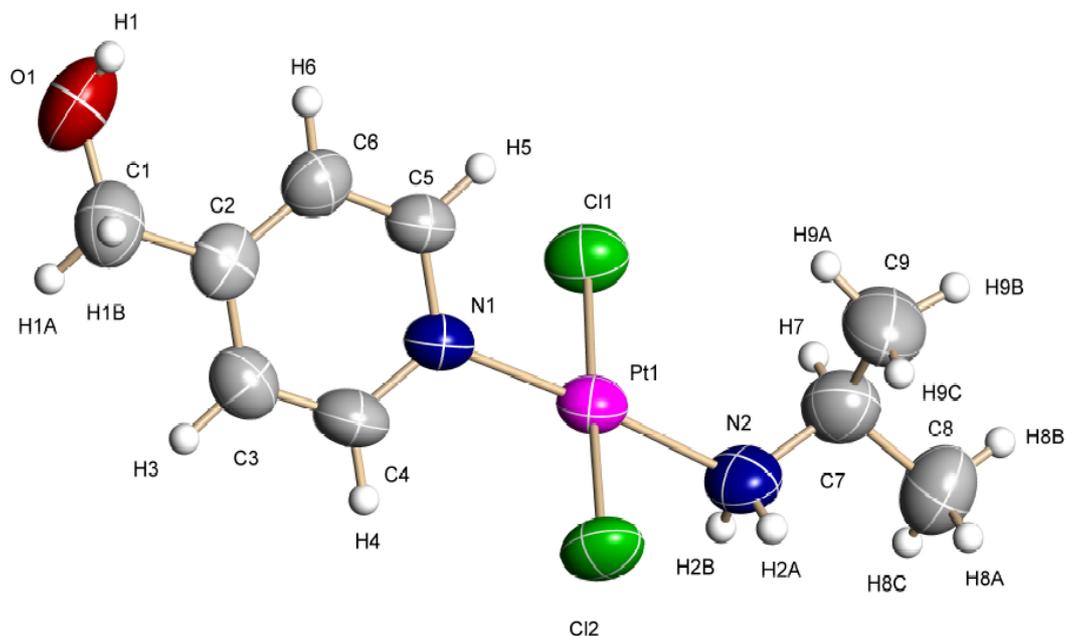


Figura 2.11: Diagrama ORTEP del compuesto *trans*-[PtCl₂(isopropilamina)(4-hidroximetilpiridina)], **N3**.

Pt(1)-N(1)	2.025(6)	N(1)-Pt(1)-N(2)	176.0(3)
Pt(1)-N(2)	2.058(7)	N(1)-Pt(1)-Cl(1)	89.79(17)
Pt(1)-Cl(1)	2.2958(19)	N(2)-Pt(1)-Cl(1)	92.7(2)
Pt(1)-Cl(2)	2.301(2)	N(1)-Pt(1)-Cl(2)	91.01(18)
		N(2)-Pt(1)-Cl(2)	86.6(2)
		Cl(1)-Pt(1)-Cl(2)	178.66(8)

Tabla 2.38: Distancias (Å) y ángulos (°) para el compuesto **N3**.

D-H...A	d(D-H)	d(H...A)	d(D...A)	<(DHA)
O(1)-H(1)...Cl(2)#1	0.82	2.41	3.223(9)	173.7
N(2)-H(2B)...Cl(1)#2	0.90	2.51	3.393(7)	165.5

Tabla 2.39: Enlaces de hidrógeno para el compuesto **N3**. Transformaciones de simetría usadas para generar átomos equivalentes: #1 $-x+1, -y+1, -z+2$ #2 $-x, -y, -z+2$.

2.2. ESTUDIOS BIOQUÍMICOS

La mayor parte de los estudios de citotoxicidad, así como los ensayos de citometría de flujo y microscopía confocal fueron llevados a cabo durante mi estancia de tres meses en el Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas en el grupo de investigación del Prof. Amancio Carnero.

2.2.1. Materiales utilizados

Los medios de cultivo, PBS, FCS y tripsina utilizados en los ensayos de citotoxicidad fueron suministrados por Sigma-Aldrich. Los disolventes y los tampones fueron suministrados por Sigma-Aldrich, Merk, Panreac, BDH.

Cisplatino, transplatino, glutation y DMS utilizados en los ensayos bioquímicos, fueron suministrados por Sigma-Aldrich. $[\text{PtCl}(\text{dien})]\text{Cl}$ fue suministrado por el Prof. G. Natile. Las disoluciones stock de los complejos de platino a la concentración de 0.5 mM en 10 mM de NaClO_4 fueron preparadas en la oscuridad a 25 °C.

CT-DNA (42% GpC, con una masa molecular aproximada de 20.000 kDa), fue preparado y caracterizado como se ha descrito previamente.¹⁶ Los plásmidos pSP73 (2464 bp) y pUC19 (2686 bp) fueron suministrados por Promega y fueron aislados acorde con el procedimiento estándar.¹⁷ Endonucleasas de restricción y kinasa polinucleótido fueron adquiridas de New England Biolabs. El fragmento Klenow de la enzima DNA polimerasa I se obtuvo de Boehringer-Mannheim Biochemica. Acrilamida, agarosa, bis(acrilamida), EtBr, urea, tiourea y NaCN fueron suministrados por Merck KgaA. Los productos radiactivos $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ y $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ fueron de Amersham.

Los reactivos utilizados en la técnica de microscopía confocal son los siguientes:

Anticuerpos Primarios y faloidina:

- Anti- β -actina monoclonal de ratón (Sigma).

- Anti- γ -tubulina monoclonal de ratón (Sigma).
- Anti- α -tubulina monoclonal de rata. Suministrado por gentileza del Dr. Guillermo de Carcer.
- Faloidina. No es un anticuerpo. Es un compuesto fluorescente (isotiocianato de tetrametil-rodamina) que permite la visualización del citoesqueleto de actina en las células fijadas. Suministrado por gentileza de Diego Megías.

Anticuerpos Secundarios y DAPI:

- IgG Anti-ratón 488 (Alexa Fluor).
- IgG Anti-rata 594 (Alexa Fluor). Suministrado por gentileza del Dr. Guillermo de Carcer.
- DAPI. (Sigma) No es un anticuerpo. Es un compuesto fluorescente (4',6-Diamidino-2-fenilindol) que permite visualizar el DNA debido a que se une de forma estequiométrica a la doble hélice.

2.2.2. Metodos experimentales de estudio

2.2.2.1. Líneas celulares y evaluación de la citotoxicidad

Se han utilizado una gran variedad de líneas celulares, tumorales y no tumorales, para poder tener una visión más amplia de la capacidad citotóxica de los complejos *trans* de platino que componen esta tesis. Las distintas características y orígenes de las líneas celulares utilizadas las describimos brevemente en la siguiente tabla:

Línea celular	Características
IMR90	Fibroblastos primarios de pulmón humano no transformados.
CH1	Carcinoma de ovario humano
CH1cisR	Línea celular CH1 pero con resistencia adquirida al cisplatino, debida principalmente a un aumento en la reparación-tolerancia de los aductos Pt-DNA.
A2780	Carcinoma de ovario
A2780cisR	Línea celular A2780 pero con resistencia adquirida, debida a la combinación de una disminución en la acumulación de Pt, aumento en la reparación-tolerancia de los aductos Pt-DNA y elevados niveles de GSH.
NCI-H460	Carcinoma de pulmón (NSCLC)
MCF-7	Carcinoma de mama
SF268	Glioblastoma (cerebro)
HCT 116	Carcinoma de colon. Líneas celulares isogénicas: p53 +/+ o -/-
CNIO-BC wt	Línea primaria humana. Tumor de nervio periférico. p53 +/+
CNIO-CE wt	Línea primaria humana. Rabdomiosarcoma. p53 +/+
CNIO-BP mut	Línea primaria humana. Osteosarcoma. p53 -/-
CNIO-BI mut	Línea primaria humana. Gist. p53 -/-
CNIO-AX mut	Línea primaria humana. Liposarcoma. p53 -/-
SW872	Liposarcoma humano. p53 -/-.

Tabla 2.40: Líneas celulares utilizadas.

Se han llevado a cabo dos protocolos diferentes en las distintas líneas celulares utilizadas para poder realizar una mejor selección de los complejos.

Uno de los protocolos utilizado es el basado en el compuesto de tetrazolio MTT (bromuro de 3-[4,5-dimetildiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio), el cual se reduce en presencia de las células vivas debido a la respiración oxidativa de la célula en las mitocondrias, dando lugar a una sal de formazán soluble en DMSO que se mide colorimétricamente.¹⁸ Normalmente, complejos que por el protocolo de MTT no muestran efectos biológicos a 24 horas, se consideran no citotóxicos.

Las células se plaquean en placas estériles de 96 pocillos, a una densidad de 10^4 células/pocillo en 100 μ L de medio y se incuban 24 horas a 37 °C en un incubador con 95% de aire y 5% de CO₂.

A continuación se añaden los compuestos de manera que la concentración final esté comprendida de 5 y 100 μ M, en un volumen de 200 μ L de medio/pocillo. 24 h después se añaden 50 μ L de una disolución recién preparada de MTT en medio de cultivo (1/5). La concentración final de MTT/pocillo debe ser de 1 mg/mL. Las placas se incuban durante 5 horas a 37 °C.

La cantidad de células supervivientes se evalúa midiendo la absorbancia a 520 nm, usando un Whittaker Microplate Reader 2001. Los valores de IC₅₀ se calculan a partir de gráficas de células supervivientes (%) frente a concentración de compuesto. Todos los experimentos se realizan por cuadruplicado.

El protocolo utilizado por nosotros en la mayoría de los ensayos de citotoxicidad es una adaptación del protocolo por cristal violeta usado en el NCI, cuantificándose colorimétricamente la presencia de células viables.

Las células que se encuentran creciendo en una placa, se recogen justo antes de hacerse confluyentes. Se cuentan usando un hemocitómetro y se diluyen con medio de cultivo para ajustar la concentración celular al número requerido de células por cada 200 μ L. Las células se siembran en placas de 96 pocillos, donde se ensayan los compuestos, a una densidad dependiendo del tamaño celular entre 10^3 y $4 \cdot 10^3$ células/pocillo. Las células se crecen 24 horas a 37 °C en un incubador con 95% de aire y 5% de CO₂.

Los compuestos se disuelven en DMSO o PBS, dependiendo de su solubilidad y estabilidad en estos disolventes, a una concentración de 10 mM o 5 mM. De aquí se prepara una placa madre con disoluciones en serie de hasta 200 veces la concentración final en el cultivo. En el caso de disolverse en DMSO, la concentración final de éste en el medio de cultivo celular no debe exceder del 0.5%, debido a que comenzaría a ser tóxico para las células.

Un volumen adecuado de la disolución del compuesto (generalmente 1-2 μ L) se añade automáticamente (Beckman FX 96 tip) al medio hasta alcanzar la concentración final para cada droga. Cada concentración se hace por triplicado.

Una serie de pocillos control se deja en cada placa conteniendo medio con la misma concentración de DMSO o PBS pero sin droga. Una segunda serie de pocillos control se deja con células no tratadas justo antes de la adición de las drogas (control de siembra, número de células con las que se empieza el cultivo).

Tras una exposición a la droga durante el tiempo deseado, dependiendo del experimento, las células se lavan dos veces con un tampón salino fosfato antes de ser fijadas con 10% de glutaraldehído. Las células fijadas se lavan dos veces más y se tiñen con cristal violeta 0.5% durante 30 min. Después se lavan exhaustivamente las placas y se mide la absorbancia a 595 nm en un aparato Biorad Model 550 Microplate Reader. Los datos obtenidos de absorbancia son analizados mediante el programa GraphPad Prism 4.00 para obtener el valor de IC₅₀ (figura 2.12).

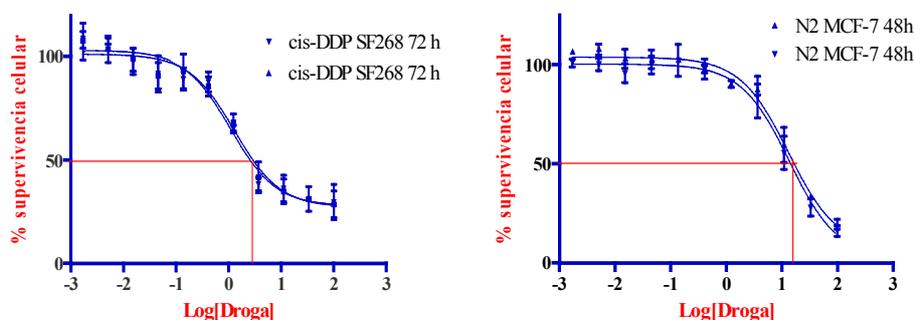


Figura 2.12: Ejemplo de datos analizados.

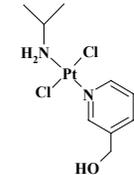
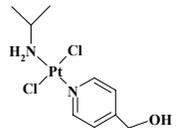
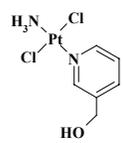
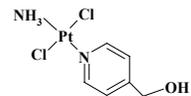
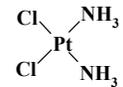
		CH1	CH1cisR	A2780	A2780cisR
N2		23.4	15.8	12.4	7.5
N3		20.1	15.9	11.6	8.4
N4		>100	>100	>100	>100
N5		>100	>100	>100	>100
<i>cis</i> -DDP		6	23	2.2	38

Tabla 2.41: Valores de IC₅₀ (μM) a 24 h mediante el protocolo de MTT. Desviación estándar ≤ ± 0.5.

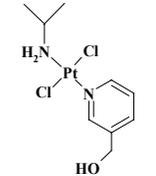
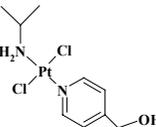
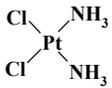
		IMR90	CH1	CH1cisR	A2780	A2780cisR
N2		10.8	4.7	5.4	9.4	8.3
N3		8.5	5.5	4.9	14.4	9.6
<i>cis</i> -DDP		--- ^a	2.1	18	0.5	13.6

Tabla 2.42: Valores de IC₅₀ (μM) a 96 h mediante el protocolo de Cristal Violeta. Desviación estándar ≤ ± 0.5. ^a: no determinado.

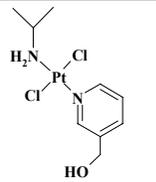
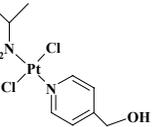
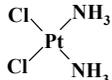
		NCI-H460				MCF-7				SF268			
		24 h	48 h	72 h	96 h	24 h	48 h	72 h	96 h	24 h	48 h	72 h	96 h
N2		46.6	22.8	13.8	10.9	18.4	13.3	6.9	10.0	76.9	14.2	6.4	4.0
N3		44.8	21.6	13.9	9.8	18.4	16.2	7.0	7.5	74.3	28.6	5.4	3.8
cis-DDP		7.3	2.0	1.1	4.2	68.1	54.4	14.7	5.6	26.8	3.0	1.3	1.0

Tabla 2.43: Valores de IC₅₀ (μM) a diferentes tiempos mediante el protocolo de Cristal Violeta. Desviación estándar ≤ ± 1.

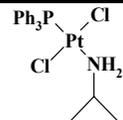
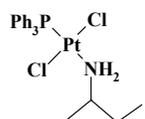
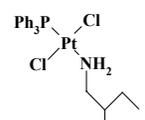
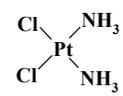
		IMR90	CH1	CH1cisR	A2780	A2780cisR
P3		6.3	1.5	1.0	7.6	7.9
P4-Rac		0.2	2.9	1.8	0.3	0.2
P5-Rac		1.8	2.8	1.8	2.4	2.5
cis-DDP		--- ^a	2.1	18	0.5	13.6

Tabla 2.44: Valores de IC₅₀ (μM) a 96 h mediante el protocolo de Cristal Violeta. Desviación estándar ≤ ± 0.5. ^a: no determinado.

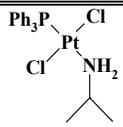
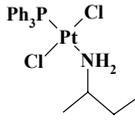
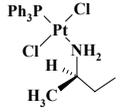
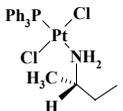
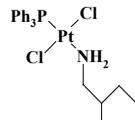
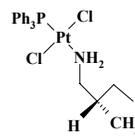
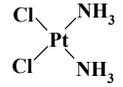
		NCI-H460	MCF-7	SF268
P3		2.8	1.2	1.5
P4-Rac		4.2	1.8	1.1
P4-R		3.7	1.7	0.5
P4-S		3.1	1.4	1.3
P5-Rac		7.8	2.7	1.7
P5-S		6.1	2.3	1.4
<i>cis</i> -DDP		4.2	5.6	1.1

Tabla 2.45: Valores de IC₅₀ (μM) a 96 h mediante el protocolo de Cristal Violeta. Desviación estándar ≤ ± 1.

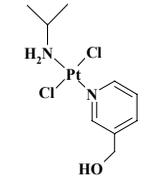
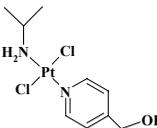
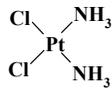
		HCT116 p53 +/+	HCT116 p53 -/-
N2		7.4	2.7
N3		5.8	4.9
cis-DDP		8.4	57.2

Tabla 2.46: Valores de IC₅₀ (μM) a 96 h mediante el protocolo de Cristal Violeta. Desviación estándar $\leq \pm 0.5$.

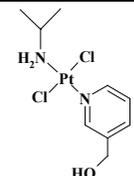
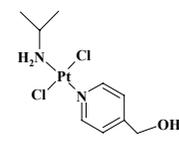
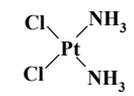
		CNIO-BC wt	CNIO-CE wt	CNIO-BP mut	CNIO-BI mut	CNIO-AX mut	SW872
N2		> 400	30.1	14.1	15	16.0	6.6
N3		12.0	75.0	7.0	12.1	16.0	6.7
cis-DDP		2.8	19.0	1.6	2.9	5.2	> 300

Tabla 2.47: Valores de IC₅₀ (μM) a 96 h mediante el protocolo de Cristal Violeta. Desviación estándar ≤ ± 1.

2.2.2.2. Citometría de Flujo

Como se mencionó en la introducción, el daño producido en el DNA por los complejos de platino culmina en la activación de los puntos de control del ciclo celular. Esta activación da lugar a parada del ciclo en distintos estadios, a partir de los cuales se podrá reparar el daño en el DNA o conducir a la célula a apoptosis.

Mediante la técnica de citometría de flujo es posible contar y diferenciar las células que se encuentran en las distintas fases del ciclo celular, así como las que han entrado en apoptosis.^{19,20} Las distintas fases del ciclo se pueden diferenciar debido a las distintas cantidades de DNA que presentan las diferentes poblaciones de células en cada fase (figura 2.13).^{21,22}

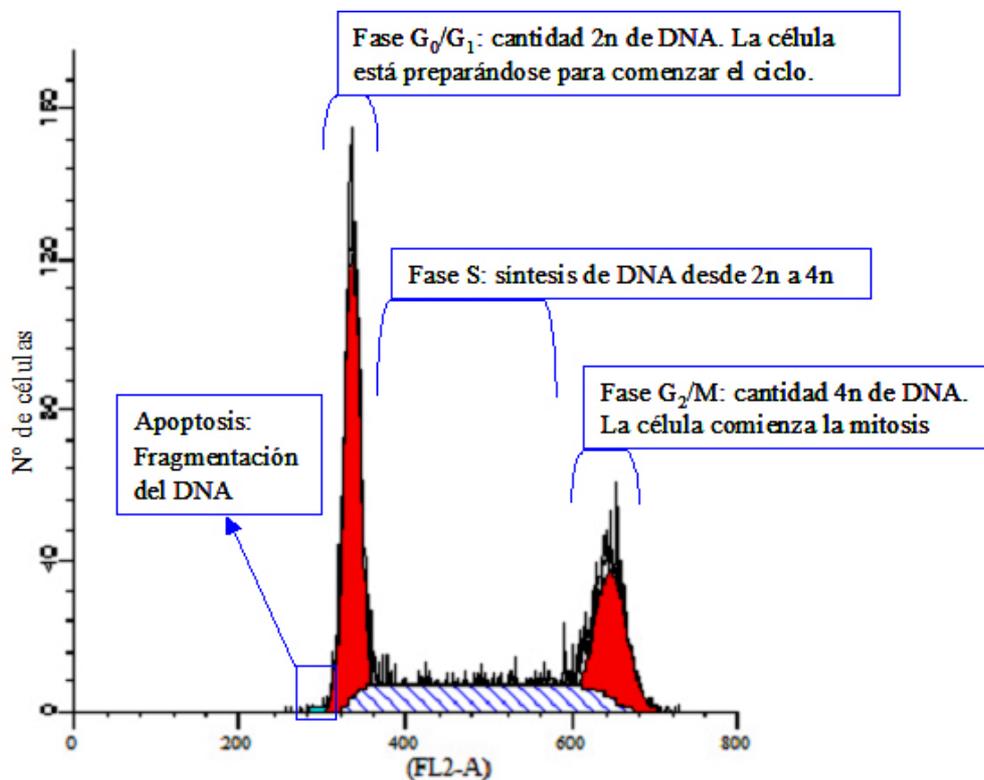


Figura 2.13: Histograma de citómetro de flujo para células normales.

El análisis de los datos de IC_{50} de los complejos N2, N3, en las líneas celulares HCT116 p53 +/+ y p53 -/- nos motivó al estudio de los cambios en el ciclo celular que producen estos complejos en estas dos líneas celulares isogénicas. La discusión y comparación de resultados será realizada en el apartado de *Discusión*.

Para realizar el análisis del ciclo celular se utilizó un protocolo mediante el cual, las células de las líneas celulares HCT 116 p53 $+/+$ o p53 $-/-$ se siembran a baja densidad (aproximadamente un 25%) en placas de 10 cm, haciéndolas crecer durante 24 h. Posteriormente, se tratan con los fármacos correspondientes durante 24 y 48 h a una concentración de IC_{80} . A continuación, las células se tripsinizan y se fijan con 100% EtOH. Se lavan dos veces con PBS que contiene un 0.1% de FCS. Por último, se incuban en PBS suplementado con RNAsa (10 mg/mL) y yoduro de propidio (5mg/mL) durante 30 min, obteniéndose el DNA preparado para analizar mediante FAC Scan.

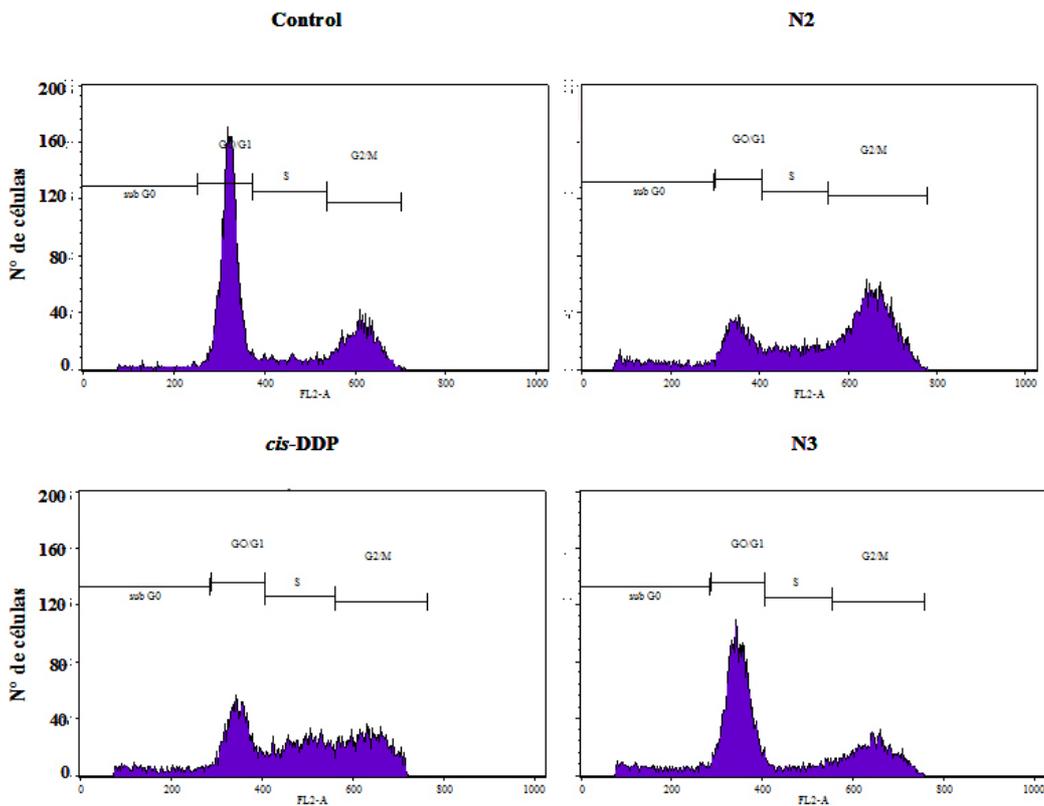


Figura 2.14: Histograma de las células HCT116 p53 $+/+$ control y tratadas con los complejos N2, N3 y *cis*-DDP durante 24 h a una concentración correspondiente a IC_{80} .

	No tratadas	Complejo N2	Complejo N3	<i>cis</i> -DDP
G₀/G₁	64.1%	20.4%	57.7%	30.8%
S	9.2%	17.0%	7.7%	29.5%
G₂/M	24.7%	55.5%	25.1%	32.2%
Apoptosis	2.0%	7.1%	9.5%	7.5%

Tabla 2.48: % de células en cada fase del ciclo celular sin tratar, y después de su tratamiento con N2, N3 y *cis*-DDP en HCT116 p53 $+/+$ durante 24 h a una concentración correspondiente a IC_{80} .

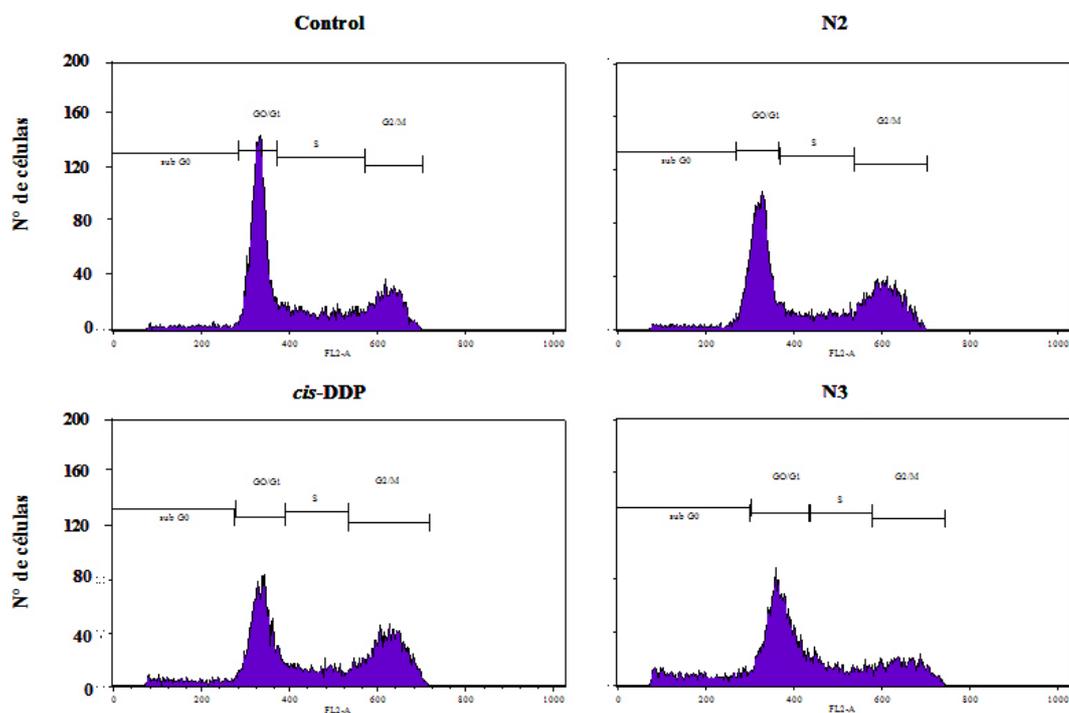


Figura 2.15: Histograma de las células HCT116 p53 $-/-$ control y tratadas con los complejos N2, N3 y *cis*-DDP durante 24 h a una concentración correspondiente a IC_{80} .

	No tratadas	Complejo N2	Complejo N3	<i>cis</i> -DDP
G₀/G₁	48.4%	47.9%	38.0%	58.2%
S	20.7%	16.8%	16.7%	15.2%
G₂/M	29.3%	31.5%	41.0%	21.2%
Apoptosis	1.6%	3.8%	4.3%	5.4%

Tabla 2.49: % de células en cada fase del ciclo celular sin tratar, y después de su tratamiento con N2, N3 y *cis*-DDP en HCT116 p53 $-/-$ durante 24 h a una concentración correspondiente a IC_{80} .

	No tratadas	Complejo N2	Complejo N3	<i>cis</i> -DDP
HCT116 p53 +/+	2.5%	13.6%	19.6%	25.7%
HCT116 p53 -/-	2.8%	9.9%	18.6%	38.4%

Tabla 2.50: % de apoptosis en las células sin tratar, y después de su tratamiento con N2, N3 y *cis*-DDP en HCT116 p53 +/+ y HCT116 p53 $-/-$ durante 48 h a una concentración correspondiente a IC_{80} .

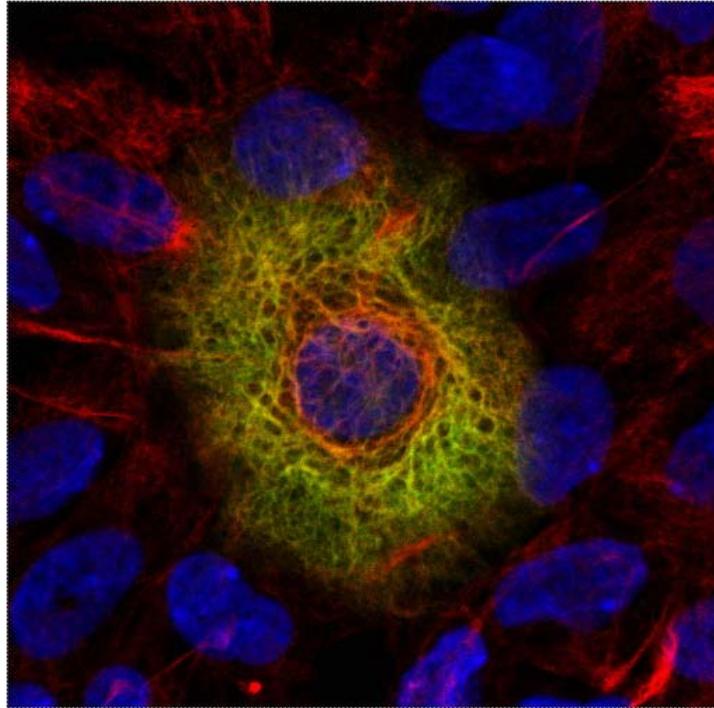


Figura 2.17: Ejemplo de imagen obtenida por microscopía confocal. CNIO.

Las células HCT116 p53 +/+ se crecen durante 24 h sobre cubreobjetos de cristal previamente esterilizados. Posteriormente se incuban a 37°C durante 24, 36 y 48 h con los complejos N2, N3 y *cis*-DDP a una concentración de IC₈₀. Se elimina el medio de cultivo y se realizan los procesos de fijación, permeabilización y bloqueo, con sus lavados correspondiente con PBS entre cada uno de los pasos. La fijación se realizó con paraformaldehído 4% (Sigma) a temperatura ambiente durante 10 min. La permeabilización se hizo usando TWEEN (Sigma) al 0.5% en PBS. En el bloqueo se trataron los cubreobjetos con BSA (Sigma) al 3% en PBS durante 60 min.

Posteriormente a estos pasos previos se realizan las incubaciones con los anticuerpos primarios o con faloidina durante 30 min a 37 °C. A continuación se trata con el anticuerpo secundario correspondiente y con DAPI (Sigma) para la tinción del núcleo con los lavados correspondientes entre cada uno de los tratamientos.

Por último, se montan los cubreobjetos en Mowiol (CalbioChem) y se visualizan las células usando un Confocal Ultra-espectral microscope Leica TCS-SP2-AOBS-UV.

Las imágenes obtenidas, así como su comparación y discusión se mostrará en el apartado de *Discusión*.

2.2.2.4. Interacción con DNA

Los estudios de la interacción con DNA de los complejos *trans*-[PtCl₂(isopropilamina)(3-hidroximetilpiridina)], **N2**, y *trans*-[PtCl₂(isopropilamina)(4-hidroximetilpiridina)], **N3**, fueron llevados a cabo durante mi estancia en Brno, en el Instituto de Biofísica, perteneciente a la Academia de las Ciencias de la República Checa, en el grupo de investigación del Prof. Viktor Brabec.

2.2.2.4.1. Polarografía de Pulso diferencial: Cinética de unión al DNA

La cinética de unión se estudia mediante DPP (Polarografía de Pulso Diferencial). Mediante este método es posible determinar la cantidad de complejo de platino libre en presencia de DNA o de aducto Pt-DNA una vez incubado el DNA con los complejos de platino. El método está basado en la producción de corriente causada por los complejos de Pt(II) o Pt(IV) no unidos al DNA en un electrolito formado por formaldehído, hidracina y ácido sulfúrico, en donde el DNA o los aductos Pt-DNA precipitan por lo que no producirán corriente.²⁶

Una disolución de DNA de timo de ternera (CT-DNA), con una concentración de 0.1 mg/ml, se incubaba con los complejos de platino **N2** o **N3** a un valor de r_i de 0.1 y 0.01 en 10 mM de NaClO₄ a 37 °C (r_i se define como la relación molar inicial de complejo de Pt libre por nucleótido al comienzo de la incubación con DNA). A distintos intervalos de tiempo se toma una alícuota de la mezcla de reacción y se analiza mediante DPP la corriente producida (nA) por el complejo de Pt(II) no unido al DNA, usando como electrolito una disolución formada por formaldehído (0.8%), hidracina (0.08%) y ácido sulfúrico (1.5 M). La cantidad de Pt unido al DNA (r_b) se calcula mediante la diferencia entre la cantidad de Pt libre y la cantidad de Pt total presente en la mezcla de reacción (concentración inicial). Cuando no se observa ningún cambio de corriente en la mezcla que contiene el CT-DNA y el complejo de Pt, a partir de las 24 horas, se puede concluir que ya no se une más complejo a la doble hélice de DNA.

La representación de los datos obtenidos permite determinar la velocidad de unión de los complejos de Pt al DNA y la máxima cantidad de complejo de Pt que llega a

unirse al DNA para cada r_i , como se puede observar en la siguiente figura para los complejos N2 y N3.

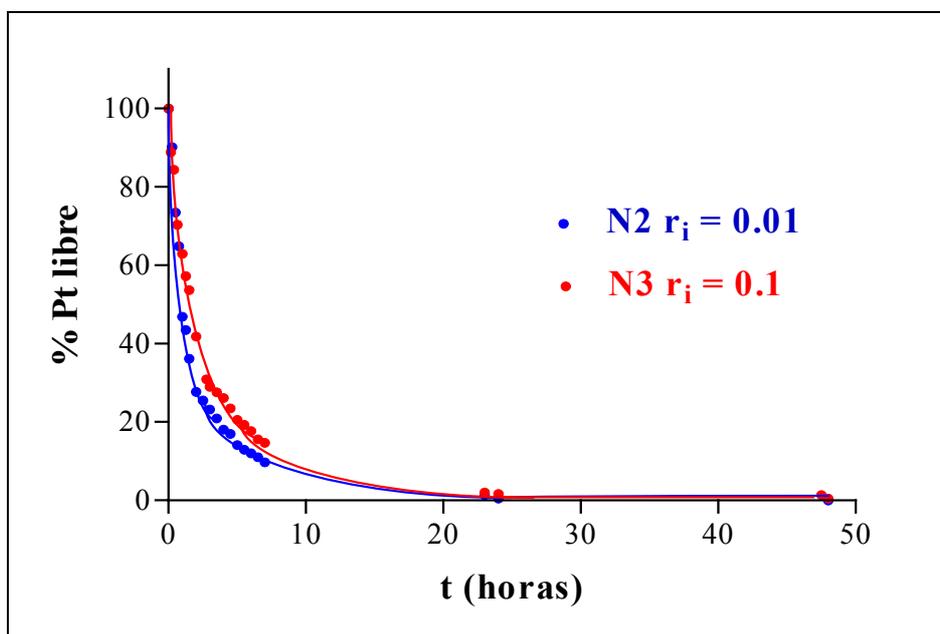


Figura 2.18: Cinética de unión a distinto r_i de los complejos N2 ($r_i = 0.01$) y N3 ($r_i = 0.1$).

	(*) $t_{50\%}$	%Pt unido en 24 h	
		$r_i = 0.1$	$r_i = 0.01$
N2	105 min.	100%	100%
N3	105 min.	100%	100%
cis-DDP	120 min.	100%	100%

Tabla 2.51: Datos de interés en la cinética de unión Pt-DNA a distinto r_i .
 (*) $t_{50\%}$ = tiempo al cual se ha unido el 50% del Pt al DNA.

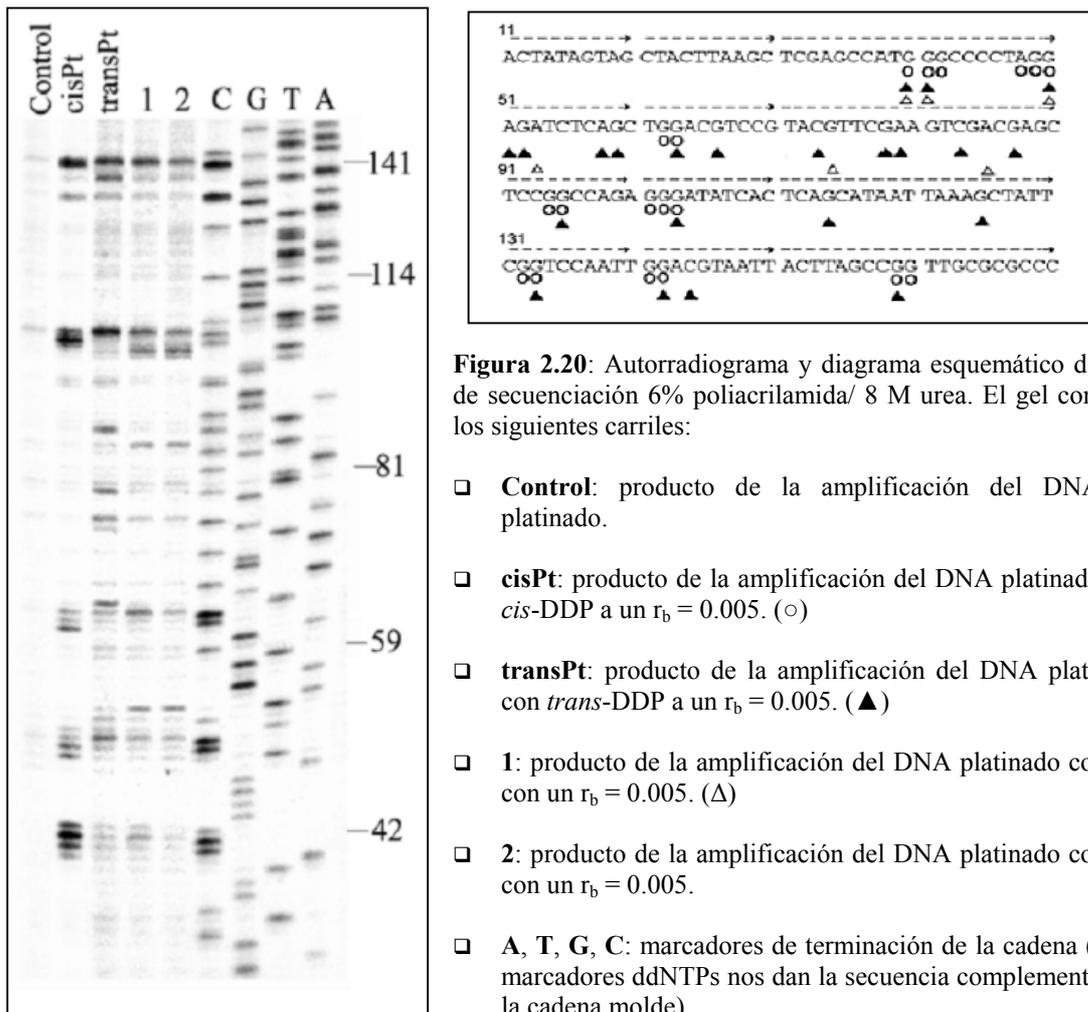
2.2.2.4.2. Secuenciación de aductos Pt-DNA

Dos de los factores relacionados con la actividad citotóxica, debido a la interacción covalente de los complejos de platino con el DNA, son la inhibición de la actividad de la DNA polimerasa y la preferencia del Pt para unirse con ciertas bases del DNA. Estos factores son considerados por la célula como daño en el DNA.^{17,27}

Este ensayo fue realizado mediante el método de secuenciación ideado por Sanger en 1977, por el cual la síntesis de la cadena complementaria a la que se quiere

En nuestro caso, se obtienen 10 µg de plásmido pSP73 linealizado por la enzima de restricción *NdeI* (*NdeI* sólo corta una vez en el plásmido pSP73) por métodos descritos en la bibliografía.²⁸ Después de la desproteinización del plásmido mediante fenol/CHCl₃ se incuba con los complejos de platino **N2** o **N3** en 10 mM NaClO₄ durante 24 h. a 37 °C para obtener un $r_b = 0.005$.

Mediante el equipo comercial TaKaRa TaqTM Cycle Sequencing Kit, el cual incluye la DNA polimerasa termorresistente TaKaRa TaqTM, se realiza un protocolo de secuenciación mediante PCR con pequeñas modificaciones, usando cebadores marcados en el 5' terminal con [γ -³²P]ATP.²⁹ Los productos de la amplificación por PCR se examinan en un gel desnaturante de poliacrilamida 6% para la determinación de las bases específicas donde se producen la formación de aductos Pt-DNA, así como la preferencia de secuencia (figura 2.20).



2.2.2.4.3. Fluorescencia del EtBr: Aductos Pt-DNA

El EtBr (bromuro de etidio) es un agente intercalante del DNA, que se excita a una λ de 546 nm y emite a 590 nm cuando está intercalado en el DNA. Dependiendo de la cantidad de complejo de platino y del tipo de aducto que produce con el DNA, se puede intercalar más o menos EtBr, por lo que será mayor o menor la intensidad de la fluorescencia.

La modificación del DNA por los complejos de Pt produce una disminución en la fluorescencia del EtBr. En el caso de complejos que sólo forman monoadductos, como es el caso del dien-Pt, el EtBr puede intercalarse prácticamente en todas las posiciones, por lo que no habrá variación en la fluorescencia. En el caso del cisplatino, la cantidad de aductos bifuncionales es mayoritaria, por lo que la cantidad de EtBr que puede intercalarse dependerá de forma lineal y con una elevada pendiente de la concentración de dicho complejo. También es posible la comparación con el transplatino debido a que forma mayormente aductos bifuncionales entre cadenas complementarias, produciendo distintas perturbaciones sobre el DNA, por lo que la proporción de intercalación del EtBr será distinta a la del cisplatino.

El ensayo de fluorescencia del EtBr es muy útil para caracterizar las perturbaciones inducidas en el DNA por aductos bifuncionales. Mediante este ensayo es posible conocer de forma cualitativa si los complejos de Pt forman mayor o menor cantidad de aductos bifuncionales o monofuncionales, y las perturbaciones inducidas sobre el DNA debido a su comparación con otros complejos, de los cuales se conoce la cantidad de cada uno de los aductos que forman (figura 2.21).^{30,31}

CT-DNA (2 ml, 40 $\mu\text{g/ml}$) se incubó con cada uno de los complejos **N2**, **N3**, cisplatino, transplatino y dien-Pt durante 24 horas, a valores de r_i comprendidos entre 0 y 0.01. Las medidas de fluorescencia se realizan en un espectrofluorofotómetro Shimadzu RF 40 usando una cubeta de cuarzo de 1cm de ancho, con λ de excitación de 546 nm, y analizando la fluorescencia emitida a 590 nm en distintos experimentos para cada complejo de Pt. La intensidad de fluorescencia fue medida a 25 °C en 0.4 M NaCl para eliminar las fijaciones secundarias del EtBr sobre el DNA.^{32,33} Se fijan las concentraciones finales a 0.01 mg/ml para DNA y 0.04 mg/ml para EtBr

(correspondiente a la saturación de todos los sitios posibles de intercalación del EtBr en el DNA).³²

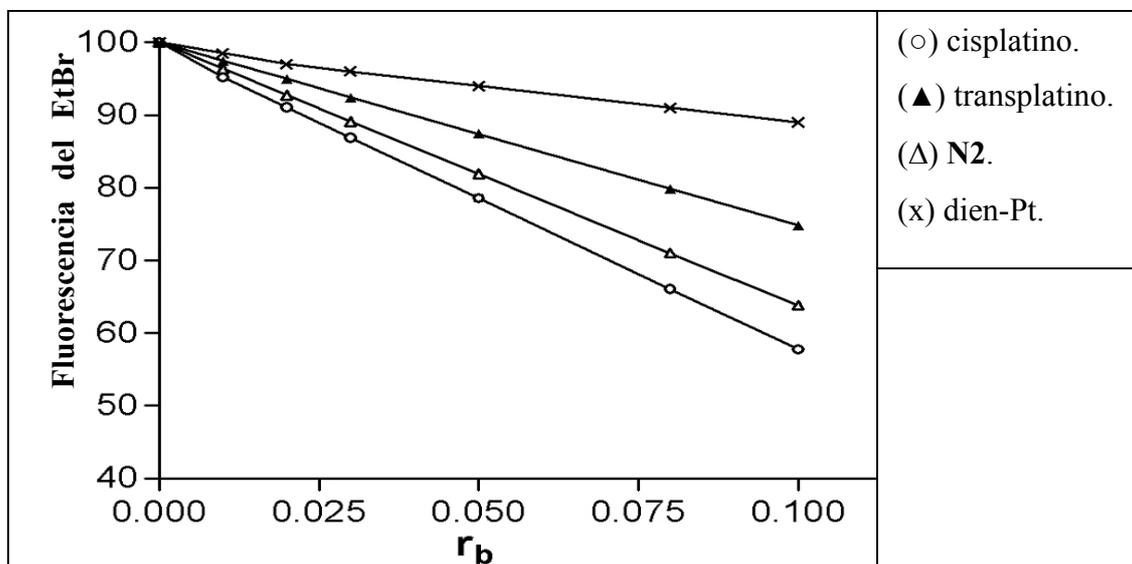


Figura 2.21: Dependencia de la fluorescencia del EtBr a distintos r_b para *cis*-DDP, *trans*-DDP, N2 y dien-Pt.

2.2.2.4.4. Espectroscopía de Absorción Atómica: Monoadductos Pt-DNA

Cisplatino, transplatino y compuestos de platino análogos, coordinan al DNA en un proceso de dos pasos, formando inicialmente aductos monofuncionales preferentemente con residuos de guanina, los cuales cierran subsecuentemente a las lesiones bifuncionales.^{34,35}

La tiourea se utiliza para labilizar los aductos monofuncionales con el DNA.^{35,36} Esta labilización en los complejos *trans* de platino se inicia por la unión de la tiourea al platino en la posición *trans* a la nucleobase. Debido al fuerte efecto *trans* del átomo de azufre, el enlace entre el nitrógeno de la nucleobase y el Pt se debilita y se vuelve susceptible a una reacción de sustitución.³⁴ Consecuentemente, los aductos monofuncionales Pt-DNA de complejos *trans* de platino pueden ser eliminados, mientras que los aductos bifuncionales son resistentes a un tratamiento con tiourea.³⁴

CT-DNA a una concentración de 0.15 mg/ml se incubó con transplatino, N2 y N3 a un $r_i = 0.1$ en 10 mM NaClO₄ a 37 °C. A diferentes intervalos de tiempo se toman

alícuotas, a las cuales se añade NaCl 0.2 M con el fin de detener la unión del Pt al DNA. Inmediatamente se congelan a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

En un experimento paralelo la reacción se detiene por la adición de una disolución 10 mM de tiourea; se incuban estas alícuotas 10 min a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ para favorecer la reacción con la tiourea, y rápidamente se congelan a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Las muestras se dializan exhaustivamente con una disolución 0.2 M de NaCl y posteriormente con H_2O a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ para su posterior análisis mediante AAS y determinar la cantidad de Pt unido al DNA (figura 2.22). Todos los datos se midieron por triplicado, con un error de $\pm 2\%$.

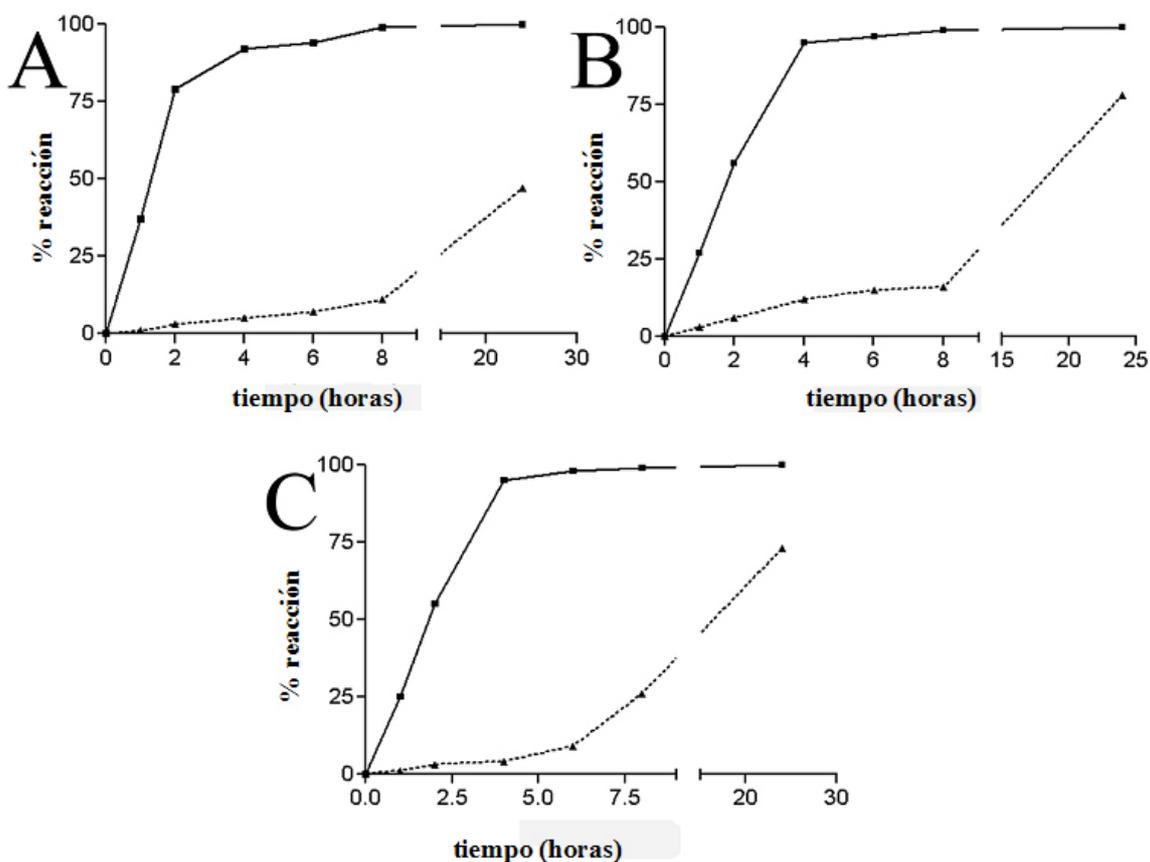


Figura 2.22: Cinética de reacción del transplatin (A), N2 (B), y N3 (C) con tiourea. Las reacciones se pararon con 10 mM de tiourea (■) o 0.2 M de NaCl (▲).

2.2.2.4.5. Electroforesis Desnaturalizante: Aduetos Intercatenarios

Los complejos bifuncionales de platino, que se enlazan covalentemente al DNA, son capaces de formar varios tipos de enlaces inter- e intracatenarios (CLs). Existen suficientes evidencias para sugerir que la eficacia antitumoral de los complejos de platino es el resultado de la formación de este tipo de lesiones, pero su relativa eficacia permanece aún desconocida.³⁷

El *cis*-DDP forma una pequeña cantidad de enlaces intercatenarios pero, a pesar de la baja abundancia de este tipo de lesiones sobre el DNA, se consideran también importantes en el efecto antitumoral de dicho fármaco.

Los aductos Pt-DNA intercatenarios se pueden determinar mediante electroforesis en condiciones desnaturalizantes de un plásmido linearizado e incubado 24 horas con los complejos de platino de interés. Las bandas correspondientes a una migración más lenta son debidas al DNA desnaturalizado que presenta enlaces intercatenarios entre las dos cadenas de la doble hélice, aumentando la intensidad de dicha banda a medida que aumenta la cantidad de estos enlaces con el DNA.

El ensayo se realiza con un plásmido debido a su menor tamaño y la posibilidad de usar enzimas de restricción que cortan sólo en una posición, lo cual facilita el trabajo de obtención y purificación de éste.

Previamente al experimento, se lineariza el plásmido pSP73 (2464 bp) con *EcoRI* (corta una sola vez en plásmido pSP73) y se marca en la posición 3'terminal con [α -³²P]ATP. Posteriormente, se incuba el plásmido con los complejos **N2** y **N3** a diferentes r_b durante 24 h y 37 °C. Las muestras se analizan mediante electroforesis en un gel de agarosa (1% agarosa, tampón NaCl 0.03 M y EDTA 0.001 M) en condiciones desnaturalizantes (NaOH 0.03M y EDTA 0.001 M).^{28,31,38}

La radioactividad asociada con las bandas individuales en cada carril se mide con un analizador de imagen FUJIFILM bioimaging analyzer con el software AIDA, para obtener una estimación de la fracción de DNA que presenta enlaces intercatenarios (bandas con migración más lenta), o que no presentan este tipo de enlaces con el DNA (bandas de migración más rápida). La frecuencia de enlaces intercatenarios (cantidad de

enlaces intercatenarios por molécula de **N2** o **N3** enlazado al DNA) se calcula usando la distribución de Poisson para la fracción de DNA sin enlaces intercatenarios con el Pt en combinación con los valores de r_b y el tamaño del fragmento (figuras 2.23A y B).³⁷

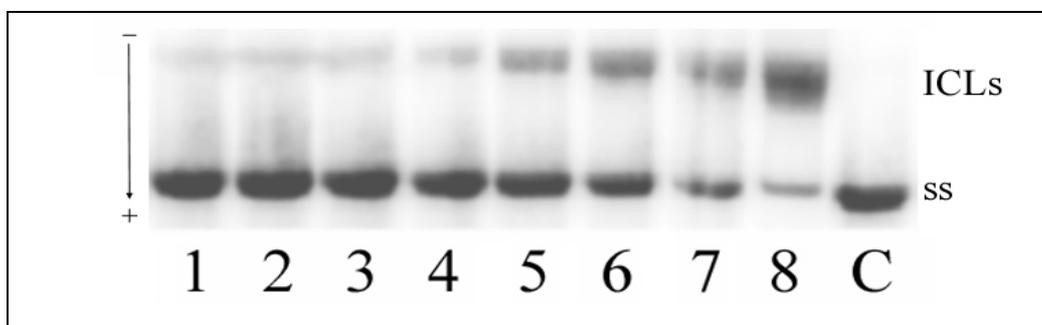


Figura 2.23A: Autorradiograma de formación de enlaces intercatenarios para **N2** con el plásmido linealizado pSP73 en un gel desnaturalizante de agarosa 1%. ICLs :DNA con enlaces intercatenarios. ss: DNA de cadena sencilla. Carriles del 1-8: $r_b = 2 \times 10^{-5}$, 5×10^{-5} , 7×10^{-5} , 1×10^{-4} , 2×10^{-4} , 3×10^{-4} , 5×10^{-4} , 7×10^{-4} respectivamente. C: control ($r_b = 0$).

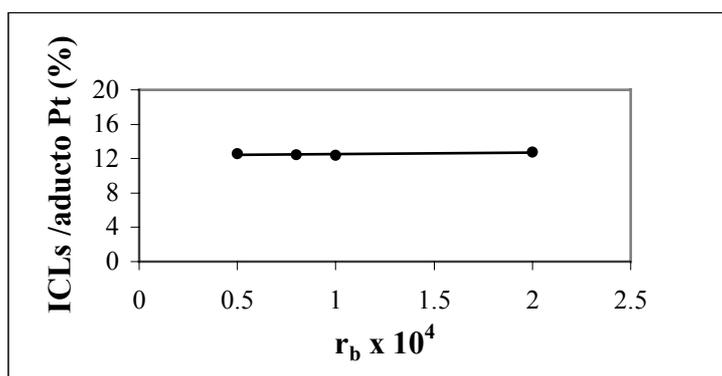


Figura 2.23B: Dependencia del número de enlaces intercatenarios por aducto respecto de r_b (% ICLs/aducto Pt).

2.2.2.4.6. Dicroísmo Circular: Distorsión del DNA

La variación en el espectro de dicroísmo circular del DNA informa sobre los cambios conformacionales sufridos en la doble hélice tras la unión de los complejos de Pt. El *cis*-DDP produce un incremento significativo en la banda positiva que se obtiene a ≈ 280 nm debido a modificaciones en la conformación del B-DNA, que no conducen a desnaturalización, sino a un cambio hacia la conformación A-DNA. El *trans*-DDP produce una disminución en la misma banda, la cual se piensa que corresponde a un estado de desnaturalización del DNA.³⁹

Con este experimento, se pretende observar qué tipo de cambios conformacionales producen los complejos **N2** y **N3** sobre el DNA. Es decir, cambios hacia la conformación A-DNA como produce el *cis*-DDP, o cambios hacia un estado de desnaturalización como el *trans*-DDP (figuras 2.24A y B).

El estudio se realiza incubando CT-DNA (30 $\mu\text{g/ml}$) con los complejos **N2** y **N3** a r_b comprendidos entre 0-0.002, durante 24 horas a 37 $^{\circ}\text{C}$ en NaClO_4 10 mM. Posteriormente, el espectro se realiza a 25 $^{\circ}\text{C}$ usando un espectrofotómetro JASCO, modelo J720.

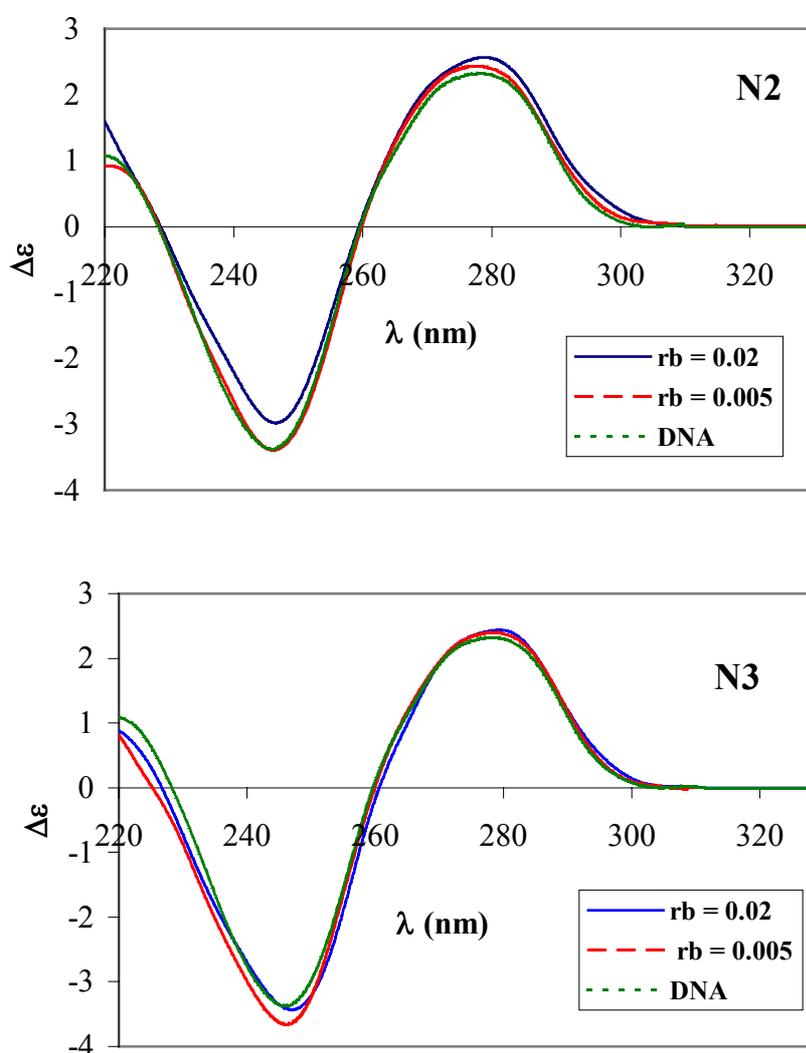


Figura 2.24A: Espectros de DC para CT-DNA modificado con **N2** y **N3** a distintos r_b .

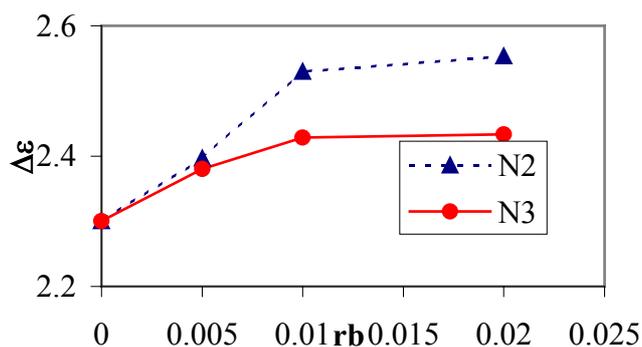


Figura 2.24B: Cambios en el espectro de DC para CT-DNA a de $\lambda_{\max} = 280$ nm inducidos por la unión de N2 (Δ) o N3 (o) en función de r_b .

2.2.2.4.7. Electroforesis en gel de agarosa: Desenrollamiento Inducido

Un compuesto que desenrolla la doble hélice de DNA, reduce el número de superenrollamientos en un plásmido. Este efecto disminuye la densidad superhelicoidal del DNA circular cerrado. Esta disminución, produce a su vez una disminución en el grado de migración en un gel de agarosa, por lo que es posible observar y cuantificar el grado de desenrollamiento producido (figura 2.25).⁴⁰

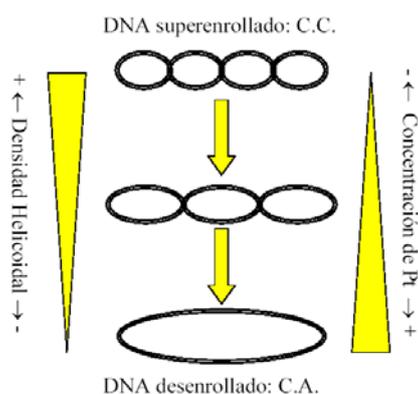


Figura 2.25: Dibujo descriptivo del desenrollamiento de un plásmido circular cerrado.

El ángulo de desenrollamiento inducido por cada aducto Pt-DNA viene dado por la fórmula $\Phi = 18 \sigma / r_b(c)$, donde σ es la densidad superhelicoidal inherente al plásmido, y $r_b(c)$ es el valor de r_b para el cual las formas superenrollada y relajada del plásmido comigran en un gel de agarosa.

Bajo las condiciones experimentales de trabajo usadas, en base al $r_b(c)$ obtenido para el cisplatino y asumiendo que el ángulo de desenrollamiento que produce es $\Phi = 13^\circ$, se obtiene para el plásmido pSP73 el valor de $\sigma = -0.063$.

Se incuban muestras del plásmido pSP73 con los complejos N2 o N3 a distintos r_b comprendidos entre 0.1 y 0.001 durante 24 horas a 37 °C en NaClO₄ 10 mM. Se toma una alícuota de cada una de las muestras incubadas y se somete a electroforesis en un gel de agarosa 1% a 25 °C en la oscuridad y en tampón TAE con un voltaje de 30 V. Posteriormente, el gel se tiñe con EtBr y se fotografía con la ayuda de un transiluminador (figura 2.26).

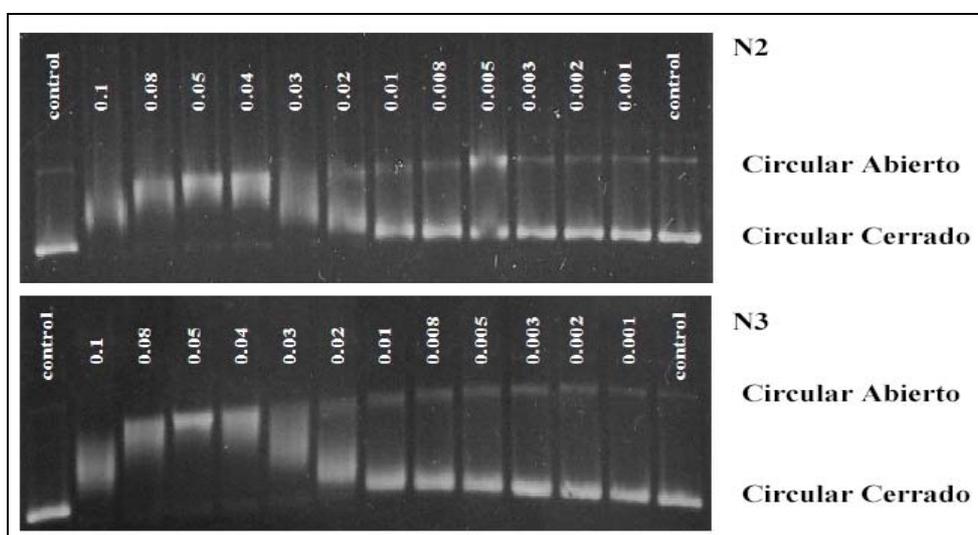


Figura 2.26: Desenrollamiento del plásmido superenrollado pSP73 por N2 y N3.

$\Phi = 18 \cdot \sigma / r_b(c)$	
$\Phi_{\text{cis-DDP}}$	$= 13^\circ$
$\Phi_{\text{trans-DDP}}$	$= 9^\circ$
Φ_{N2}	$= 16^\circ$
Φ_{N3}	$= 16^\circ$

2.2.2.4.8. Reacción de los complejos de Pt con GSH y MT-2

El enlace covalente entre el Pt y ligandos dadores de S está muy favorecido desde el punto de vista termodinámico. Por lo tanto, antes de que los complejos de platino alcancen el DNA celular, o incluso después de unirse al DNA, pueden interactuar con múltiples moléculas que contienen átomos de azufre.⁴¹ Esta interacción se piensa que juega un papel importante en el mecanismo subyacente de la resistencia de células tumorales a los compuestos de platino, su inactivación y efectos adversos.^{42,43} Además, una diferencia importante entre el *cis*-DDP y su clínicamente inefectivo isómero *trans* es que el transplatino es cinéticamente más reactivo que el cisplatino frente a átomos de azufre y, por lo tanto, más susceptible para su desactivación. También se ha sugerido que el transplatino forma una pequeña cantidad de aductos bifuncionales con el DNA debido a que el paso de aducto monofuncional a bifuncional es lento y, por tanto, reacciona fácilmente, antes de la formación del aducto bifuncional, con moléculas con azufres nucleófilos.^{44,45}

Ejemplos de moléculas endógenas con átomos de azufre que pueden reaccionar con los complejos de Pt(II) cuando son administrados por vía intravenosa son el glutatión (GSH) y las metalotioneínas (MT). Las MT son pequeñas metaloproteínas celulares (~6-7 kDa) que unen fuertemente iones metálicos gracias a un dominio de unión, a dichos iones, constituido por 20 cisteínas organizadas en dos regiones ricas en grupos tiol.⁴⁶

Disoluciones de los complejos **N2**, **N3** o *trans*-DDP 33 μM , se mezclan con 16.5 mM de GSH ó 2.1 μM de MT-2 (concentraciones que representan la cantidad fisiológica) en Tris- ClO_4^- 0.01 M a 37 °C a pH 7.0. La cinética de formación de los aductos Pt-tiol se mide en un espectrofotómetro Beckman DU-7400 a 260 nm a distintos tiempos. A esta longitud de onda se observa un aumento en la absorbancia debido a la formación de aductos Pt-S a lo largo del tiempo. Una vez que todo el Pt se ha coordinado a los grupos tiol, la absorbancia deja de aumentar. Por otra parte se mide, a los mismos intervalos de tiempo, una disolución blanco que no contiene complejos de Pt. En esta disolución blanco se miden los grupos tiol de las moléculas de GSH o de MT-2 que se oxidan con el tiempo para dar puentes disulfuro. Además, se debe medir la absorción que producen a esa longitud de onda los complejos de Pt.⁴⁷

Restando los valores de la absorbancia del blanco y la de los complejos, a cada uno de los respectivos valores obtenidos de la mezcla de reacción, se obtiene la curva correspondiente a la cinética de formación de los aductos Pt-SH (figura 2.27).

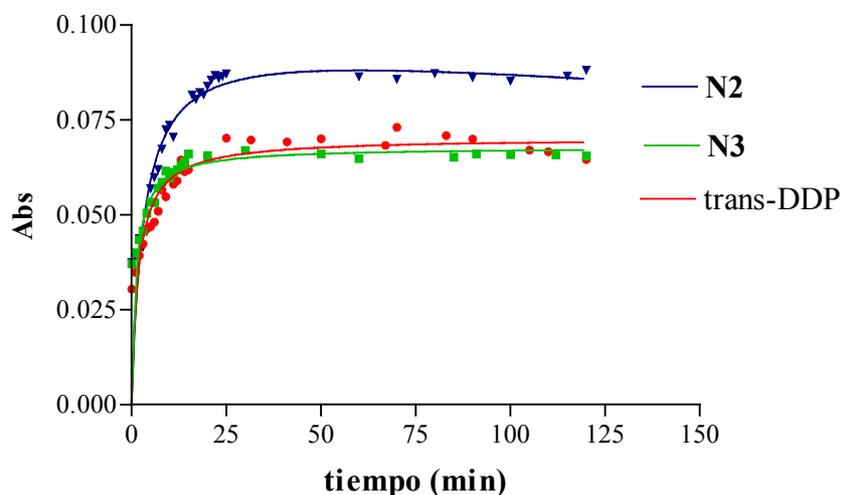


Figura 2.27: Cinética de formación de los aductos Pt-SH.

Se ha estudiado la capacidad de la GSH de eliminar del DNA los aductos monofuncionales de los complejos **N2**, **N3** y transplatino.

Se sintetiza, por métodos descritos en la bibliografía, la cadena superior de un oligonucleótido de 10-pb (figura 2.28).^{48,49} Esta cadena superior presenta la secuencia TGT que es un sitio específico para la formación de aductos monofuncionales por los complejos **N2**, **N3** o *trans*-DDP.

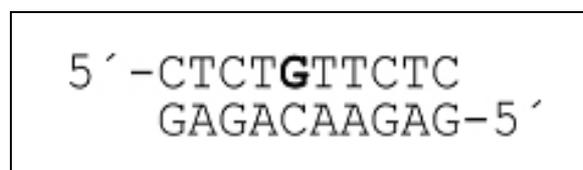


Figura 2.28: Oligonucleótido 10-pb con la secuencia TGT en la cadena superior.

Se platina el oligonucleótido de cadena simple que contiene la secuencia TGT (oligonucleótido TGT) con los complejos **N2**, **N3** o *trans*-DDP a un $r_i = 1$ para asegurarnos que todo el DNA ha sido platinado en la secuencia TGT. Se purifica mediante un FPLC (Pharmacia systems) de intercambio iónico (columna Pharmacia MonoQ) con un gradiente de NaCl de 0.2-0.7 M.⁵⁰ Se verifica por AAS (Espectroscopía de Absorción Atómica), y por medidas de densidad óptica mediante UV, que los

oligonucleótidos modificados contienen un solo átomo de platino. Parte del oligonucleótido de cadena simple modificado por los complejos de platino se incubó a una concentración de 10 μM durante 90 min y 37 $^{\circ}\text{C}$ con GSH a 10 mM en 0.1 M de NaClO_4 .

Mediante HPLC de intercambio iónico a 260 nm (Waters HPLC: bomba Waters 262, detector Waters 2487 UV, controlador Waters 600S con columna MonoQ HR 5/5) se analiza por separado: el oligonucleótido de cadena simple sin modificar (pico I), el oligonucleótido de cadena simple modificado por los complejos de platino (pico II) y el oligonucleótido de cadena simple modificado e incubado con GSH (pico III) (figura 2.29).

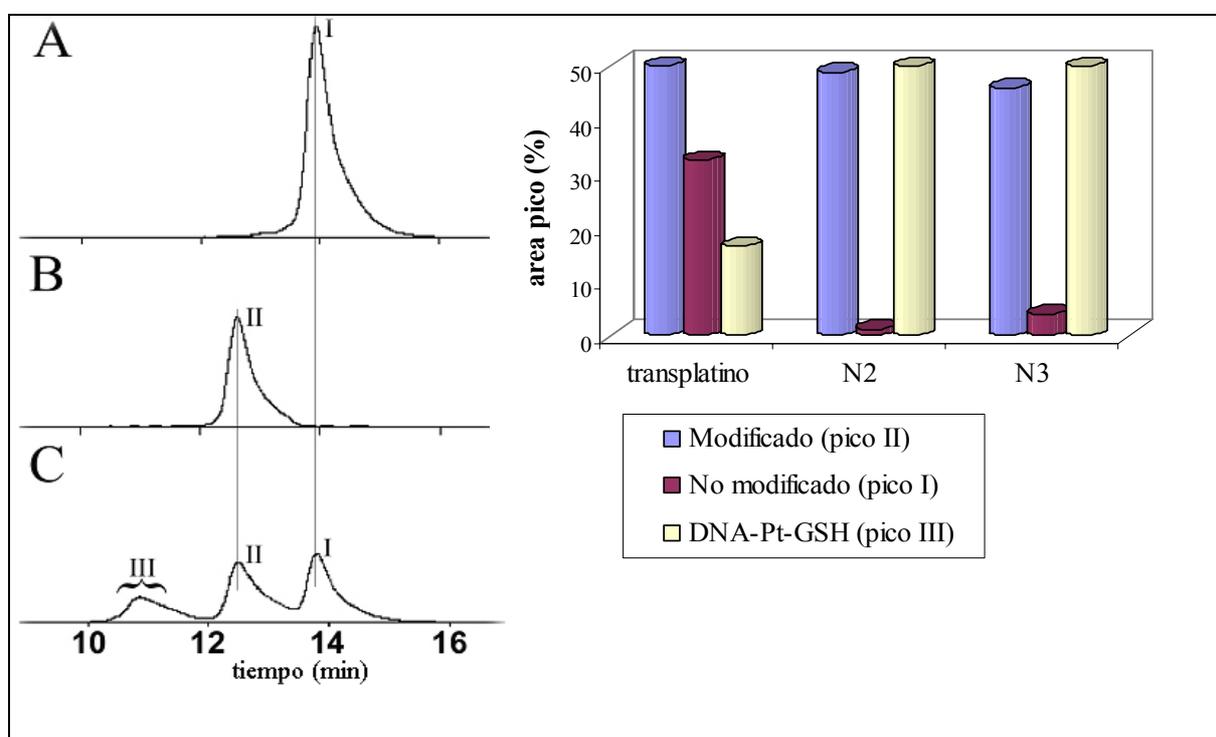


Figura 2.29: Reacción del oligonucleótido de cadena simple con la secuencia TGT modificado por N2, N3 o transplatino con GSH 10 mM. **A:** 20 μM de oligonucleótido TGT sin modificar con complejos de Pt. **B:** 10 μM de oligonucleótido TGT modificado con transplatino. **C:** 10 μM de oligonucleótido TGT modificado con transplatino e incubado 90 min con GSH 10 μM . **Grafica:** Área bajo los picos de los cromatogramas como porcentaje total de cada una de las especies detectadas.

2.3. BIBLIOGRAFÍA

- (1) Sheldrick, G. M. *Acta Crystallogr. A.* **1990**, *46*, 467.
- (2) Bruker (2000). SHELXTL version 6.10. Structure Determination Package. Bruker AXS Inc. Madison, W.
- (3) Sheldrick, G. M. S. v., a Program for Empirical Absorption Correction; Universität Göttingen, **1997-2001**.
- (4) SAINT+ NT v. 6.04. SAX Area-Detector Integration Program. Bruker AXS **1997-2001**. Madison, W.
- (5) Sheldrick, G. M. S., Program for Crystal Structure Refinement: Universität Göttingen, **1997**.
- (6) Kauffman, J.; W., C. D. En: *Inorganic Syntheses*; Kleinberg, J., Ed.; McGraw-Hill Book Company: New York, **1963**; Vol. VII, 239.
- (7) Dhara, S. C. *Ind. J. Chem.* **1970**, *8*, 193.
- (8) Jensen, K. A. *Zeitschrift für anorganische und allgemeine Chemie.* **1936**, *229*, 225.
- (9) Gillard, R. D.; Pilbrow, M. F. *J. Chem. Soc., Dalton.* **1974**, 2320.
- (10) Hartley, F. R.; Searle, G. W. *Inorg. Chem.* **1973**, *12*, 1949.
- (11) Goodfellow, R. J.; Venanzi, L. M. *J. Chem. Soc.* **1965**, 7533.
- (12) Chatt, J.; Venanzi, L. M. *J. Chem. Soc.* **1955**, 2787.
- (13) Goodfellow, R. J.; Goggin, P. L.; Duddell, D. A. *J. Chem. Soc. A.* **1968**, 504.
- (14) Adams, D. M.; Westland, A. D.; Gerratt, J.; Chatt, J. *J. Chem. Soc.* **1964**, 734.
- (15) Goodfellow, R. J.; Goggin, P. L.; Venanzi, L. M. *J. Chem. Soc. A.* **1967**, 1897.
- (16) Brabec, V.; Palecek, E. *Biophys. Chem.* **1976**, *4*, 79.
- (17) Lemaire, M. A.; Schwartz, A.; Rahmouni, A. R.; Leng, M. P. *Natl. Acad. Sci.* **1991**, *88*, 1982.
- (18) Alley, M. C.; Scudiero, D. A.; Monks, A.; Hursey, M. L.; Czerwinski, M. J.; Fine, D. L.; Abbott, B. J.; Mayo, J. G.; Shoemaker, R. H.; Boyd, M. R. *Cancer Res.* **1988**, *48*, 589.
- (19) Pozarwoski, P.; Grabarek, J.; Darzynkiewicz, Z. *Current Protocols in Cell Biology* **2003**, *UNIT 18.8*, 1.
- (20) Darzynkiewicz, Z.; Juan, G.; Bedner, E. *Current Protocols in Cell Biology* **1999**, *UNIT 8.4*, 1.

- (21) Darzynkiewicz, Z.; Bedner, E.; Li, X.; Gorczyca, W.; Melamed, M. R. *Exp. Cell. Res.* **1999**, *249*, 1.
- (22) Juan, G.; Traganos, F.; Darzynkiewicz, Z. *Methods Cell. Biol.* **2001**, *63*, 343.
- (23) Wright, S. J.; Wright, D. J. *Methods Cell. Biol.* **2002**, *70*, 1.
- (24) Robinson, J. P. *Methods Cell. Biol.* **2001**, *63*, 89.
- (25) Smith, C. L. *Current Protocols in Cell Biology* **1999**, *UNIT 4.5*, 1.
- (26) Kim, S. D.; Vrana, O.; Kleinwachter, V.; Niki, K.; Brabec, V. *Anal. Lett.* **1990**, *23*, 1505.
- (27) Siddik, Z. H. *Oncogene*. **2003**, *22*, 7265.
- (28) Brabec, V.; Leng, M. P. *Natl. Acad. Sci.* **1993**, *90*, 5345.
- (29) Novakova, O.; Kasparkova, J.; Vrana, O.; Vanvliet, P. M.; Reedijk, J.; Brabec, V. *Biochemistry*. **1995**, *34*, 12369.
- (30) Zakovska, A.; Novakova, O.; Balcarova, Z.; Bierbach, U.; Farrell, N.; Brabec, V. *Eur. J. Biochem.* **1998**, *254*, 547.
- (31) Brabec, V.; Kasparkova, J.; Vrana, O.; Novakova, O.; Cox, J. W.; Qu, Y.; Farrell, N. *Biochemistry*. **1999**, *38*, 6781.
- (32) Butour, J. L.; Macquet, J. P. *Eur. J. Biochem.* **1977**, *78*, 455.
- (33) Butour, J. L.; Alvinerie, P.; Souchard, J. P.; Colson, P.; Houssier, C.; Johnson, N. P. *Eur. J. Biochem.* **1991**, *202*, 975.
- (34) Eastman, A. *Pharmacol. Ther.* **1987**, *34*, 155.
- (35) Eastman, A.; Barry, M. A. *Biochemistry*. **1987**, *26*, 3303.
- (36) Brabec, V.; Vrana, O.; Novakova, O.; Kleinwachter, V.; Intini, F. P.; Coluccia, M.; Natile, G. *Nucleic Acids Res.* **1996**, *24*, 336.
- (37) Kasparkova, J.; Marini, V.; Najajreh, Y.; Gibson, D.; Brabec, V. *Biochemistry*. **2003**, *42*, 6321.
- (38) Farrell, N.; Qu, Y.; Feng, L.; Vanhouten, B. *Biochemistry*. **1990**, *29*, 9522.
- (39) Brabec, V.; Kleinwachter, V.; Butour, J. L.; Johnson, N. P. *Biophys. Chem.* **1990**, *35*, 129.
- (40) Keck, M. V.; Lippard, S. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 3386.
- (41) Sadowitz, P. D.; Hubbard, B. A.; Dabrowiak, J. C.; Goodisman, J.; Tacka, K. A.; Aktas, M. K.; Cunningham, M. J.; Dubowy, R. L.; Souid, A. K. *D. M. D.* **2002**, *30*, 183.
- (42) Masters, J. R. W.; Thomas, R.; Hall, A. G.; Hogarth, L.; Matheson, E. C.; Cattani, A. R.; Lohrer, H. *Eur. J. Cancer*. **1996**, *32A*, 1248.

- (43) Reedijk, J. *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 2499.
- (44) Leng, M.; Schwartz, A.; J., G.-P. M. En: *Platinum-Based Drugs in Cancer Therapy*; Kelland, L. R., Farrell, N., Eds.; Humana Press: Totowa, NJ, **2000**; Vol. 7, 63.
- (45) Bancroft, D. P.; Lepre, C. A.; Lippard, S. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 6860.
- (46) Romero-Isart, N.; Vasak, M. *J Inorg Biochem* **2002**, *88*, 388.
- (47) Dabrowiak, J. C.; Goodisman, J.; Soud, A. K. *D. M. D.* **2002**, *30*, 1378.
- (48) Brabec, V.; Reedijk, J.; Leng, M. *Biochemistry.* **1992**, *31*, 12397.
- (49) Kasparikova, J.; Mellish, K. J.; Qu, Y.; Brabec, V.; Farrell, N. *Biochemistry.* **1996**, *35*, 16705.
- (50) Kasparikova, J.; Mackay, F. S.; Brabec, V.; Sadler, P. J. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2003**, *8*, 741.

3. Discusión

3.1. Síntesis y caracterización de los complejos <i>trans</i> de Pt(II)	113
3.1.1. <i>trans</i> -[PtCl ₂ (amina)(PPh ₃)]	114
3.1.2. <i>trans</i> -[PtCl ₂ (amina)(amina')]	130
3.2. Citotoxicidad	137
3.2.1. <i>Datos de citotoxicidad de los complejos</i>	137
3.2.2. <i>Papel de p53 en la respuesta a la citotoxicidad</i>	144
3.3. Ciclo celular	146
3.4. Imágenes de microscopía confocal	149
3.5. Interacción con DNA	151
3.6. Bibliografía	156

3.1. Síntesis y caracterización de los complejos *trans* de Pt(II)

Se han sintetizado y caracterizado los siguientes complejos: *trans*-[PtCl₂(amina)(trifenilfosfina)], donde amina = isopropilamina, 1-metilpropilamina y 2-metilbutilamina, y *trans*-[PtCl₂(amina)(amina')], donde amina = amoniaco o isopropilamina; y amina' = 3- ó 4-hidroximetilpiridina.

Previamente ha sido necesario realizar la síntesis de los productos de partida: *cis*-[PtCl₂(PPh₃)₂] (**P1**), *cis*-[PtCl₂(isopropilamina)₂] (**N1**), *cis*-DDP y *trans*-[Pt₂Cl₂(μ-Cl)₂(PPh₃)₂] (**D1**), los cuales dan lugar a los complejos finales mediante la aplicación del efecto *trans* en algún paso de la síntesis.

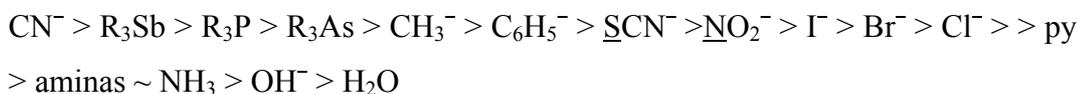
El efecto *trans* es un principio básico de la química de la coordinación, el cual se refiere a la capacidad de un ligando de labilizar a otro ligando en posición *trans* con respecto al primero en un complejo plano cuadrado u octaédrico.¹ Su influencia puede ser observada en tres propiedades del enlace metal-ligando:

- Propiedades intrínsecas: La coordinación a un complejo (M-L) de un ligando (A) para dar A-M-L puede afectar a las propiedades intrínsecas de la molécula, tales como longitud de enlace, frecuencias de vibración, desplazamiento químico y constantes de acoplamiento en RMN, entre el metal (M) y el ligando (L).
- Propiedades termodinámicas: Un ligando (A) coordinado a un ion metálico (M) afecta al cambio de energía libre producido como consecuencia de la sustitución de un ligando (L) por otro ligando (E), alterando la energía libre de ambos complejos A-M-L y A-M-E.



- Propiedades cinéticas: La coordinación de un ligando (A) a un ion metálico modifica la velocidad de sustitución de otro ligando L debido a una disminución de la diferencia de energía entre el estado normal y el estado de transición.

La aplicación más importante del efecto *trans* es su uso para la preparación específica de isómeros en complejos planocuadrados de platino(II). La capacidad de labilización de ligandos en estos complejos es:²



La caracterización de los complejos se lleva a cabo por análisis químico elemental, espectroscopía IR, ¹H-RMN, ¹³C-RMN, ³¹P-RMN, ¹⁹⁵Pt-RMN y por difracción de rayos-X, en los casos que ha sido posible la obtención de monocristales.

3.1.1. *trans*-[PtCl₂(amina)(PPh₃)]

Se prepara a partir de *cis*-[PtCl₂(PPh₃)₂] (**P1**), que por posterior reacción con PtCl₂ en naftaleno fundido a 160 °C da lugar al dímero *trans*-[Pt₂Cl₂(μ-Cl)₂(PPh₃)₂] (**D1**). La reacción de este último en acetona con la cantidad estequiométrica de la amina seleccionada, origina los correspondientes complejos *trans*-[PtCl₂(amina)(PPh₃)].³

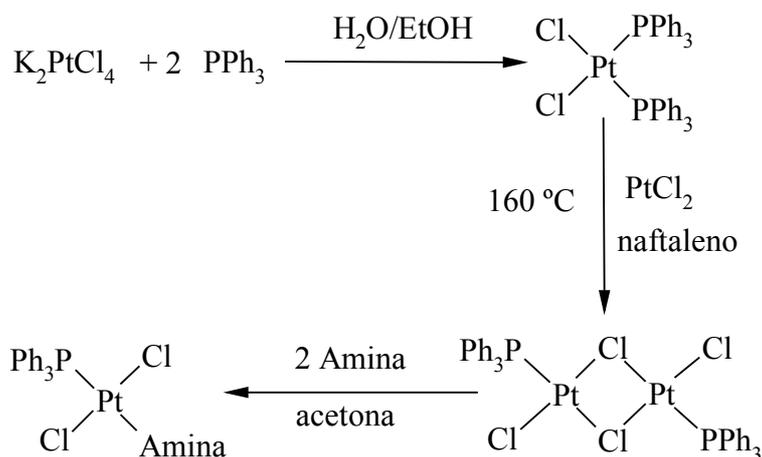
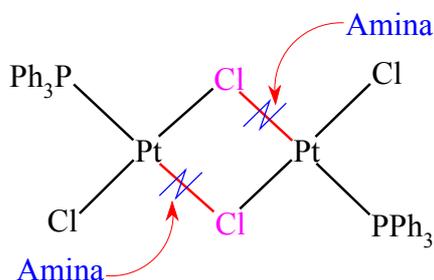


Figura 3.1.: Esquema de síntesis de los complejos *trans*-[PtCl₂(amina)(PPh₃)].

La utilización de otros disolventes como tetracloroetano o p-clorotolueno, que asistirán la reacción manteniendo los reactivos por debajo de su temperatura de fusión,⁴⁻⁷ conduce a rendimientos más bajos.

El fuerte efecto *trans* del grupo fosfina sobre los cloro puentes provoca que los enlaces Pt-Cl sean más lábiles y, por lo tanto, los ligandos amina puedan entrar en la posición *trans* a la fosfina.



Debido al fuerte efecto *trans* que producen las fosfinas en comparación con las aminas, nunca se podrían usar como precursores complejos de fórmula general *cis*-[PtCl₂(amina)₂].

El fuerte efecto *trans* de las fosfinas es debido a que este tipo de ligandos producen un movimiento de la densidad electrónica a través del enlace σ hacia el ligando en *trans* (efecto σ -*trans*). Además, existe una componente π ya que los ligandos fosfina presentan orbitales π simétricos vacíos, que pueden retirar densidad electrónica del orbital d_{z^2} del metal (efecto π -*trans*). Ambos efectos contribuyen a las propiedades del enlace entre el metal y el ligando en *trans* a la fosfina.¹

En la bibliografía, se indica que la obtención de los dímicos de fórmula general *trans*-[Pt₂Cl₂(μ -Cl)₂(PR₃)₂] se puede realizar a partir de los isómeros *cis*, *trans*-[PtCl₂(PR₃)₂] o de la mezcla de ambos.^{3,7} Nosotros hemos observado que en la síntesis del dímico *trans*-[Pt₂Cl₂(μ -Cl)₂(PPh₃)₂] (**D1**), se obtiene mejor rendimiento si se parte del isómero *cis*-[PtCl₂(PPh₃)₂] puro. Por ello, dado que en la reacción de K₂PtCl₄ con 2 equivalentes de PPh₃ se produce mezcla de *cis* y *trans*-[PtCl₂(PPh₃)₂], se trató esta mezcla con CHCl₃, ya que este disolvente sólo solubiliza el isómero *trans*, que posteriormente se isomeriza a la forma *cis*, insoluble en este disolvente.⁸

En general, para los complejos de tipo PtX₂L₂, el isómero *cis* está entálpicamente favorecido, pero los cambios entrópicos en disolución favorecen el isómero *trans*. La diferencia de energía libre entre los isómeros *cis* y *trans* es pequeña, de manera que cualquier cambio en los ligandos, temperatura o disolvente puede afectar al equilibrio entre los dos isómeros.⁹

El mecanismo de isomerización de complejos del tipo $[\text{PtCl}_2(\text{PR}_3)_2]$ implica una especie intermedia pentacoordinada, que se forma por un mecanismo asociativo. Esta especie pentacoordinada puede dar lugar al otro isómero, a través de un complejo iónico, $[\text{PtClP}_3]\text{Cl}$, o directamente mediante una pseudorrotación de Berry (figura 3.2).⁹⁻¹¹

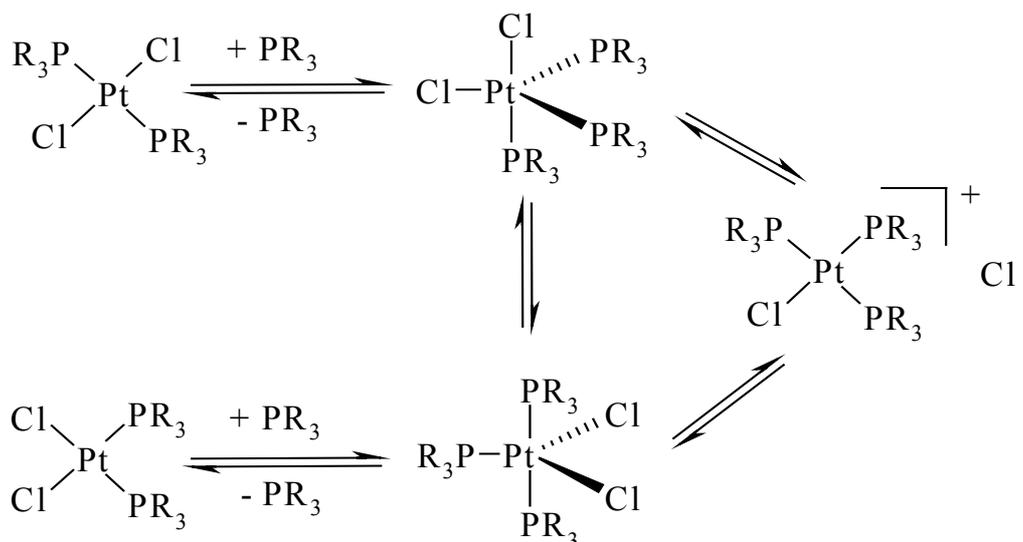


Figura 3.2: Mecanismo de isomerización aceptado para $\text{PtX}_2(\text{PR}_3)_2$

Según la Teoría de Grupos, los espectros IR de compuestos planocuadrados de fórmula *cis*- $[\text{PtCl}_2(\text{PR}_3)_2]$ presentan dos vibraciones de tensión $\nu(\text{Pt}-\text{Cl})$ alrededor de 317 y 290 cm^{-1} , mientras que los complejos de geometría *trans* presentan una sola frecuencia de tensión $\nu(\text{Pt}-\text{Cl})$ alrededor de 317 cm^{-1} (figura 2.1).^{12,13} Debido a que **P1** es poco soluble en la mayoría de los disolventes deuterados, con la ayuda de la espectroscopía IR se puede saber si hemos obtenido el isómero *cis*, tras la isomerización del *trans* en CHCl_3 .

La ^{31}P -RMN también permite diferenciar entre los complejos *cis* y *trans* de platino, por comparación de los valores de $^1J(^{31}\text{P}-^{195}\text{Pt})$.¹⁴ Podemos encontrar en la bibliografía que los complejos *cis*, como por ejemplo *cis*- $[\text{PtCl}_2(\text{PPh}_3)_2]$, muestran constantes de acoplamiento entre ^{195}Pt y ^{31}P mayores que las del isómero *trans*, debido a que estos últimos sufren una disminución en la fortaleza del enlace $\text{Pt}-\text{P}$.^{15,16} Esta disminución en la fortaleza del enlace de los complejos *trans*- $[\text{PtCl}_2(\text{PR}_3)_2]$ se produce por tener las dos fosfinas enfrentadas, produciendo cada una un efecto *trans* que es contrarrestado por la otra. En el caso de los complejos de geometría *cis*, el mayor efecto

trans de la fosfina respecto al ligando cloro no se contrarresta, por lo que no produce el debilitamiento del enlace Pt-P, pero sí el del enlace Pt-Cl. Además, las señales que se observan para los compuestos *cis* aparecen a campos más altos que las de los complejos *trans*; por tanto, mediante ^{31}P -RMN se puede observar como se produce la isomerización del isómero *trans*- $[\text{PtCl}_2(\text{PR}_3)_2]$ al correspondiente isómero *cis*.¹⁷ En el caso del complejo (**P1**), la isomerización *trans-cis* en disolución ocurre tan rápido que es prácticamente imposible poder detectar el isómero *trans* mediante ^{31}P -RMN.

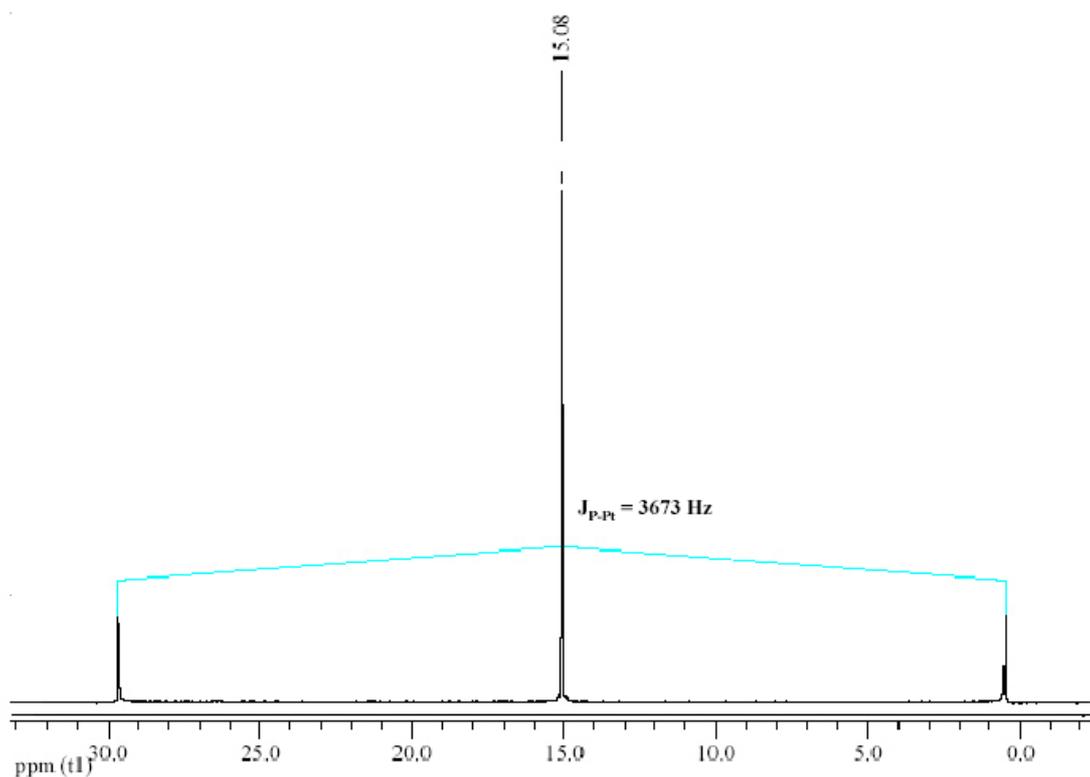


Figura 3.3: ^{31}P -RMN del complejo *cis*- $[\text{PtCl}_2(\text{PPh}_3)_2]$ en DMSO-d_6

Con el fin de comprobar por ^{31}P -RMN la isomerización de los compuestos *cis* y *trans* en compuestos $[\text{PtCl}_2(\text{PR}_3)_2]$, sintetizamos el compuesto $[\text{PtCl}_2(\text{PBu}_3)_2]$. En este caso si hemos podido detectar el equilibrio entre los isómeros *cis* ($J_{\text{P-Pt}} = 3519 \text{ Hz}$) y *trans* ($J_{\text{P-Pt}} = 2382 \text{ Hz}$), observando ambos isómeros en distintas proporciones (figura 3.4).¹⁸

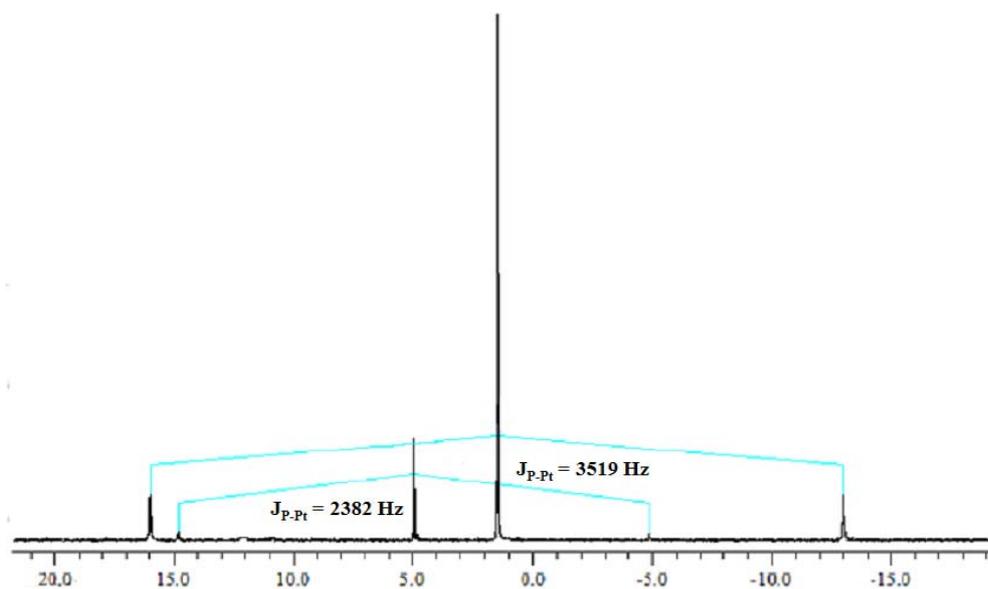


Figura 3.4: ^{31}P -RMN de la mezcla de *cis* y *trans*- $[\text{PtCl}_2(\text{PBu}_3)_2]$ en CDCl_3

En los complejos dinucleares de fórmula general $[\text{Pt}_2\text{Cl}_2(\mu\text{-Cl})_2(\text{PR}_3)_2]$ los puentes cloro son susceptibles de rotura por nucleófilos como CO_2 , iminas, aminas, olefinas y sulfóxidos dando lugar a la formación de un amplio rango de complejos mononucleares de platino con geometría *trans*.¹⁹⁻²²

Los complejos dinucleares de Pt de fórmula general $[\text{Pt}_2\text{Cl}_2(\mu\text{-Cl})_2(\text{PR}_3)_2]$ presentan en IR una banda $\nu(\text{Pt-Cl})_\tau$ (τ = terminal), una banda $\nu(\text{Pt-Cl})_\mu$ (μ = puente) en *trans* al Cl y una banda $\nu(\text{Pt-Cl})_\mu$ en *trans* al ligando fosfina (tabla 2.2 y figura 2.2).^{13,23} La diferencia en las frecuencias de tensión observadas para los enlaces Pt-Cl_τ y Pt-Cl_μ parece ser consecuencia del fuerte efecto *trans* que produce el grupo fosfina sobre el Cl puente en *trans* a ésta, produciendo un debilitamiento de este enlace Pt-Cl_μ y, por lo tanto, una disminución en la frecuencia de vibración.^{24,25}

Las constantes de acoplamiento $^1J(^{31}\text{P-}^{195}\text{Pt})$ observadas en los espectros de ^{31}P -RMN y ^{195}Pt -RMN, son superiores a 4000 Hz, datos que están de acuerdo con la bibliografía.^{6,13,25}

El complejo dinuclear *trans*- $[\text{Pt}_2\text{Cl}_2(\mu\text{-Cl})_2(\text{PPh}_3)_2]$ (**D1**) (tabla 2.19 y 2.20), se ha podido caracterizar mediante difracción de rayos-X.

El complejo **D1** presenta dos átomos de platino unidos por puentes cloro. Cada átomo de platino está unido a cuatro átomos en un entorno planocuadrado.²⁶⁻²⁹ La distancia Pt(1)⋯Pt(1A) es de 3.52 Å. Se puede observar que la distancia Pt-P es de 2.21 Å y la Pt-Cl_τ de 2.28 Å, mientras que las distancias Pt-Cl_μ son 2.40 Å y 2.31 Å, en *trans*, respectivamente, a los ligandos fosfina y cloro terminales. La distancia Pt-Cl_μ en *trans* a la fosfina es la mayor distancia de enlace en torno al átomo de Pt.²⁸ Este dato está de acuerdo con el hecho de que es un enlace más débil, con menor frecuencia de vibración en IR y más lábil, como se predice de la mayor influencia *trans* del ligando fosfina.¹ El ángulo P(1)-Pt(1)-Cl(1) de 96.73°. Este valor del ángulo puede ser debido a un intento por parte de la molécula de minimizar los impedimentos estéricos producidos por las fosfinas.³⁰

En dímeros semejantes con fosfinas encontrados en la bibliografía, los ángulos C-P-C de las fosfinas, son aproximadamente de 105°.³⁰⁻³² En el complejo **D1** el ángulo C(13)-P(1)-C(7) es de 109.8(2)°. Este ángulo es posiblemente mayor por los impedimentos estéricos existentes entre los anillos aromáticos que comprenden a los átomos C(13) y C(7).

Las distancias existentes entre el C(19)-H(19) perteneciente a una molécula de CHCl₃, y el ligando terminal Cl_τ(2) de la molécula **D1** (figura 3.5B), parecen indicar la existencia de interacciones C-H⋯Cl del tipo enlace de hidrógeno (tabla 3.1), que han sido descritas anteriormente en la bibliografía.³³⁻³⁵ Algo más controvertidas pueden ser las interacciones C-H⋯Cl que implican al ligando puente Cl_μ(1) y los átomos de hidrógeno de grupos fenilo de dímeros adyacentes (figura 3.5C y 3.5D), ya que no hemos encontrado en la bibliografía situaciones análogas. Sin embargo, la ausencia de otro tipo de interacciones entre las distintas moléculas parece sugerir la existencia de estos enlaces de hidrógeno (tabla 3.1).

	D-H⋯A	d(D-H)	d(H...A)	d(D...A)	<(DHA)
B	C(19)-H(19)⋯Cl(2) #1	1.000	2.72(1)	3.50(1)	135.1
C	C(4)-H(4)⋯Cl(1) #2	0.950	2.79(6)	3.70(3)	160.1
D	C(15)-H(15)⋯Cl(1) #3	0.950	2.83(5)	3.51(9)	129.8

Tabla 3.1: Posibles interacciones C-H⋯Cl en **D1**. Transformaciones de simetría usadas para generar átomos equivalentes: #1 1-x, y+1/2, 1/2-z; #2 2-x, 2-y, -z; #3 x, 1/2-y, z-1/2.

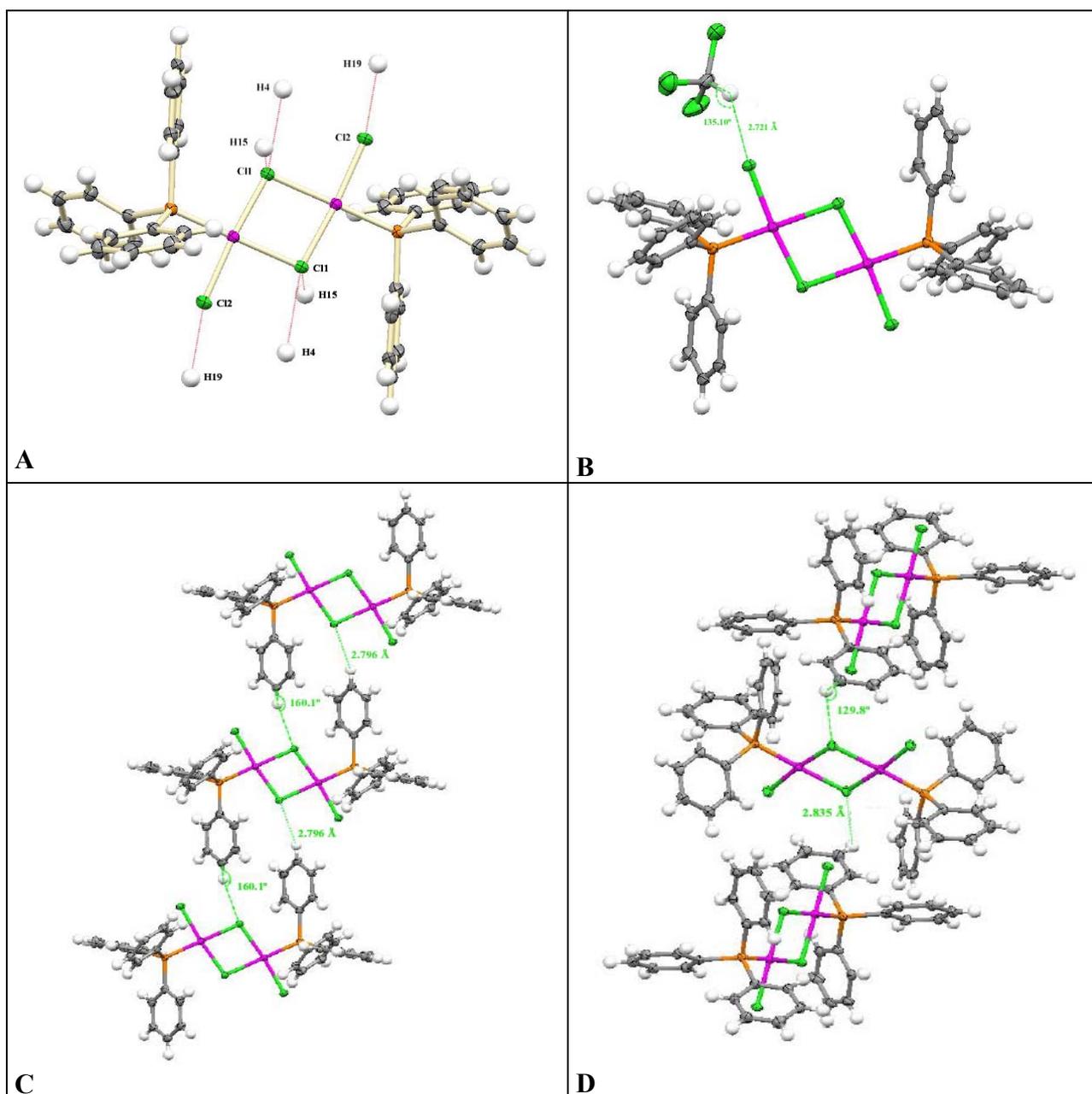


Figura 3.5: Posibles enlaces C-H...Cl en **D1**. (A) Vista general de los enlaces C-H...Cl en la molécula **D1**. (B) Interacción C(19)-H(19)...Cl(2). (C) Interacción C(4)-H(4)...Cl(1). (D) Interacción C(15)-H(15)...Cl(1).

Los compuestos de fórmula general *trans*-[PtCl₂(amina)(PPh₃)] presentan en el espectro de IR una sola banda de tensión $\nu(\text{Pt-Cl})$ aproximadamente a 343 cm⁻¹, y una banda ancha de tensión $\nu(\text{Pt-N})$ alrededor de 430 cm⁻¹, como es de esperar según la Teoría de Grupos para complejos *trans*-[PtCl₂(L)(L')].

Las frecuencias de vibración $\nu(\text{Pt-N})$ para complejos *trans*-[PtCl₂(amina)(PPh₃)] ($\nu_{\text{Pt-N}} \approx 430 \text{ cm}^{-1}$) son más bajas que las bandas de tensión $\nu(\text{Pt-N})$ encontradas para los complejos de fórmula general *trans*-[PtCl₂(amina)(amina’)] ($\nu_{\text{Pt-N}} \approx 440 \text{ cm}^{-1}$). Esto es debido probablemente a la influencia del efecto *trans* del ligando fosfina, mientras que las bandas $\nu(\text{Pt-Cl})$ son independientes de la influencia de este ligando.^{15,36,37} Este mayor efecto *trans* del átomo de fósforo, provoca un debilitamiento del enlace Pt-N, que también se observa en las estructuras de rayos X como se discutirá posteriormente.

En el espectro de ¹H-RMN se observa el desapantallamiento de los protones del grupo NH₂ respecto a los ligandos de partida. Estas señales, por tanto, aparecen a campos más bajos (tabla 3.2).

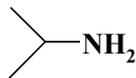
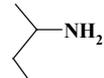
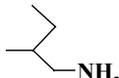
			
	isopropilamina	1-metilpropilamina	2-metilbutilamina
amina libre	≈1.2, sa, 2H	≈1.2, sa, 2H	≈1.2, da, 2H
<i>trans</i> -[PtCl ₂ (amina)(PPh ₃)]	3.9, sa, 2H	3.9, sa, 2H	3.9, sa, 2H

Tabla 3.2: Comparación en ¹H-RMN (acetona-d₆) del desapantallamiento de los grupos amina en: la amina libre y *trans*-[PtCl₂(amina)(PPh₃)]. Desplazamiento químico en ppm. sa: singlete ancho; da: doblete ancho.

Se puede observar que en el complejo **P3**, el grupo NH₂ del ligando isopropilamina está a campos más bajos que el grupo CH (figura 3.6). Este efecto, el cual es debido al fuerte efecto *trans* del ligando fosfina, se repite para el resto de los complejos de platino(II) con la trifenilfosfina en *trans*.

Las aminas 1-metilpropilamina y 2-metilbutilamina presentan un centro quiral o estereogénico y, por tanto, muestran en sus espectros de ¹H-RMN protones diastereotópicos, es decir no equivalentes, que aparecen en el espectro a distintos ppm (figuras 3.7 y 3.8).

Para el complejo **P4**, el carbono quiral es el denominado α y los protones diastereotópicos son los unidos al carbono β' (figura 3.7).

En el caso de **P5**, el carbono quiral es el β , y los protones unidos a los carbonos α y γ son los diastereotópicos (figura 3.8).

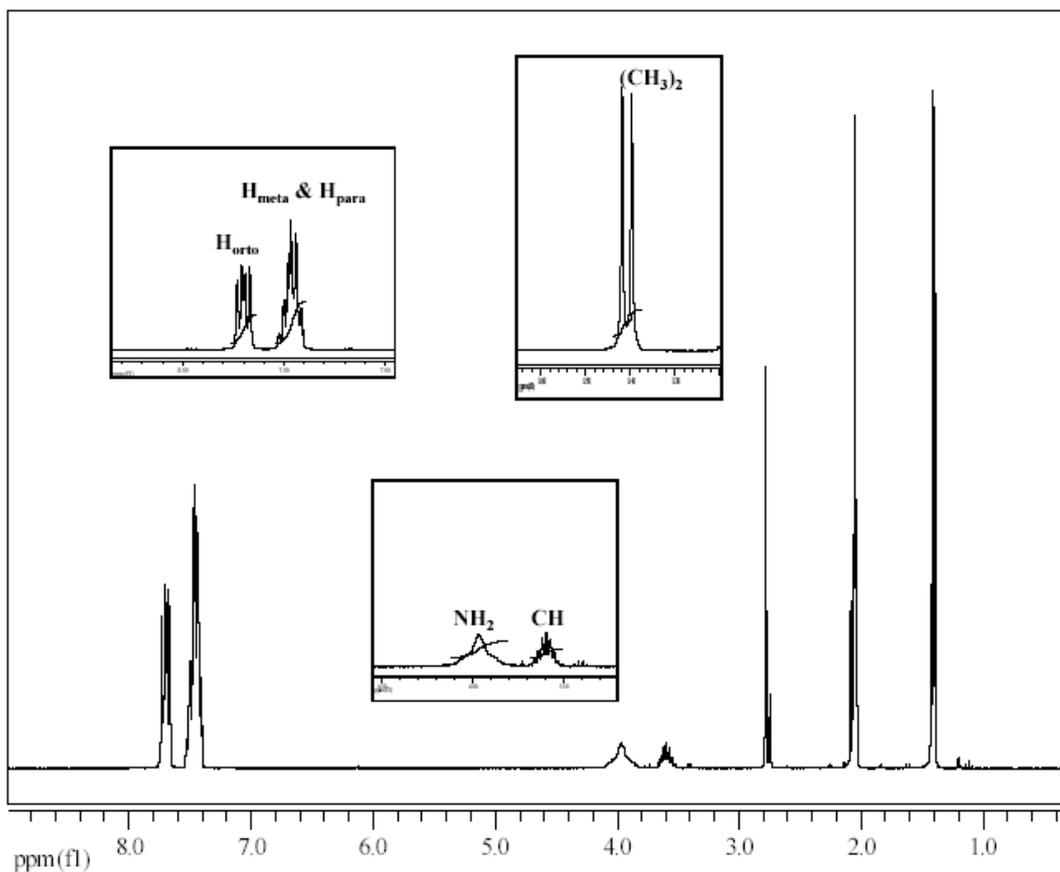


Figura 3.6: Espectro de ^1H -RMN en acetona- d_6 del complejo *trans*- $[\text{PtCl}_2(\text{isopropilamina})(\text{PPh}_3)]$, **P3**.

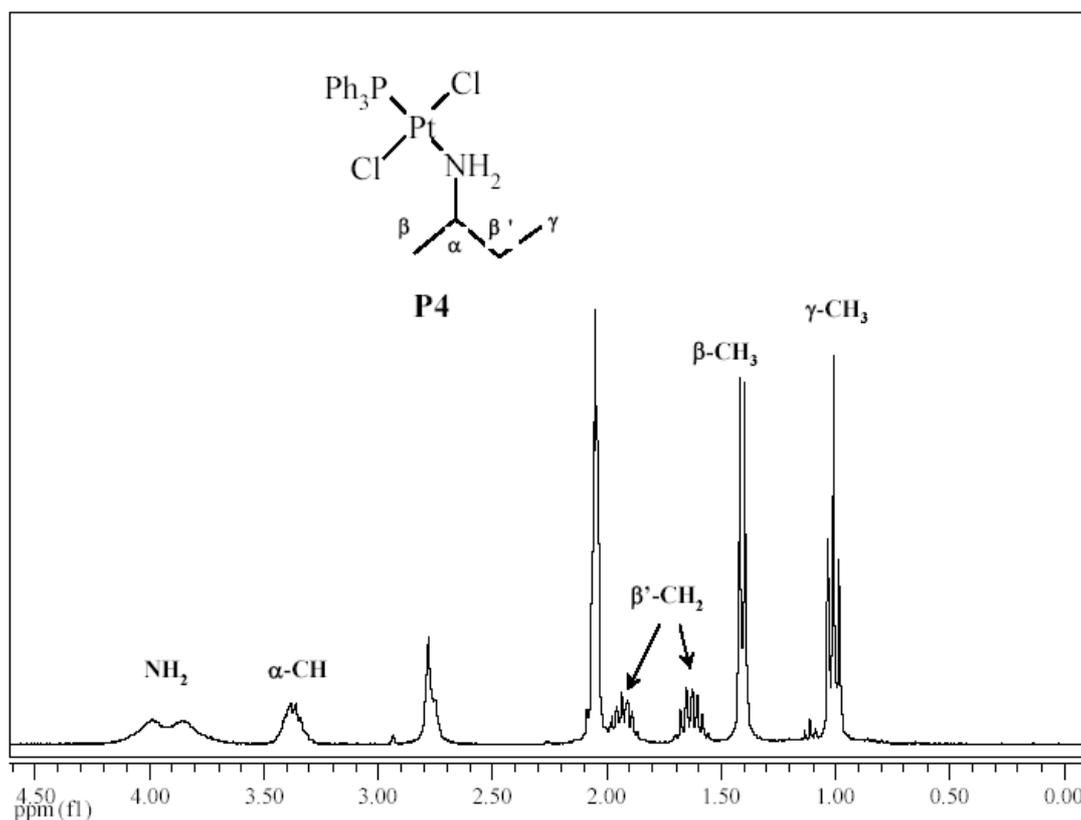


Figura 3.7: Zona de ^1H -RMN correspondiente a la región de la amina alifática del complejo **P4**.

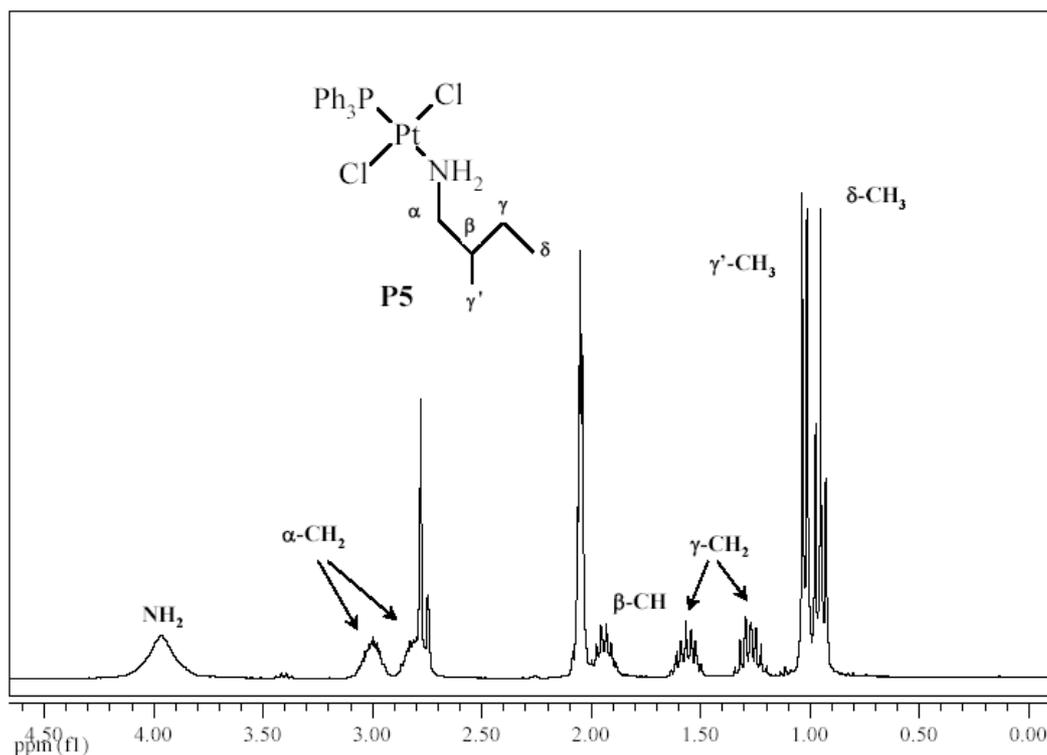


Figura 3.8: Zona de ^1H -RMN correspondiente a la región de la amina alifática del complejo **P5**.

El espectro de ^{13}C -RMN resulta más sencillo que el espectro de ^1H -RMN (figura 3.9). Debido al acoplamiento de los $J(^{13}\text{C}-^{31}\text{P})$, las señales del anillo aromático se observan como dobletes, llegándose a observar la constante $^4J_{\text{C-P}}$ del C_{para} a través de cuatro enlaces.

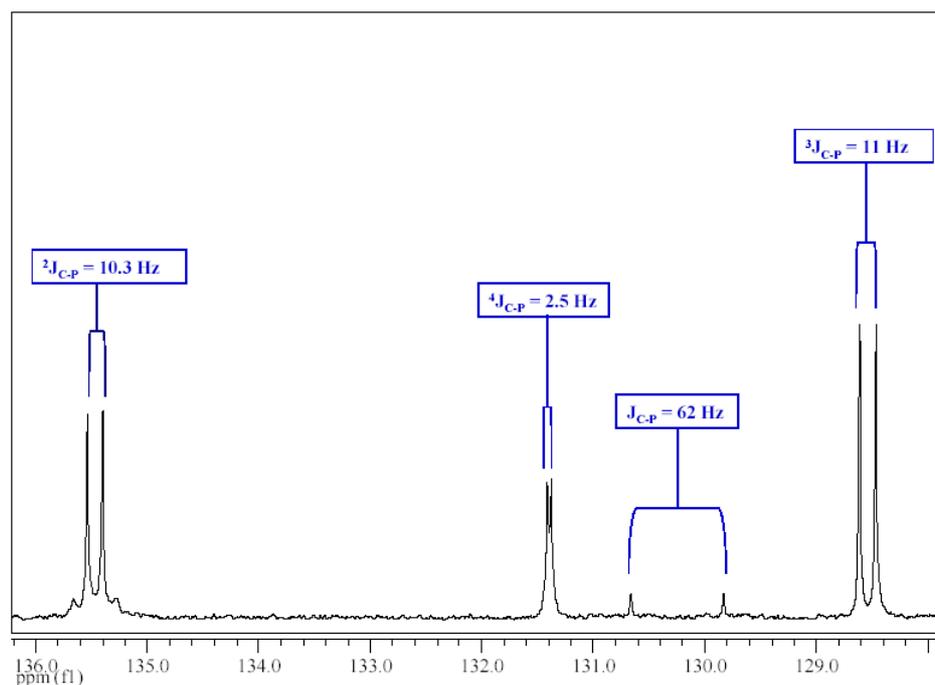


Figura 3.9: Zona correspondiente a la región de aromáticos en ^{13}C -RMN para el complejo **P5**.

Los complejos sintetizados de fórmula *trans*-[PtCl₂(amina)(PPh₃)] presentan una constante de acoplamiento $^1J_{\text{P-Pt}}$ en ^{31}P -RMN alrededor de 3600 Hz, valor normal para este tipo de complejos con geometría *trans* (figura 3.10).^{14,15,38,39}

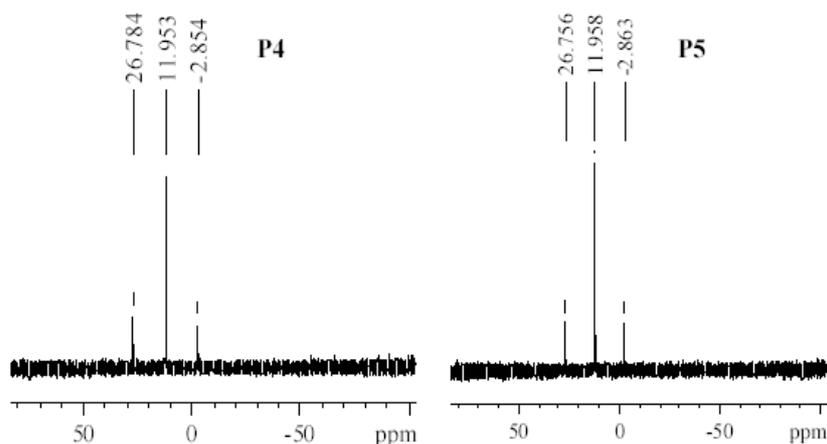


Figura 3.10: Espectros de ^{31}P -RMN de los complejos P4 y P5.

Mediante ^{195}Pt -RMN se confirma la obtención de un único complejo de platino. Esta técnica complementa al análisis elemental, sin llegar a sustituirlo. En el caso de los complejos *trans*-[PtCl₂(amina)(PPh₃)] debido al acoplamiento del ^{195}Pt con el ^{31}P , en los espectros se observa siempre un doblete en la zona de -3700 ppm (tablas 2.8 y 2.10). La constante de acoplamiento $^1J_{\text{Pt-P}}$ debe ser prácticamente la misma que la que se obtiene mediante ^{31}P -RMN y, como se mencionó anteriormente, aproximadamente de 3600 Hz (figura 3.11).³⁹⁻⁴²

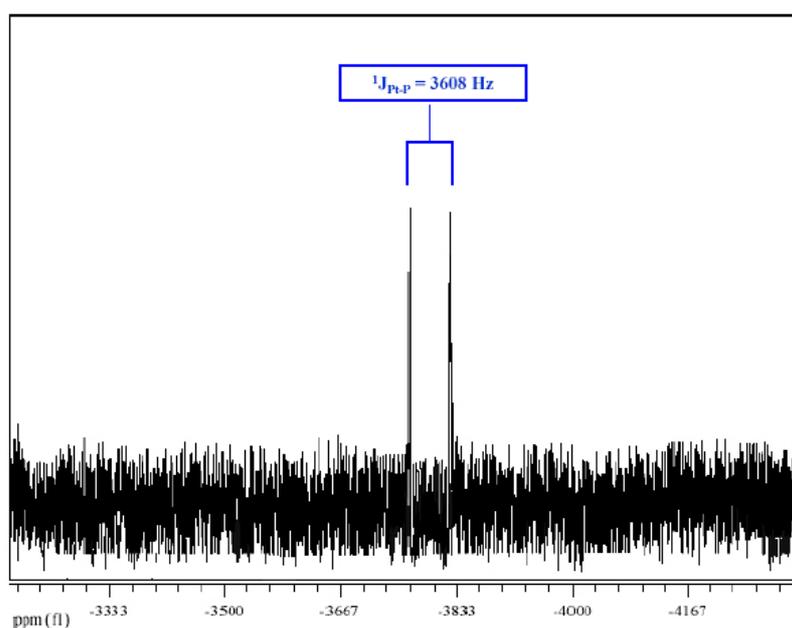


Figura 3.11: Espectro de ^{195}Pt -RMN en acetona-d₆ del complejo *trans*-[PtCl₂(isopropilamina)(PPh₃)].

Se ha determinado la estructura de rayos-X para los complejos **P3**, **P4-Rac**, **P4-S**, **P5-Rac** y **P5-S** (tablas 2.21-2.33).

Todos los complejos *trans*-[PtCl₂(amina)(PPh₃)] presentan una geometría planocuadrada con valores de distancias típicas para complejos de Pt(II).^{40,43,44} No se han encontrado diferencias significativas en la comparación de las distancias y ángulos en torno al átomo de platino de los complejos sintetizados, con complejos análogos de fórmula general *trans*-[PtCl₂(NR₃)(PR₃)] (base de datos CSD).^{45,46}

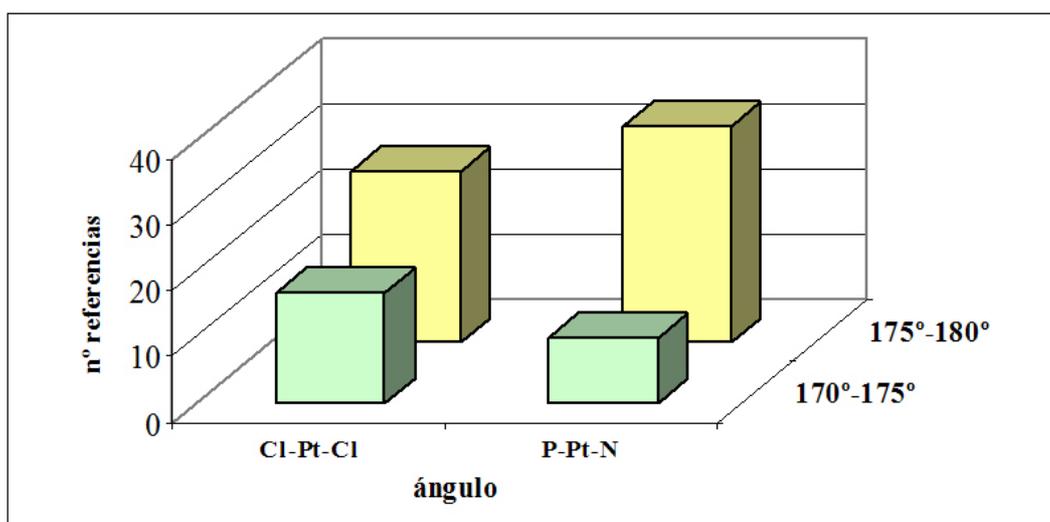


Figura 3.12: Rangos de ángulos (°) Cl-Pt-Cl y P-Pt-N en complejos de fórmula *trans*-[PtCl₂(NR₃)(PR₃)] encontrados en la base de datos CSD. Número total de referencias encontradas en CSD: 43. Incluidos en el gráfico los valores obtenidos para **P3**, **P4-Rac**, **P4-S**, **P5-Rac** y **P5-S**.

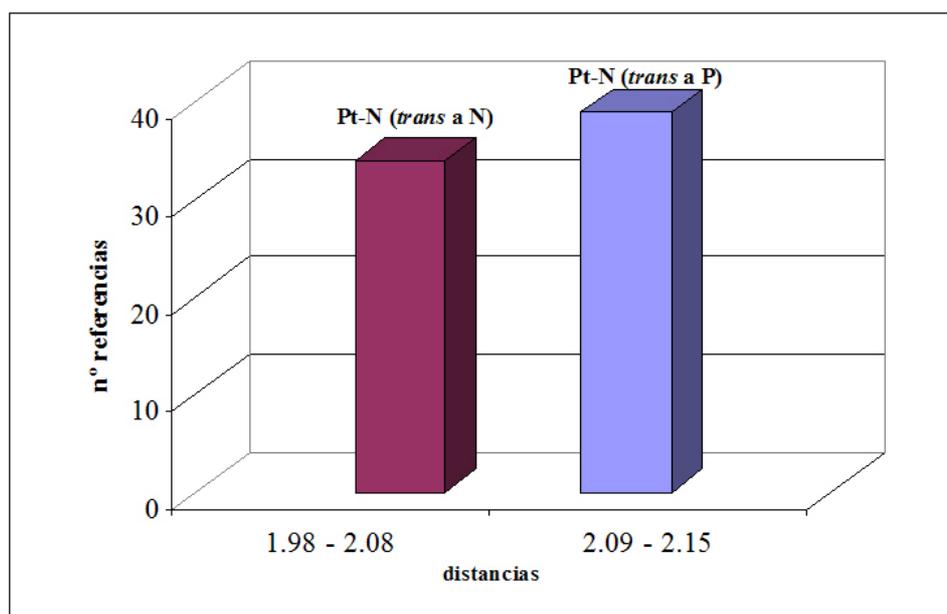


Figura 3.13: Valores para las distancias (Å) Pt-N *trans* a aminas o a fosfinas encontrados en la base de datos CSD. Incluidos en el gráfico los valores obtenidos para **P3**, **P4**, **P4-S**, **P5**, **P5-S**, **N2** y **N3**.

La distancia Pt-P en los complejos *trans*-[PtCl₂(amina)(PPh₃)] (≈ 2.24 Å) es más corta que la encontrada para complejos de platino con dos fosfinas en *trans* de fórmula *trans*-[PtCl₂(PR₃)(PR₃')] (2.32 Å).^{32,47} La diferencia es debida al diferente efecto *trans* entre la PPh₃ y la amina, que hace que la distancia P-Pt sea más corta. En el caso de dos fosfinas en *trans* ambos efectos *trans* son contrarrestados y, por lo tanto, esta distancia sería más larga.

Las distancias Pt-N son mayores que la observada en el complejo *trans*-[PtCl₂(dma)(ipa)] (2.065 Å) y en los complejos, *trans*-[PtCl₂(amina)(amina')], **N2** y **N3**, preparados en esta tesis (tablas 2.35 y 2.38).^{36,48} Estos datos son consistentes con la influencia *trans* de las fosfinas respecto a otros ligandos.^{1,2} No hay diferencias significativas respecto a las distancias *trans* Pt-Cl de estos complejos con los encontrados en complejos como *trans*-[PtCl₂(benzoquinolina)(PEt₃)], *trans*-[PtCl₂(PPh₃)(PPh₃)] e incluso *trans*-[PtCl₂(dma)(ipa)] (figuras 3.12 y 3.13).^{32,36,40,44}

La comparación de las distancias y ángulos de los complejos *trans*-[PtCl₂(amina)(PPh₃)] con el dímero *trans*-[Pt₂Cl₂(μ -Cl)₂(PPh₃)₂] muestra que la distancia Pt-P para **D1** (2.21 Å) es menor que para los complejos **P3**, **P4** y **P5** (2.239 Å, 2.243 Å y 2.235 Å, respectivamente). Esto es debido a que los Cl _{μ} en **D1**, al estar compartidos por dos átomos de Pt, presentan un efecto *trans* inferior incluso al producido por las aminas, lo cual está también de acuerdo con el hecho de que la amina desplace al Cl _{μ} en posición *trans* a la fosfina para la síntesis de estos complejos finales.

Por otro lado, las distancias Pt-Cl en los complejos *trans*-[PtCl₂(amina)(PPh₃)] son cercanas a la distancia Pt-Cl _{τ} en **D1** (2.28 Å) y más cortas que las distancias Pt-Cl _{μ} (2.40 Å y 2.31 Å), valores también consistentes con la disminución del efecto *trans* en los Cl _{μ} por debajo del efecto *trans* que producen las aminas.

El complejo **P3** muestra en su estructura de R-X (figura 3.14) un enlace de hidrógeno intermolecular N(1)-H(1B)...Cl(2) (tabla 2.23).

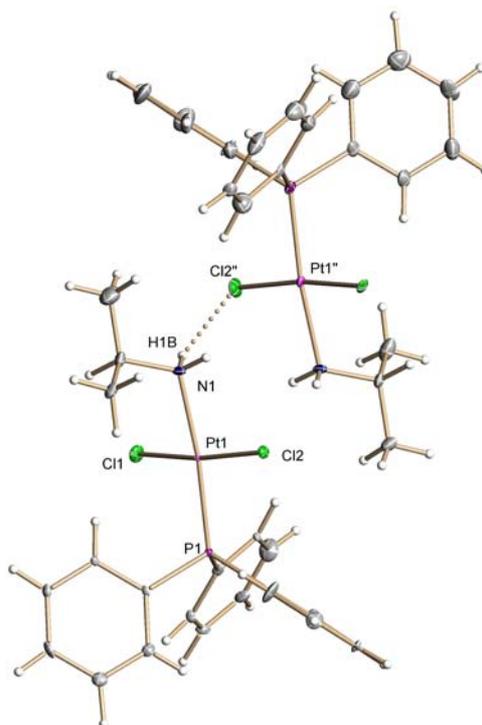


Figura 3.14: Enlace de hidrógeno intermolecular en **P3**.

La estructura cristalográfica del complejo *trans*-[PtCl₂(1-metilpropilamina)(PPh₃)] (**P4-Rac**) consiste en una sola molécula por celdilla unidad, en la cual la PPh₃ y la 1-metilpropilamina forman un enlace σ con el átomo de platino en configuración *trans* (figura 2.6). Además, el complejo **P4-Rac** muestra un enlace de hidrógeno (tabla 2.26), al igual que **P3**.

A diferencia de **P4-Rac**, la estructura cristalográfica del compuesto *trans*-[PtCl₂(S-1-metilpropilamina)(PPh₃)] (**P4-S**) consiste en dos moléculas diferentes por celdilla unidad (figura 2.7). Estas dos moléculas de la celdilla presentan, entre ellas, algunas diferencias importantes en ángulos y distancias.

En la estructura cristalográfica del complejo **P4-S**, en la molécula que contiene al Pt(2) se observa un ángulo Cl(3)-Pt(2)-Cl(4) de 169.99° (figura 3.15). Este ángulo está ligeramente más cerrado que el ángulo Cl(1)-Pt(1)-Cl(2) ($\Delta = 4.6^\circ$) (tabla 2.28) de la misma estructura cristalográfica; además, está aproximadamente 4° más cerrado que el resto de ángulos Cl-Pt-Cl de los complejos con fórmula *trans*-[PtCl₂(amina)(PPh₃)] presentados en esta tesis. El siguiente ángulo más pequeño encontrado en la base de

datos CSD es de 172.37° . La presencia de este ángulo más pequeño en la molécula que contiene al Pt(2) puede ser debido a impedimentos estéricos entre los anillos aromáticos de la fosfina y los átomos de cloro unidos al platino. Estos impedimentos no se observan en la molécula que contiene al Pt(1).

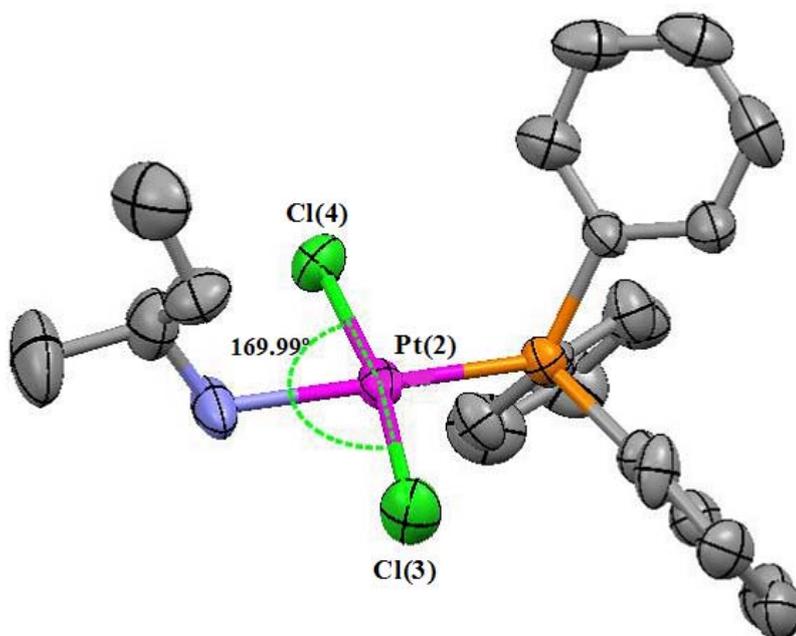
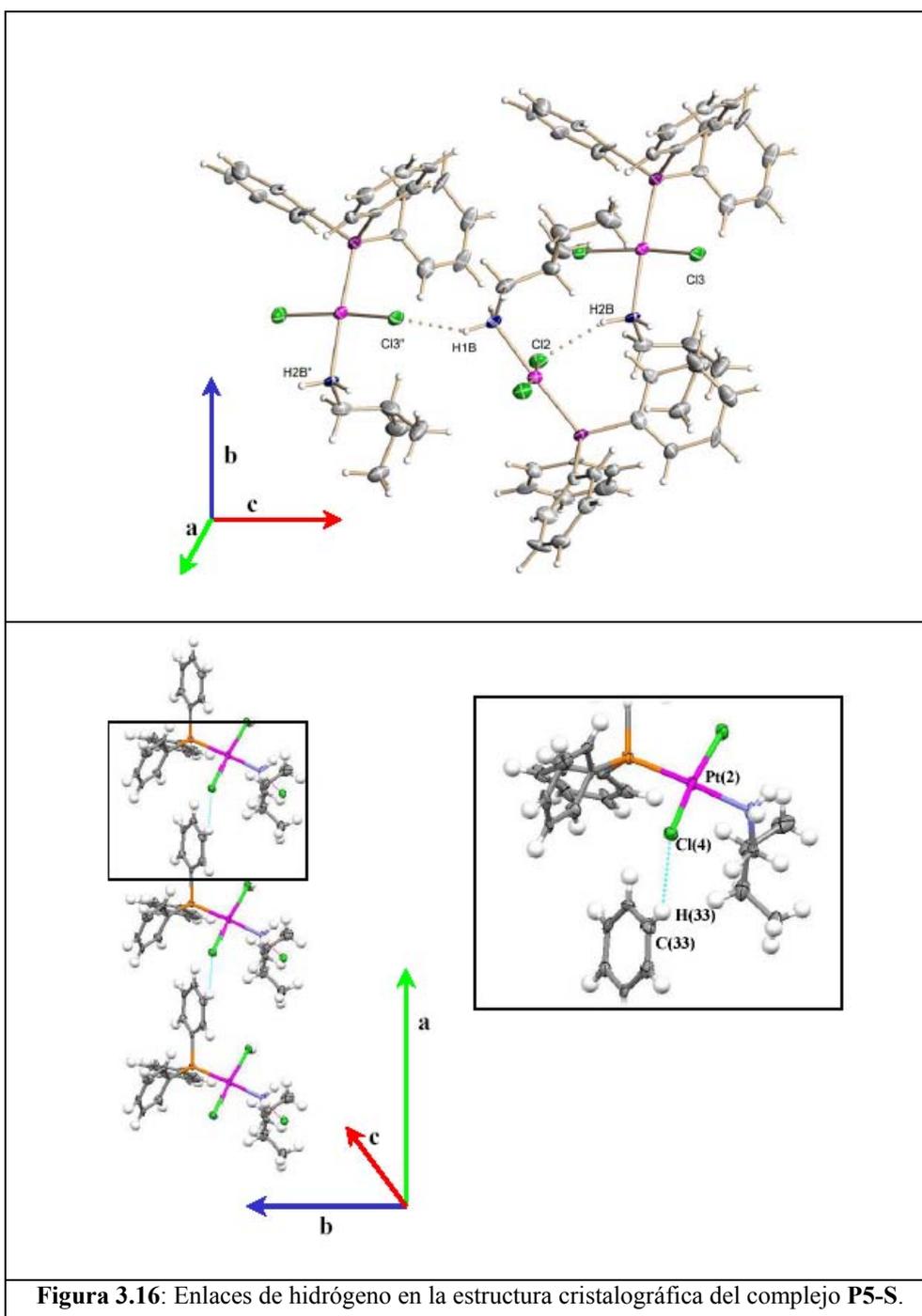


Figura 3.15: Ángulo Cl(3)-Pt(2)-Cl(4) en la estructura cristalográfica del complejo **P4-S**

La estructura cristalográfica de los complejos **P5-Rac** y **P5-S** consisten en cuatro y dos moléculas diferentes por celdilla unidad, respectivamente (figura 2.8 y 2.9). Al igual que en **P4-S** existen algunas diferencias en los ángulos y distancias entre las moléculas que componen las respectivas celdillas, aunque no son tan significativas como en el caso anterior.

En el caso de **P5-Rac** no se ha detectado ningún tipo de interacción por enlace de hidrógeno mientras que para **P5-S** se han encontrado dos enlaces de hidrógeno intermoleculares de tipo N-H \cdots Cl (tabla 2.23). Además, se ha detectado la presencia de un enlace C-H \cdots Cl intermolecular entre C(33)-H(33) y el Cl(4) en la molécula que contiene el Pt(2) (figura 3.16 y tabla 3.3).



D-H···A	d(D-H)	d(H···A)	d(D···A)	<(DHA)
C(33)-H(33)···Cl(4) #1	0.950	2.69(8)	3.46(5)	138.2

Tabla 3.3: Enlace de hidrógeno C-H···Cl en la molécula que presenta el Pt(2) de **P5-S**. Transformaciones de simetría usadas para generar átomos equivalentes: #1 x-1, y, z

3.1.2. *trans*-[PtCl₂(amina)(amina')]

La síntesis de los complejos de fórmula general *trans*-[PtCl₂(amina)(amina')], donde amina = NH₃ ó isopropilamina, y amina' = 3- ó 4-hidroximetilpiridina, se puede realizar a partir de dos vías, de acuerdo con el siguiente esquema (figura 3.17).

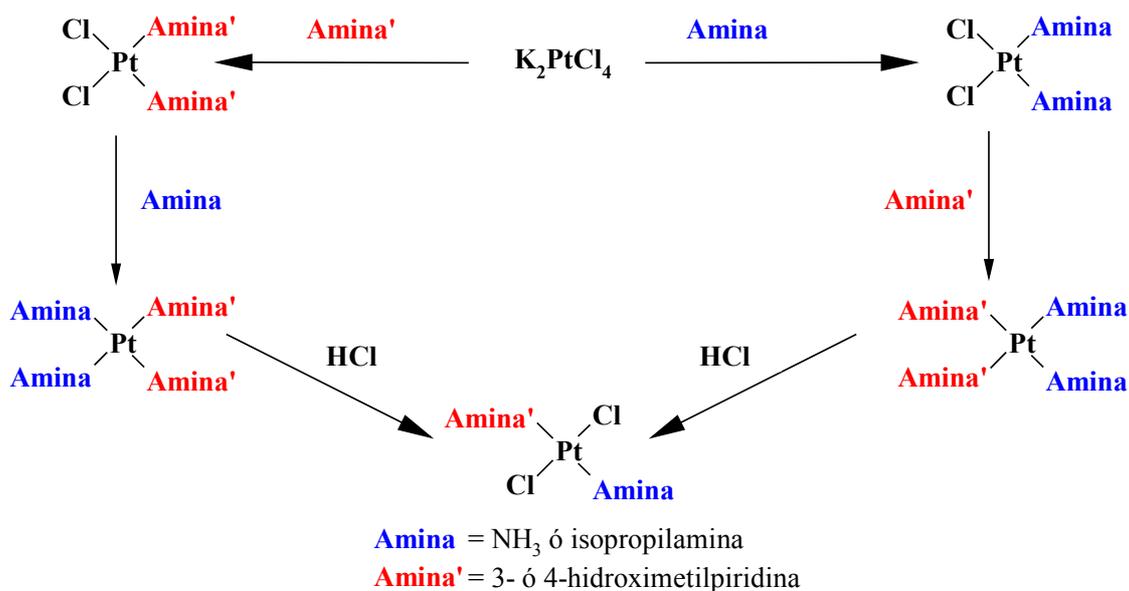


Figura 3.17: Esquema de las dos posibles vías de síntesis para N2 y N3.

Un estudio de las condiciones de reacción y rendimiento pone de manifiesto que en el caso de la síntesis de N2 y N3 es mejor partir de *cis*-[PtCl₂(isopropilamina)₂], y para la síntesis de N4 y N5 partir de *cis*-[PtCl₂(NH₃)₂], añadiendo posteriormente en todos los casos la 3- ó 4-hidroximetilpiridina.

Es habitual una estequiometría 1:4 al adicionar la amina debido a que el mayor efecto *trans* del cloruro sobre la amina produciría un bajo rendimiento. Al añadir exceso de amina forzamos las condiciones para que entren los ligandos amina en el entorno del platino.

Aunque cinéticamente esta favorecida la salida de los ligandos amina respecto a los cloruros, debido al efecto *trans* mencionado anteriormente, el enlace Pt-amina es mucho más estable termodinámicamente que el enlace Pt-Cl, por lo que es necesario añadir cantidades superiores de HCl a la estequiométrica para producir la salida de los ligandos amina.

Como hemos indicado anteriormente, la geometría *cis* o *trans* se confirma mediante espectroscopía IR. En los complejos de fórmula general $[\text{PtCl}_2(\text{amina})_2]$, la presencia de dos bandas de tensión $\nu(\text{Pt-Cl})$ en la zona de 325 cm^{-1} confirma al isómero *cis* (tabla 2.1), mientras que para los isómeros *trans* solamente se observaría una banda de tensión $\nu(\text{Pt-Cl})$ entre 335 y 340 cm^{-1} .¹²

El hecho de que los complejos *cis*- $[\text{PtCl}_2(\text{amina})_2]$ presenten las bandas Pt-Cl a mayores frecuencias que las observadas para los complejos *cis*- $[\text{PtCl}_2(\text{PR}_3)_2]$ está de acuerdo con el mayor efecto *trans* que presentan las fosfinas en comparación con las aminas. El mayor efecto *trans* hace más débil el enlace Pt-Cl y, por lo tanto, provoca que la banda $\nu(\text{Pt-Cl})$ en los complejos *cis*- $[\text{PtCl}_2(\text{PR}_3)_2]$ se observe a menor frecuencia.

En la figura 3.18 se puede observar que el complejo *cis*- $[\text{PtCl}_2(\text{isopropilamina})_2]$ muestran una banda ancha con dos picos a 322 y 316 cm^{-1} , mientras que el complejo *cis*- $[\text{PtCl}_2(\text{PPh}_3)_2]$ muestran dos bandas claramente diferenciadas a 317 y 292 cm^{-1} .

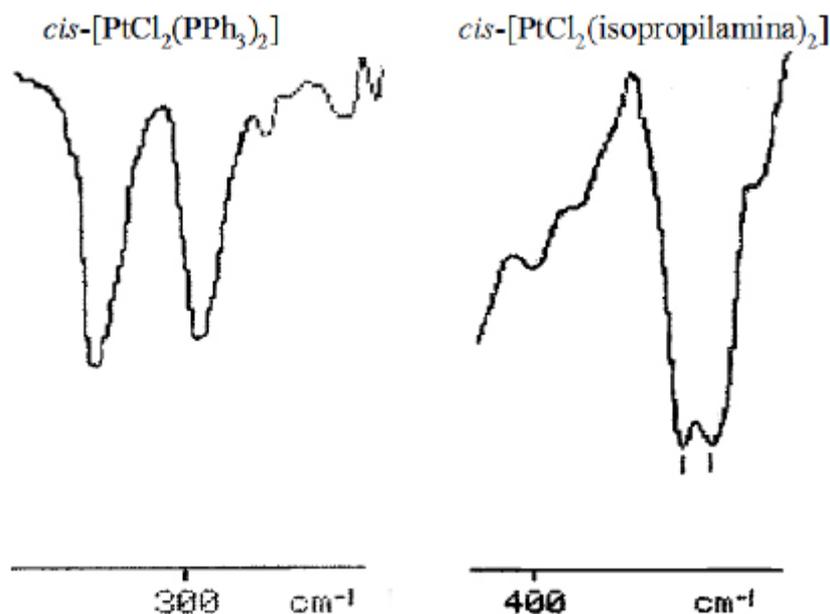


Figura 3.18: Diferencia entre las bandas $\nu(\text{Pt-Cl})$ observadas para los complejos *cis*- $[\text{PtCl}_2(\text{PPh}_3)_2]$ y *cis*- $[\text{PtCl}_2(\text{isopropilamina})_2]$.

El complejo *cis*- $[\text{PtCl}_2(\text{isopropilamina})_2]$ (**N1**), es insoluble en agua y en la mayoría de los disolventes orgánicos. Por este motivo los espectros de RMN (tabla 2.5) se han registrado en DMSO- d_6 . El espectro de **N1** es similar al de la amina libre, si bien se observa un desplazamiento de las señales a campo bajo, efecto más acusado en los protones del grupo NH_2 donde se observa un gran desplazamiento.⁴⁹

Los complejos **N4** y **N5**, sintetizados y caracterizados por primera vez en nuestro grupo de investigación,⁵⁰ no mostraron valores de citotoxicidad interesantes, motivo por el que se hará solamente una breve mención de los mismos. Posteriormente, otro grupo de investigación ha realizado otros estudios con estos complejos, con los que se podrá realizar una comparación de los resultados biológicos.^{51,52}

Mediante espectroscopía IR se observa que todos los complejos sintetizados de fórmula general *trans*-[PtCl₂(amina)(amina')] presentan una sola banda $\nu(\text{Pt-Cl})$ entre 335 y 340 cm⁻¹, y una banda ancha $\nu(\text{Pt-N})$ alrededor de 440 cm⁻¹, como predice la Teoría de Grupos para su geometría *trans*.

Como se comentó anteriormente, las bandas $\nu(\text{Pt-N})$ de los complejos *trans*-[PtCl₂(amina)(amina')] aparecen a frecuencias de vibración más altas que las bandas de tensión $\nu(\text{Pt-N})$ de los complejos *trans*-[PtCl₂(amina)(fosfina)]. debido a que los ligandos amina no sufren en este caso el fuerte efecto *trans* del ligando fosfina.

En el espectro de ¹H-RMN, como en los casos anteriores, se observa el desapantallamiento de las señales con respecto a los ligandos de partida, a excepción del grupo hidroximetilo de las piridinas. La comparación de los espectros de ¹H-RMN de los complejos **N2** y **N3** con sus respectivos ligandos muestra en ambos casos que la unión al Pt produce un gran apantallamiento del grupo hidroximetilo desplazándose las señales a campos más altos (figuras 3.19-3.22). Además, se produce el acoplamiento del OH con el CH₂ (³J_{HC-OH} = 6.0 Hz), el cual no se produce en el ligando libre debido al intercambio del protón del grupo OH con el disolvente. Este acoplamiento desaparece con la adición de unas gotas de D₂O al favorecerse el intercambio del protón del grupo hidroximetilo con este disolvente. Sin embargo, se observa que con la adición del D₂O no desaparecen las señales del grupo NH₂ de la isopropilamina. Este efecto puede ser debido a que la velocidad de intercambio de los protones del grupo amino, de la isopropilamina, con el D₂O disminuye al estar el grupo NH₂ unido al Pt. Esto podría también estar influenciado por la naturaleza ácida del CDCl₃ que disminuye la velocidad de intercambio. Esta disminución de la velocidad de intercambio no se produciría en el caso del grupo hidroximetilo por estar bastante alejado del átomo metálico.

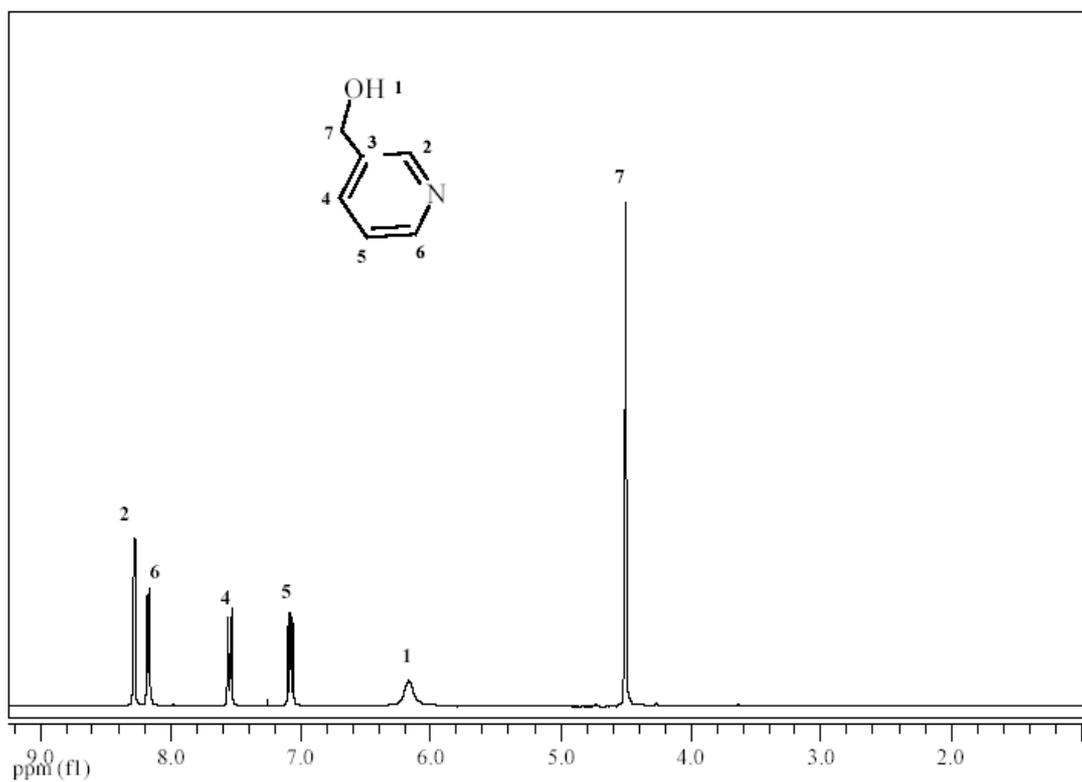


Figura 3.19: ¹H-RMN del ligando 3-hidroximetilpiridina en CDCl₃.

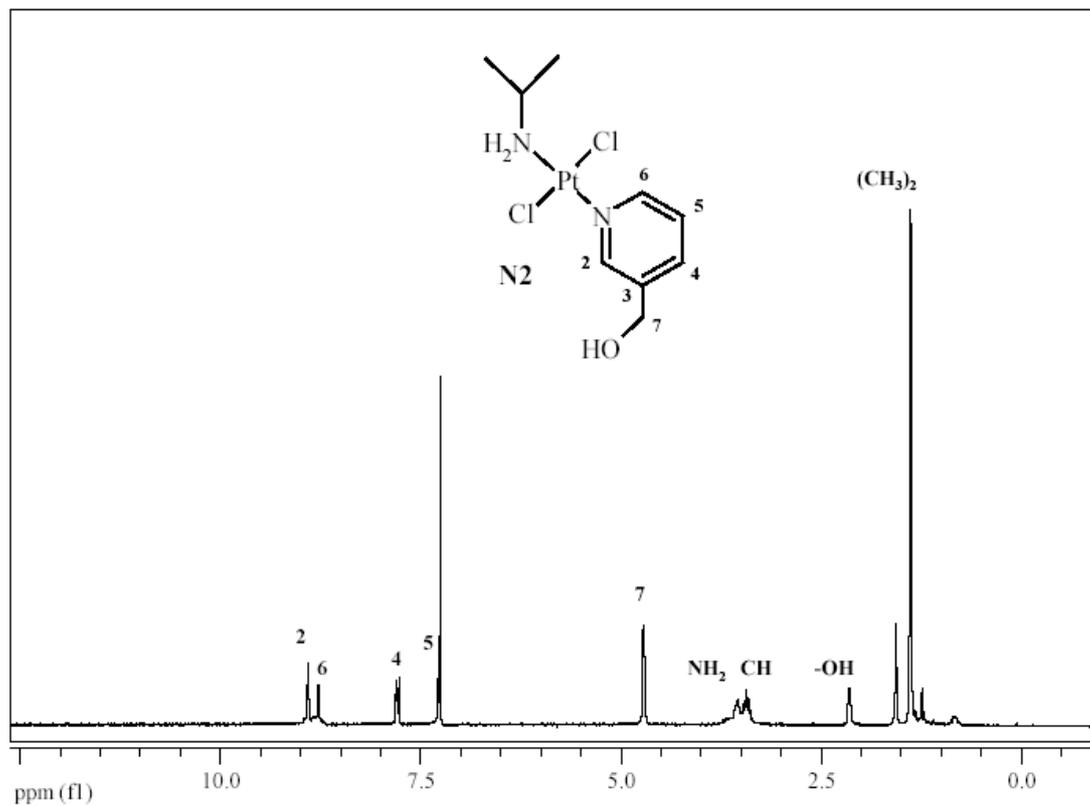


Figura 3.20: ¹H-RMN del complejo N2 en CDCl₃.

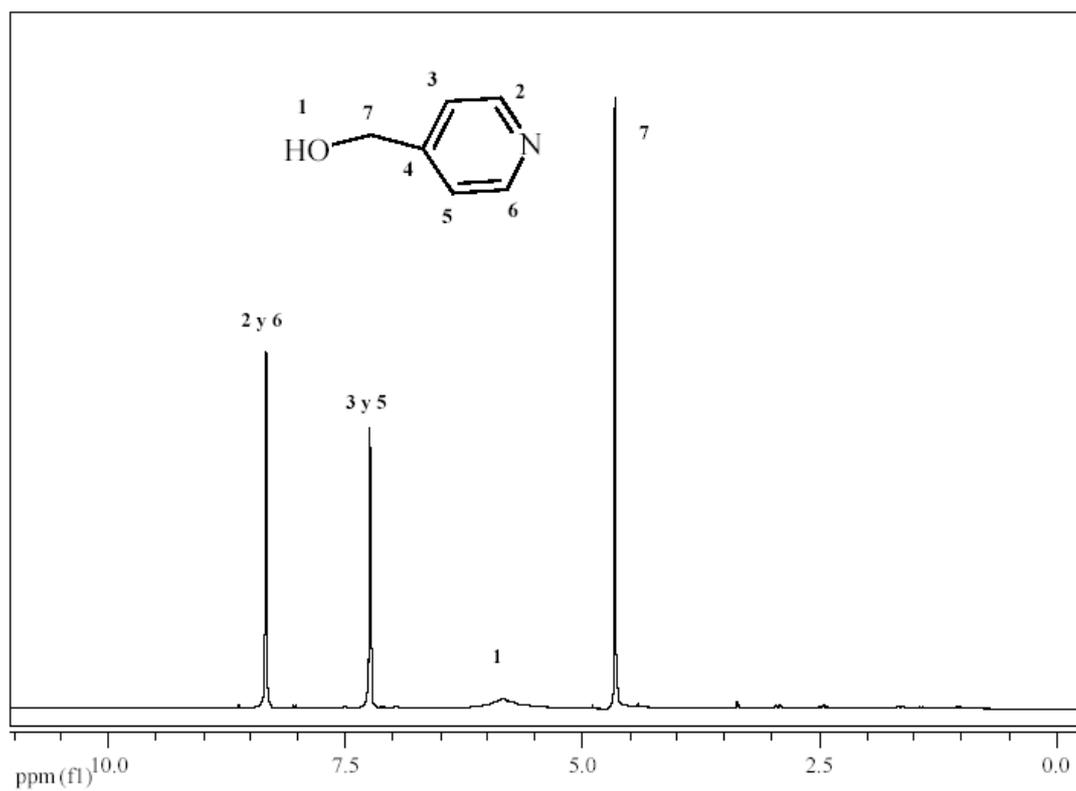


Figura 3.21: ¹H-RMN del ligando 4-hidroximetilpiridina en CDCl₃.

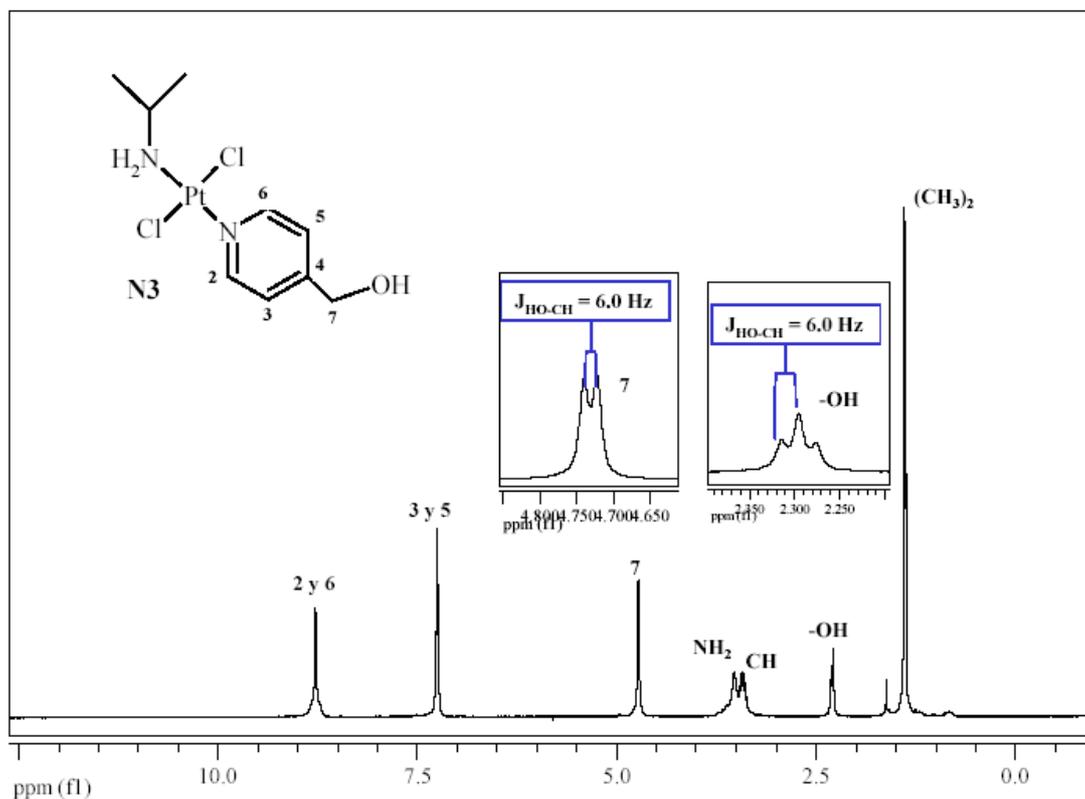


Figura 3.22: ¹H-RMN del complejo N3 en CDCl₃.

El efecto del desapantallamiento de las señales en los complejos con respecto a los ligandos de partida se observa también en los espectros de ^{13}C -RMN. Como se puede comprobar en las figuras 3.23 y 3.24, según los carbonos están más alejados del átomo metálico se produce menor desapantallamiento y las señales son más próximas a las del ligando libre.

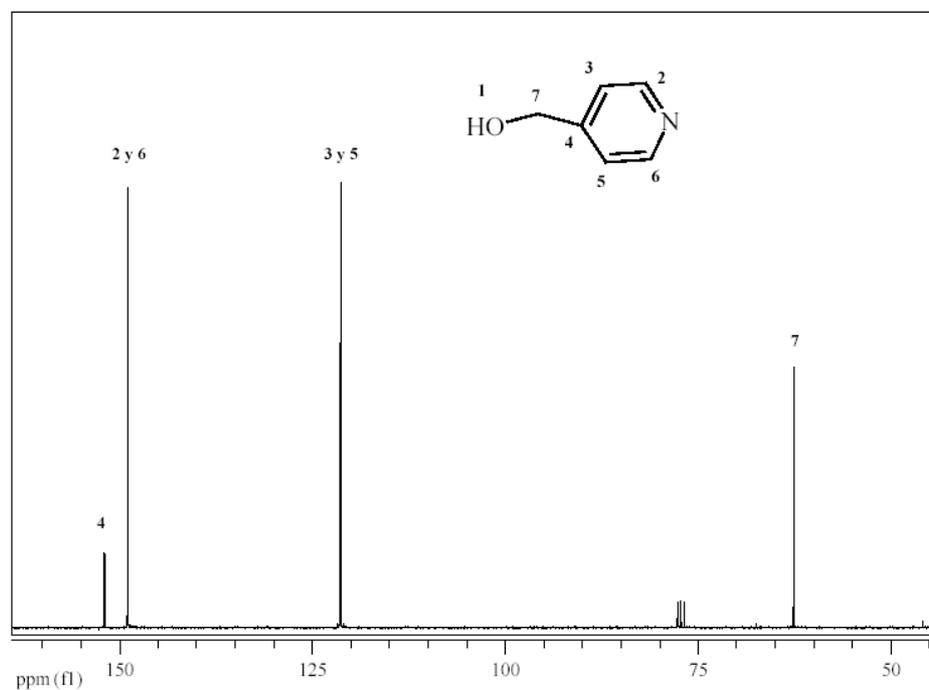


Figura 3.23: ^{13}C -RMN del ligando 4-hidroximetilpiridina en CDCl_3 .

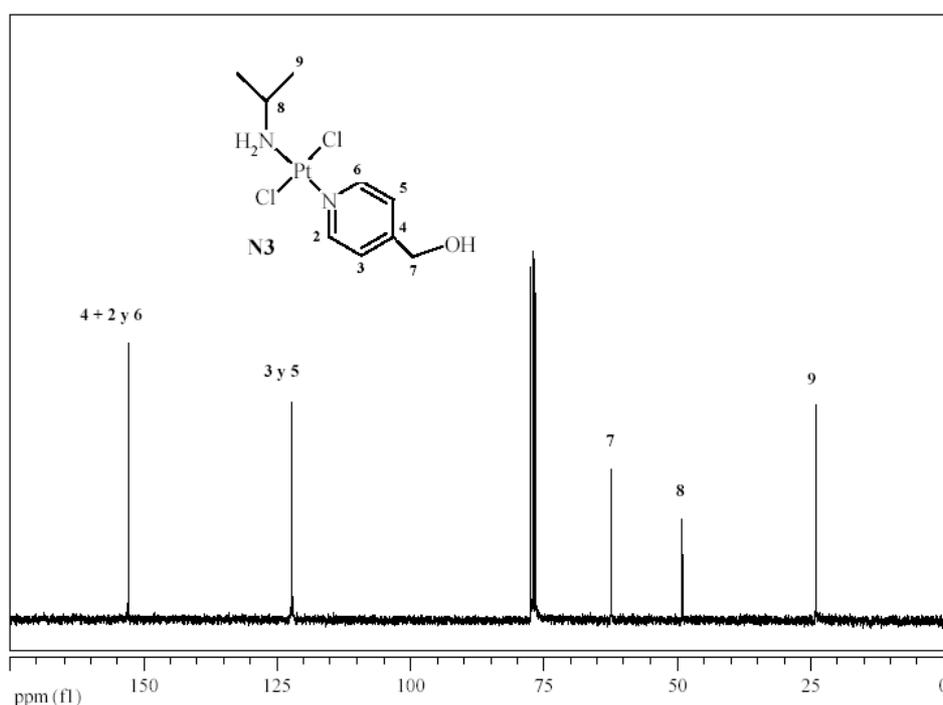


Figura 3.24: ^{13}C -RMN del complejo N3 en CDCl_3 .

Al igual que en el caso de los complejos *trans*-[PtCl₂(amina)(PPh₃)], mediante ¹⁹⁵Pt-RMN se confirma la obtención de un complejo puro. Todos los espectros monodimensionales de ¹⁹⁵Pt son contrastables con datos de la bibliografía.⁵³ En los complejos de platino con un entorno PtCl₂N₂ (figura 3.25) aparece un singlete alrededor de -2100 ppm (tablas 2.13 y 2.16), mientras que en los complejos de entorno PtCl₂NP aparece un doblete aproximadamente a -3700 ppm, como se comentó anteriormente (figura 3.11).

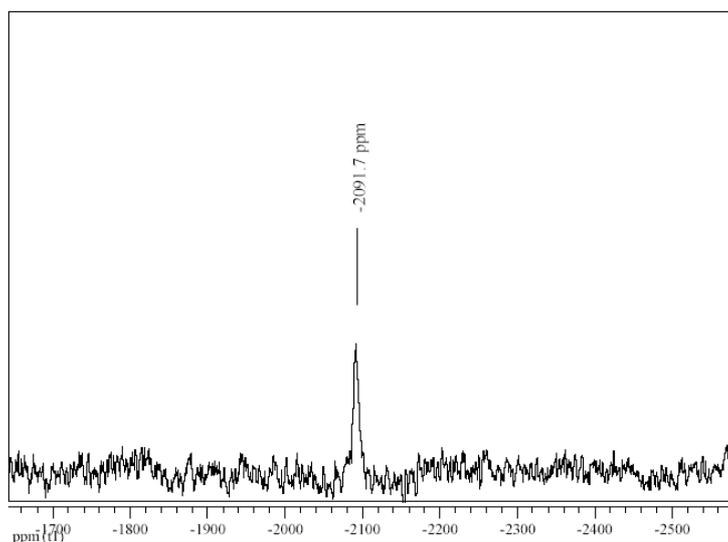


Figura 3.25: ¹⁹⁵Pt-RMN del complejo **N2** en CDCl₃.

Los complejos *trans*-[PtCl₂(isopropilamina)(3-hidroximetilpiridina)] (**N2**) y *trans*-[PtCl₂(isopropilamina)(4-hidroximetilpiridina)] (**N3**) se han podido caracterizar mediante difracción de rayos-X.

La estructura cristalográfica de los complejos **N2** y **N3** consiste en moléculas discretas por celdilla unidad, en las cuales la isopropilamina y la 3- ó 4-hidroximetilpiridina forman un enlace σ con el átomo de platino en configuración *trans* (figuras 2.10 y 2.11). Los valores de distancias y ángulos son similares a los encontrados en la bibliografía para complejos de fórmula general *trans*-[PtCl₂(amina)(amina')].^{36,43,51,54}

La comparación de las distancias y ángulos de los complejos **N2** y **N3** con los de complejos análogos de fórmula general *trans*-[PtCl₂(amina)(piridina)] (base de datos CSD) muestra valores de distancias y ángulos similares.

Ambos complejos presentan enlaces de hidrógeno de tipo N-H...Cl intermoleculares (figura 3.26). El complejo **N2** muestra tres enlaces de hidrógeno (tabla 2.36) mientras que **N3** presenta dos (tabla 2.39). No se han encontrado enlaces de hidrógeno tipo C-H...Cl como en el caso de algunos de los complejos sintetizados con fosfinas en *trans*, ni tampoco enlaces N-H...Cl intramoleculares como los observados para el complejo *trans*-[PtCl₂(dma)(ipa)].³⁶

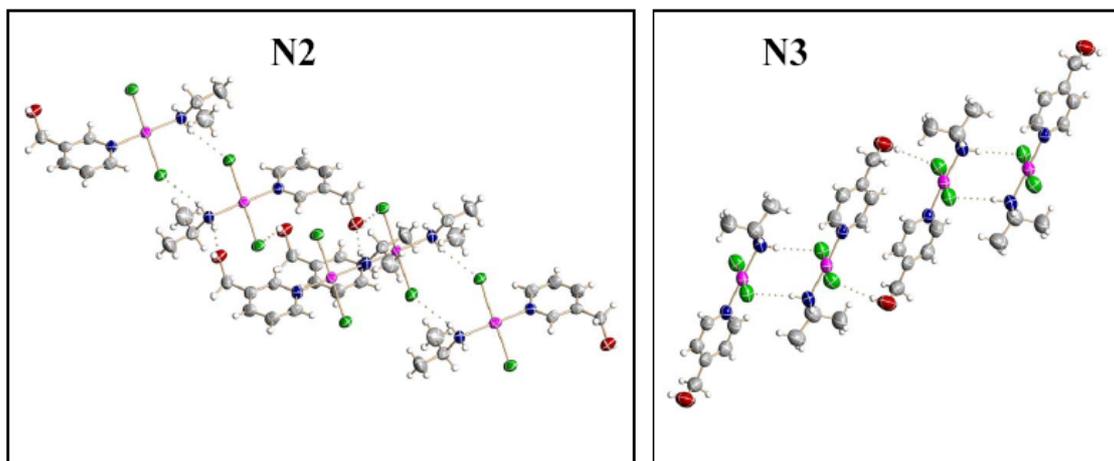


Figura 3.26: Enlaces de hidrógeno en los complejos N2 y N3.

3.2. Citotoxicidad

3.2.1. Datos de citotoxicidad de los complejos

Como se mencionó en el apartado *Experimental*, los ensayos de citotoxicidad se pueden hacer mediante varios procedimientos. Mediante el sistema basado en el compuesto MTT, el cual se reduce en presencia de las células vivas debido a la respiración oxidativa,⁵⁵ lo que se observa realmente es la parada de la cadena respiratoria mitocondrial y quizás algo de muerte celular. Este ensayo realizado a 24 horas daría un IC₅₀ que no sería realmente el correspondiente a su definición (concentración de compuesto que produce un 50% de muerte celular), aunque útil igualmente. Lo que se observaría en el ensayo es una disminución de color producida por la detención de la respiración oxidativa en las células que han sufrido un daño a causa del fármaco.

Normalmente, complejos que por este tipo de ensayos de citotoxicidad no producen ningún tipo de muerte celular a 24 horas, o mejor dicho parada de la respiración oxidativa, se consideran no citotóxicos, como es el caso de los complejos *trans*-[PtCl₂(NH₃)(3-hidroximetilpiridina)], **N4**, y *trans*-[PtCl₂(NH₃)(4-hidroximetilpiridina)], **N5**, los cuales no mostraron actividad citotóxica a 24 horas,⁵⁰ al contrario de lo que ocurre con los complejos *trans*-[PtCl₂(isopropilamina)(3-hidroximetilpiridina)], **N2**, y *trans*-[PtCl₂(isopropilamina)(4-hidroximetilpiridina)], **N3**, que si mostraron actividad antitumoral (tabla 2.41).

Los datos de IC₅₀ indican que **N4** y **N5** producen un daño celular a concentraciones tan altas que se pueden considerar tóxicas para la célula. A la vista de estos datos decidimos continuar solamente los estudios con los complejos **N2** y **N3**.

Normalmente la parada de la fosforilación oxidativa va acompañada de una posterior muerte celular debido a la activación del programa de muerte celular por apoptosis. Esta muerte celular se detecta mejor a tiempos más largos de incubación. Cuanto mayor es el tiempo de incubación frente al fármaco, mayor muerte celular se observa y el IC₅₀ será un valor más indicativo de muerte que de detención del metabolismo. Para tiempos de 72 o 96 horas se puede considerar que las células que inicialmente pararon la respiración oxidativa habrán muerto, por lo que el valor de IC₅₀ será el correspondiente a su definición (concentración de compuesto que produce el 50% de muerte celular).

El protocolo que utilizamos en la mayoría de nuestros ensayos de citotoxicidad es una adaptación del protocolo por cristal violeta usado en el NCI, que cuantifica colorimétricamente las células que siguen vivas tras la exposición al fármaco, ya que éstas son las únicas que se mantienen en la placa de ensayo tras el lavado y la fijación con glutaraldehído. Por este motivo, mediante el ensayo con cristal violeta se obtiene un valor de IC₅₀ más normalizado para tiempos de incubación de 72 o 96 horas, y presenta mayor sensibilidad que el MTT para la detección de muerte celular a los tiempos de incubación mencionados anteriormente.

El efecto de disminución de los valores de IC₅₀ respecto al tiempo de incubación se puede observar para los complejos **N2** y **N3**, utilizando como referencia el *cis*-DDP, en las líneas celulares NCI-H460, SF268 y MCF-7 (tabla 2.43 y figura 3.27).

Aunque a veces a partir de 72 horas el valor de IC_{50} casi no varía, se deduce que el tiempo más adecuado es de 96 horas, mediante el protocolo de cristal violeta, y así estar seguros de que los valores obtenidos son debidos a las células que han muerto por efecto de los complejos, y no enmascarar el valor con las células que han producido parada de su cadena respiratoria mitocondrial.

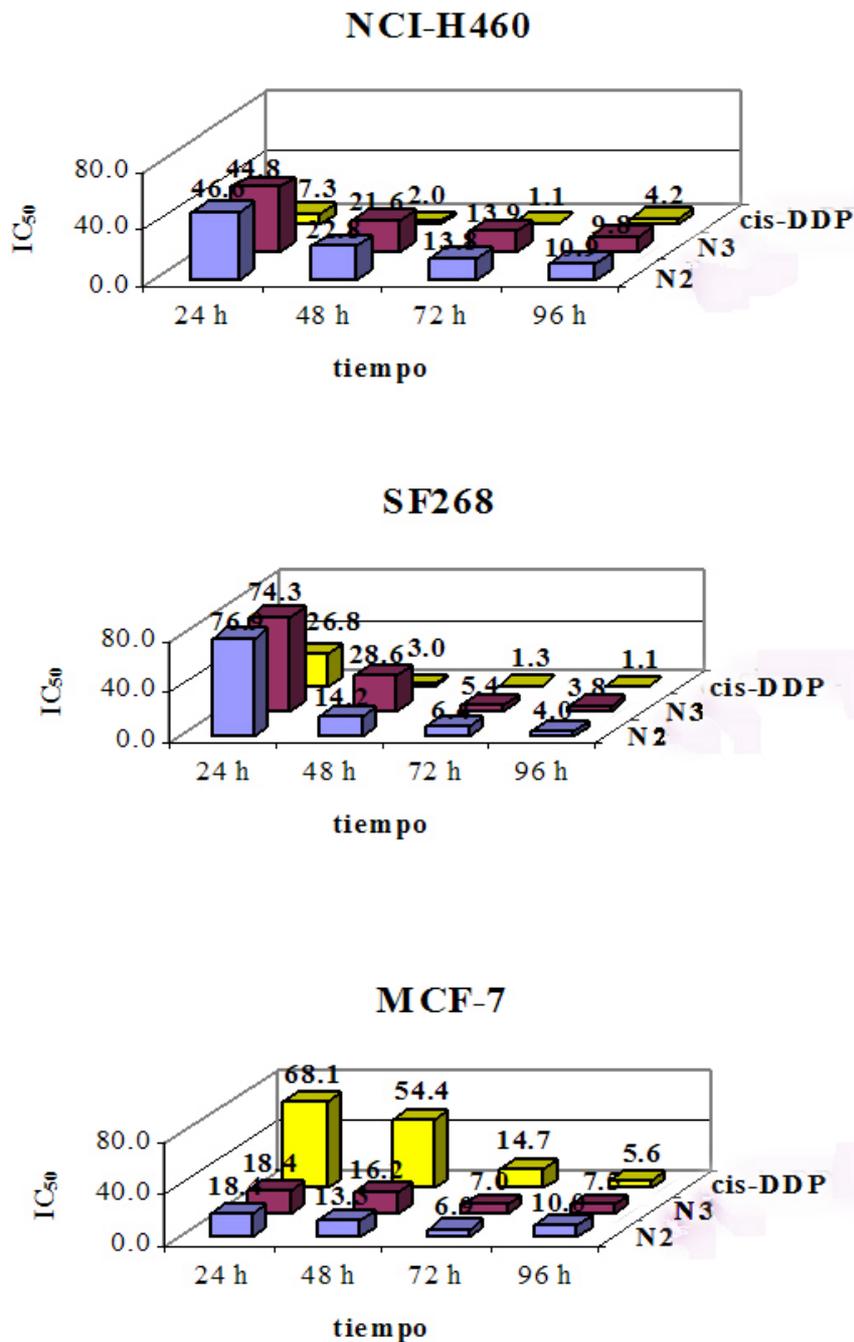


Figura 3.27: Valores de IC_{50} (μM) en función del tiempo para los complejos N2, N3 y *cis*-DDP en las líneas celulares NCI-H460, MCF-7 y SF268.

A la vista de los resultados obtenidos en la disminución de los valores de IC₅₀ respecto al tiempo de incubación, nos pareció interesante comprobar si al incubar estas células con complejo de Pt durante únicamente 24 horas se produciría un daño tal que la célula no pudiera recuperarse posteriormente, produciendo finalmente muerte celular (tabla 3.4).

Se han realizado ensayos de citotoxicidad en los que se exponen durante 24 horas las líneas celulares NCI-H460, MCF-7 y SF268 a los complejos *trans*-[PtCl₂(isopropilamina)(3-hidroximetilpiridina)], **N2**, *trans*-[PtCl₂(isopropilamina)(4-hidroximetilpiridina)], **N3**, y *cis*-DDP. Después de 24 horas de exposición al complejo de Pt(II) se retira el medio de cultivo a las células y se cambia por otro nuevo (sin los complejos de platino) manteniendo las células en este medio de cultivo durante 48 horas más, para permitir su posible recuperación.

	<i>NCI-H460</i>		<i>SF268</i>		<i>MCF-7</i>	
	24h + 48h	72h	24h + 48h	72h	24h + 48h	72h
N2	22.2	13.8	7.5	6.4	4.5	6.9
N3	22.4	13.9	7.0	5.4	4.7	7.0
cis-DDP	19.5	1.0	1.5	1.3	6.4	14.7

Tabla 3.4: Valores de IC₅₀ (μM) en las líneas celulares NCI-H460, MCF-7 y SF268 tratadas durante 24 h con los complejos **N2**, **N3** y *cis*-DDP, más su posterior incubación de 48 h en un medio libre de complejo de Pt (columna: 24h + 48h). Valores de IC₅₀ (μM) en las líneas celulares NCI-H460, MCF-7 y SF268 tratadas con los mismos complejos de forma continua durante 72 h (columna: 72h).

Se observa que el daño producido durante las primeras 24 horas, por los complejos de Pt en las líneas celulares SF268 y MCF-7 (tabla 3.4) hace que éstas no puedan recuperarse en las siguientes 48 horas en medio de cultivo (en ausencia de los complejos de platino). Es decir, el daño que han producido los complejos de Pt(II) en las primeras 24 horas en estas líneas celulares es prácticamente el mismo que se observa tras 72 horas de exposición continua al fármaco.

En el caso de la línea celular NCI-H460 la exposición continua durante 72 horas al complejo de Pt(II), produce mayor citotoxicidad que la exposición al fármaco 24 horas, lo que parece indicar que los complejos de Pt necesitan más tiempo para poder causar daño en esta línea celular.

Los resultados obtenidos en los pares de líneas celulares CH1/CH1cisR y A2780/A2780cisR para los complejos **N2** y **N3** a 96 horas (tabla 2.42), muestran que estos complejos son capaces de vencer la resistencia al cisplatino (figura 3.28).^{56,57}

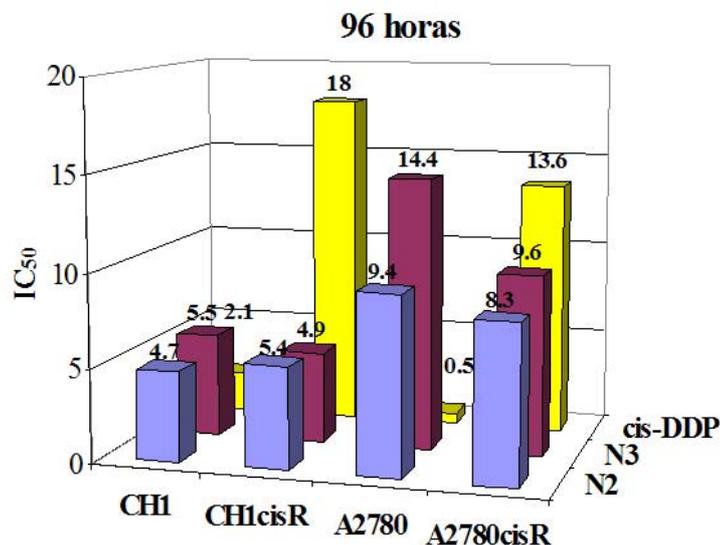


Figura 3.28: Valores de IC₅₀ (µM) en las líneas celulares CH1, CH1cisR, A2780 y A2780cisR tratadas con los complejos **N2**, **N3** y *cis*-DDP durante 96 horas.

En la línea celular CH1cisR los valores de IC₅₀, a 96 horas, de los complejos **N2** y **N3** son menores que los valores obtenidos para la línea celular A2780cisR (figura 3.28). Teniendo en cuenta los mecanismos de resistencia de las líneas celulares CH1cisR y A2780cisR (tabla 2.40), el aumento en la reparación-tolerancia de los aductos Pt-DNA parece afectar poco a los complejos **N2** y **N3**, siendo más importantes la combinación de una disminución en la acumulación de Pt y elevados niveles de GSH.

Los datos de citotoxicidad obtenidos en las líneas celulares NCI-H460, SF268 y MCF-7, para los complejos de fórmula *trans*-[PtCl₂(1-metilpropilamina)(PPh₃)] **P4-Rac**, **P4-R** y **P4-S**, muestran que no existe diferencia en función de la quiralidad (tabla 2.45). Los mismos datos se han observado para los complejos de fórmula *trans*-[PtCl₂(2-metilbutilamina)(PPh₃)] **P5-Rac** y **P5-S**. En la bibliografía se pueden encontrar complejos de fórmula general *trans*-[PtCl₂(amina quiral)(NH₃)], en los que en vez de tener una fosfina hay un ligando NH₃, que no muestran diferencias significativas en la citotoxicidad.⁵⁸ Es decir, que el hecho de presentar quiralidad en la cadena alifática no es suficiente para producir un efecto citotóxico diferente en los complejos *trans* de platino.

Debido a estos resultados se decidió determinar la citotoxicidad de los complejos sintetizados a partir del ligando racémico, **P4-Rac** y **P5-Rac**.

Los datos de citotoxicidad obtenidos en las líneas celulares NCI-H460, SF268, MCF-7, CH1, CH1cisR, A2780 y A2780cisR para los complejos **P3**, **P4-Rac** y **P5-Rac** muestran que los complejos de fórmula *trans*-[PtCl₂(amina)(PPh₃)] son más activos que **N2** y **N3**, e incluso que el cisplatino (tabla 3.5).

	NCI-H460	MCF-7	SF268	CH1	CH1cisR	A2780	A2780cisR
P3	2.8	1.2	1.5	1.5	1.0	7.6	7.9
P4-Rac	4.2	1.8	1.1	2.9	1.8	0.3	0.2
P5-Rac	7.8	2.7	1.7	2.8	1.8	2.4	2.5
N2	10.9	10.0	4.0	4.7	5.4	9.4	8.3
N3	9.8	7.5	3.8	5.5	4.9	14.4	9.6
<i>cis</i> -DDP	4.2	5.6	1.1	2.1	18	0.5	13.6

Tabla 3.5: Comparación de los valores de IC₅₀ (μM) en las líneas celulares NCI-H460, MCF-7, SF268, CH1, CH1cisR, A2780 y A2780cisR para los complejos **P3**, **P4-Rac**, **P5-Rac**, **N2**, **N3** y *cis*-DDP a 96 horas.

Todos los complejos sintetizados con el ligando trifenilfosfina, muestran valores de citotoxicidad parecidos. Este hecho quizás sea un reflejo de la incapacidad de estas líneas celulares a tolerar los daños producidos en el DNA por estos complejos.^{59,60} Los nuevos complejos **P3**, **P4-Rac** y **P5-Rac** tienen un FR (Factor de Resistencia, el cual se define como IC₅₀ línea resistente/ IC₅₀ línea parental) de 0.66, 0.62 y 0.64 respectivamente para CH1cisR/CH1, mientras que el *cis*-DDP tiene un FR de 8.5. Nuestra interpretación de los bajos IC₅₀ y FRs, presentados por estos complejos en estas líneas celulares, es que estos complejos debido a que producen un fuerte daño en el DNA por la presencia del ligando trifenilfosfina, son capaces de evitar la reparación-tolerancia en la doble hélice de sistemas de reparación como el NER.^{56,57}

Se puede observar, al comparar los datos de citotoxicidad en las líneas tumorales usadas (tabla 3.5), que la presencia del ligando trifenilfosfina aumenta el efecto citotóxico de los complejos *trans* de Pt(II), pero no parece ser el único factor implicado

en el aumento o disminución de dicho efecto. El simple cambio de la isopropilamina por la 2-metilbutilamina o la 1-metilpropilamina puede producir distintos efectos citotóxicos en complejos de fórmula general *trans*-[PtCl₂(amina)(PPh₃)], por lo que ligeras modificaciones en las cadenas alifáticas de las aminas parecen ser suficientes para producir diferentes comportamientos citotóxicos frente a células tumorales y no tumorales.

A la vista de estos resultados de citotoxicidad, es razonable pensar que los complejos de fórmula *trans*-[PtCl₂(amina)(PPh₃)] presentados en esta tesis podrían producir un mayor daño o distorsión en el DNA, debido al volumen estérico de la fosfina, en comparación con los complejos previos de fórmula *trans*-[PtCl₂(amina)(amina')] o *trans*-[PtCl₂(amina)(NH₃)].⁶¹⁻⁶³ Además, debido a la presencia del ligando trifenilfosfina podría haber un posible aumento del carácter lipofílico global de la molécula, permitiendo una mayor facilidad para atravesar la membrana citoplasmática y, por lo tanto, que una mayor concentración de la droga entre en contacto con el DNA.

El complejo *trans*-[PtCl₂(isopropilamina)(PPh₃)] es, de los complejos de fórmula *trans*-[PtCl₂(amina)(PPh₃)] presentados en esta tesis, el que mostró mejores valores de citotoxicidad en células tumorales. Además, los valores de IC₅₀ son menores en el par de líneas celulares CH1/CH1cisR que en el par A2780/A2780cisR, lo cual también ocurre para los complejos **N2** y **N3** (tabla 3.5).

En la línea celular no tumoral IMR90 (fibroblastos humanos primarios, no tumorales, sin alteraciones genéticas) los valores de citotoxicidad obtenidos a 96 horas tienen un valor más significativo que a tiempos más cortos. Además, cuanto mayor sea el valor de IC₅₀ obtenido, menor será el efecto tóxico que los compuestos producen en las células normales (figura 3.29). Dicho esto, la comparación en esta línea celular de los valores de citotoxicidad obtenidos, para los diferentes complejos de esta tesis, nos indica cuales de ellos podrían ser los menos tóxicos para células normales.

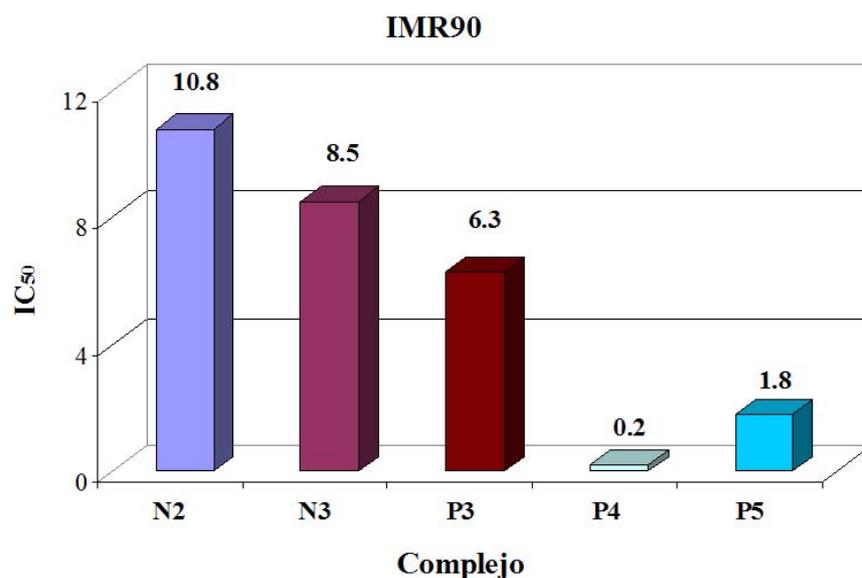


Figura 3.29: IC₅₀ (µM) en IMR90 a 96 horas.

El análisis de los datos de IC₅₀ en las células no tumorales IMR90, de los complejos objeto de esta tesis, nos han hecho desistir de continuar los estudios con los complejos *trans*-[PtCl₂(amina)(PPh₃)], ya que, además de ser poco solubles, son más tóxicos en células normales que en células tumorales.

Pensamos que la citotoxicidad de los complejos **N2** y **N3** puede ser debida a la disposición espacial que adoptan los ligandos no salientes, isopropilamina y 3- ó 4-hidroximetilpiridina. Esta disposición espacial produce un daño en el DNA distinto al producido por el *trans*- y *cis*-DDP, daño que no son capaces de reparar las células resistentes a este último. Además, los ligandos tipo piridina, presentes en **N2** y **N3**, también forman parte de otros complejos de platino con propiedades antitumorales.^{54,64,65} Por otro lado, los complejos **N4** y **N5** debido a que presentan el ligando NH₃ producen, de forma general, un daño más parecido al del transplatino.⁵²

3.2.2. *Papel de p53 en la respuesta a la citotoxicidad*

La proteína p53, como se menciona en la *Introducción*, está implicada en procesos de parada del ciclo celular, reparación y apoptosis.⁶⁶ Además, las células con disminución en la función de p53 sufren una pérdida en la vía de señalización del daño

sobre el DNA a través de dicha proteína, y no responden a la reparación del DNA mediante los mecanismos NER y BER.⁶⁷⁻⁶⁹

Como su nombre indica, las dos líneas celulares HCT116 p53 +/+ y p53-/- son genéticamente equivalentes excepto en la presencia de la proteína p53 de forma natural (+/+) o delecionada mediante recombinación homóloga (-/-).^{70,71} El no presentar la proteína p53 implica que no realiza ninguna de sus funciones y, por tanto, las vías de señalización dependientes de p53 no pueden ser activadas por ella.

El estudio de la actividad citotóxica de los complejos de platino en estas líneas celulares isogénicas, HCT116 p53 +/+ y p53-/-, indica si en el posible mecanismo de acción de dichos complejos está implicada la proteína p53.

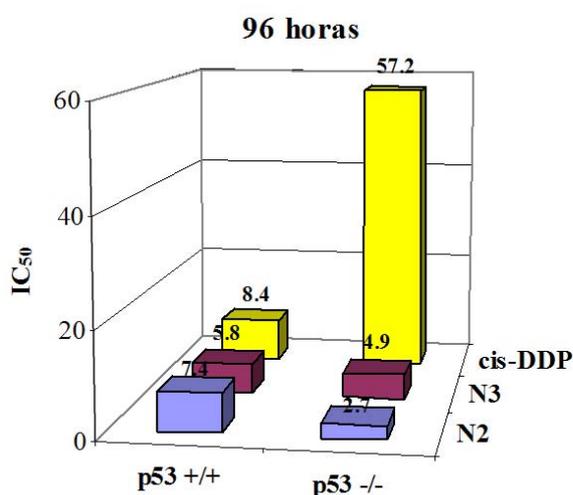


Figura 3.30: IC₅₀ (µM) en las líneas isogénicas HCT116 p53 +/+ y p53-/- a 96 horas

Se conoce que el mecanismo de acción del *cis*-DDP depende de la presencia de p53 (el cisplatino puede presentar una citotoxicidad menor en células tumorales con p53 mutado).^{67,72} El análisis de la citotoxicidad de nuestros complejos parece indicar que al ser menor el valor de IC₅₀ para N2 en las células sin p53 (-/-), en comparación con p53 +/+, podría haber una tendencia por parte de N2 a presentar mayor actividad en ausencia de p53 (figura 3.30).

Sin embargo, N3 que sólo se diferencia de N2 en la posición del grupo hidroximetilo, parece tener una actividad citotóxica independiente de p53 debido a que la diferencia de valores de IC₅₀ entre ambas líneas no es significativa.

Este resultado abriría una puerta al estudio del mecanismo de toxicidad de los dos compuestos, ya que parecen, al menos en parte, tener mecanismos independientes.

3.3. Ciclo celular

Una de las vías que se activan a consecuencia del daño producido en el DNA por el cisplatino, culmina en la activación de los puntos de control del ciclo celular. Está generalmente aceptado que el ciclo celular se detiene de forma transitoria en la fase S para que el mecanismo NER, de reparación, elimine los aductos Pt-DNA y la célula sobreviva. Cuando la reparación es incompleta las células mueren por apoptosis. En el caso del cisplatino, la activación de los puntos de control induce parada especialmente en G₂/M antes de dicha muerte.^{72,73}

A la vista de los resultados de citotoxicidad obtenidos en las líneas isogénicas HCT116, pensamos que los complejos *trans*-[PtCl₂(isopropilamina)(3-hidroximetilpiridina)], N2, y *trans*-[PtCl₂(isopropilamina)(4-hidroximetilpiridina)], N3, podrían tener diferente interacción con el ciclo celular para las líneas p53 +y p53 -/-, y que una vez analizada dicha interacción podríamos compararla con la del cisplatino que, como mencionamos anteriormente, induce parada en las células y activa el programa de apoptosis.^{67,74-76}

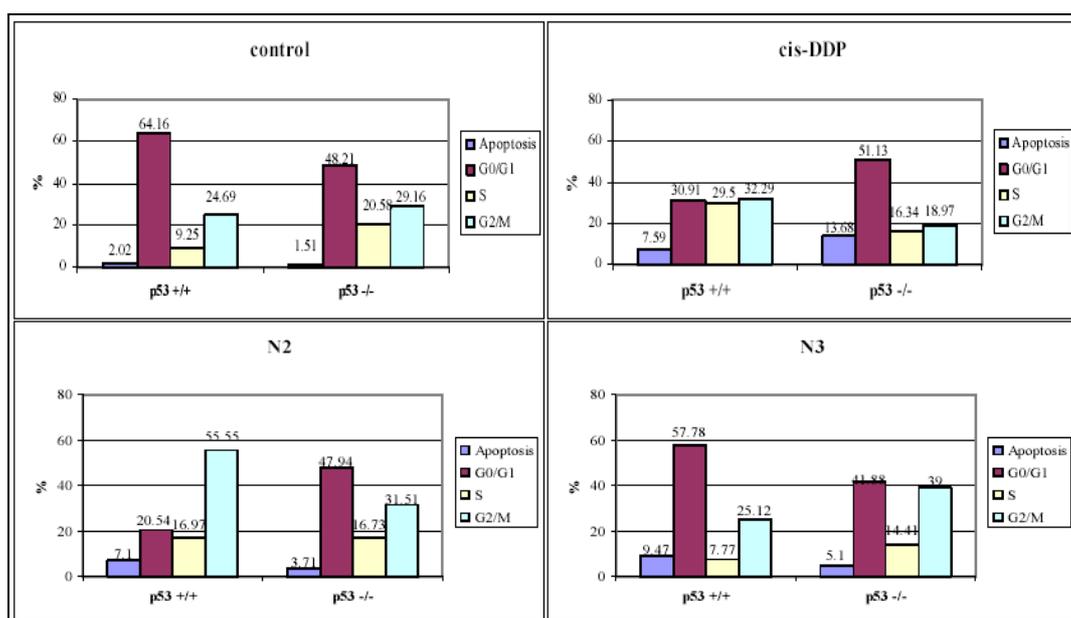


Figura 3.31: Representación de % de células en cada fase del ciclo celular después de su tratamiento a IC₈₀ durante 24 h con *cis*-DDP, N2 y N3.

Como se puede observar, en la figura 3.31, para HCT116 p53 +/+, el *cis*-DDP a 24 horas produce un aumento del porcentaje de células en fase S, con respecto al control. A tiempos de 48 horas se observó que después de este primer aumento en fase S se producía un aumento de la apoptosis y una disminución del porcentaje de células en G₁/S, manteniéndose la población de G₂/M (figura 3.32), como indica la bibliografía.⁷² Por otro lado, en la línea HCT116 p53 -/- se observa a 24 horas el mismo patrón que presenta el control, es decir la mayoría de las células se encuentran en G₀/G₁, y los valores de porcentaje de células parecidos en las fases S y G₂/M. Esto implicaría que el *cis*-DDP no ha producido todavía ningún efecto, lo cual está de acuerdo con los datos de citotoxicidad. Como se comentó anteriormente, la actividad citotóxica del cisplatino depende en su mayor parte de la presencia de p53 y la muerte celular observada a 48 horas podría ser por necrosis, debido a que la concentración de cisplatino es muy elevada (80 µM), y posiblemente tóxica para las células.

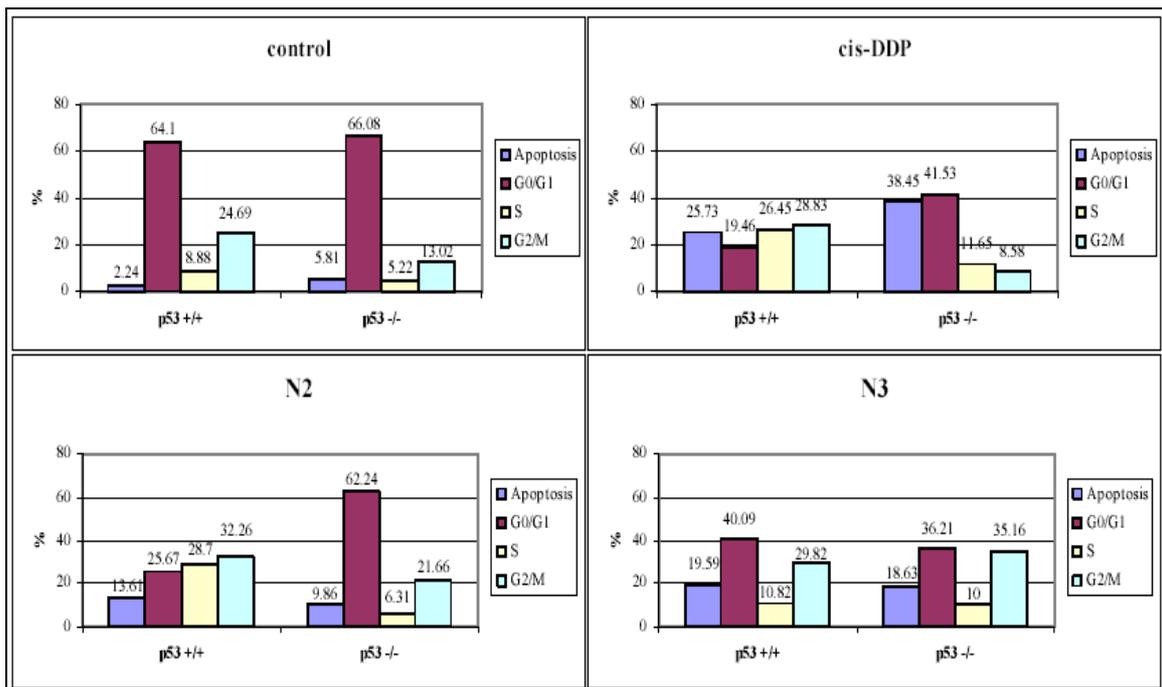


Figura 3.32: Representación de % de células en cada fase del ciclo celular después de su tratamiento a IC₈₀ durante 48 h con *cis*-DDP, N2 y N3.

Es significativo que en la línea celular HCT116 p53 +/+, los complejos N2 y N3 presentan un comportamiento muy distinto después de 24 horas (figuras 3.31). El complejo con el ligando 3-hidroximetilpiridina, N2, produce un aumento de la población en la fase G₂/M, sin producir el aumento en la fase S que produce el *cis*-DDP. A 48 horas se mantienen los valores de % de células en G₀/G₁ y S, y bajan los de G₂/M

con el consiguiente aumento de la apoptosis (figura 3.32), lo que nos hace pensar que **N2** detiene el ciclo celular de las células en G₂/M y posteriormente son enviadas a apoptosis.

El complejo con el ligando 4-hidroximetilpiridina, **N3**, a 24 horas presenta en HCT116 p53 +/+ un patrón similar al del control, aunque con mayor nivel de apoptosis (figura 3.31). Este hecho podría sugerir, al igual que el *cis*-DDP, que no se ha producido todavía ningún efecto en la célula, pero a 48 horas se sigue observando un patrón parecido pero con un mayor aumento de la apoptosis (figura 3.32). Este hecho podría implicar que **N3** produce la parada celular en G₀/G₁ y la muerte por apoptosis.

En resumen, los resultados en la línea celular HCT116 p53 +/+ nos hace pensar que **N2** parece producir la parada del ciclo en G₂/M, mientras que **N3** produce la parada en G₀/G₁, con la posterior muerte por apoptosis en ambos casos.

En la línea celular HCT116 p53 -/- el complejo **N2** produce un aumento de la población de G₀/G₁ y posterior muerte por apoptosis, al contrario que ocurría en HCT116 p53 +/+. El complejo **N3** presenta un patrón en el que disminuyen G₀/G₁ y G₂/M para aumentar la apoptosis. Es decir, **N3** parece activar mecanismos que envían a las células HCT116 p53 -/- a muerte celular por apoptosis indistintamente desde cualquiera de las dos fases del ciclo mencionadas anteriormente.

El complejo BBR3464 induce una parada en G₂/M sin realizar la parada previa en fase S, como se ha observado para **N2**.⁷⁷ El complejo *trans*-[PtCl₂{E-HN=C(OMe)Me}₂] produce al igual que el cisplatino una acumulación inicial en la fase S seguida de la posterior acumulación en G₂/M.⁷⁸ Los complejos JM335 y JM149, isómeros *cis* y *trans* del complejo amino(ciclohexilamina)dihidroxodicloroplatino(IV), muestran un ligero movimiento desde G₀/G₁ hacia la fase S que posteriormente termina en una parada del ciclo en la fase G₂/M de forma análoga a lo que sucede con el cisplatino.⁷⁹

Estos ejemplos dan a entender que dependiendo de la geometría y de los ligandos se pueden producir diferentes efectos sobre el ciclo celular, pero en la mayoría de los casos siempre tienden a una parada en G₂/M, desde donde la célula morirá por activación del mecanismo de apoptosis.

Nuestros datos de ciclo celular sugieren para los complejos *trans*-[PtCl₂(isopropilamina)(3-hidroximetilpiridina)], **N2**, y *trans*-[PtCl₂(isopropilamina)(4-hidroximetilpiridina)], **N3**, que el simple cambio en la posición del grupo hidroximetilo puede producir un efecto celular muy distinto.

Aunque el tipo de lesión producido en el DNA por los complejos **N2** y **N3** es parecido, puede ser que estos complejos sean tratados de forma diferente por la maquinaria celular, a un nivel superior de reconocimiento del daño y activación de señales.

3.4. Imágenes de microscopía confocal

Los resultados obtenidos para las células HCT116 p53 +/- con los complejos **N2** y **N3**, los cuales, como mencionamos anteriormente, detienen el ciclo celular en G₂/M y G₀/G₁ respectivamente, nos hicieron pensar que las células presentarían distinta morfología tras el tratamiento a una concentración de IC₈₀ con los complejos. Para observar la morfología se utilizó la técnica de microscopía confocal (figura 3.33). La observación de los filamentos de actina que dan forma a la célula se realizó usando anti-β-actina monoclonal con su respectivo anticuerpo-fluoróforo secundario (verde). La morfología nuclear se observó con el uso del fluoróforo DAPI (azul).

Las imágenes obtenidas para los controles, es decir, sin ningún tratamiento, muestran una morfología celular normal tanto a nivel citoplasmático como a nivel nuclear. El núcleo (azul) presenta la cromatina descondensada lo cual es normal para las células que están metabólicamente activas.

La apoptosis a nivel microscópico se caracteriza por la reducción del volumen y redondeamiento celular, condensación de la cromatina y formación de cuerpos apoptóticos.

Se debe mencionar, como aclaración, que las regiones nucleares más oscuras son regiones de cromatina condensada, ya sea debido al ciclo normal de la célula o a la formación de núcleos apoptóticos.

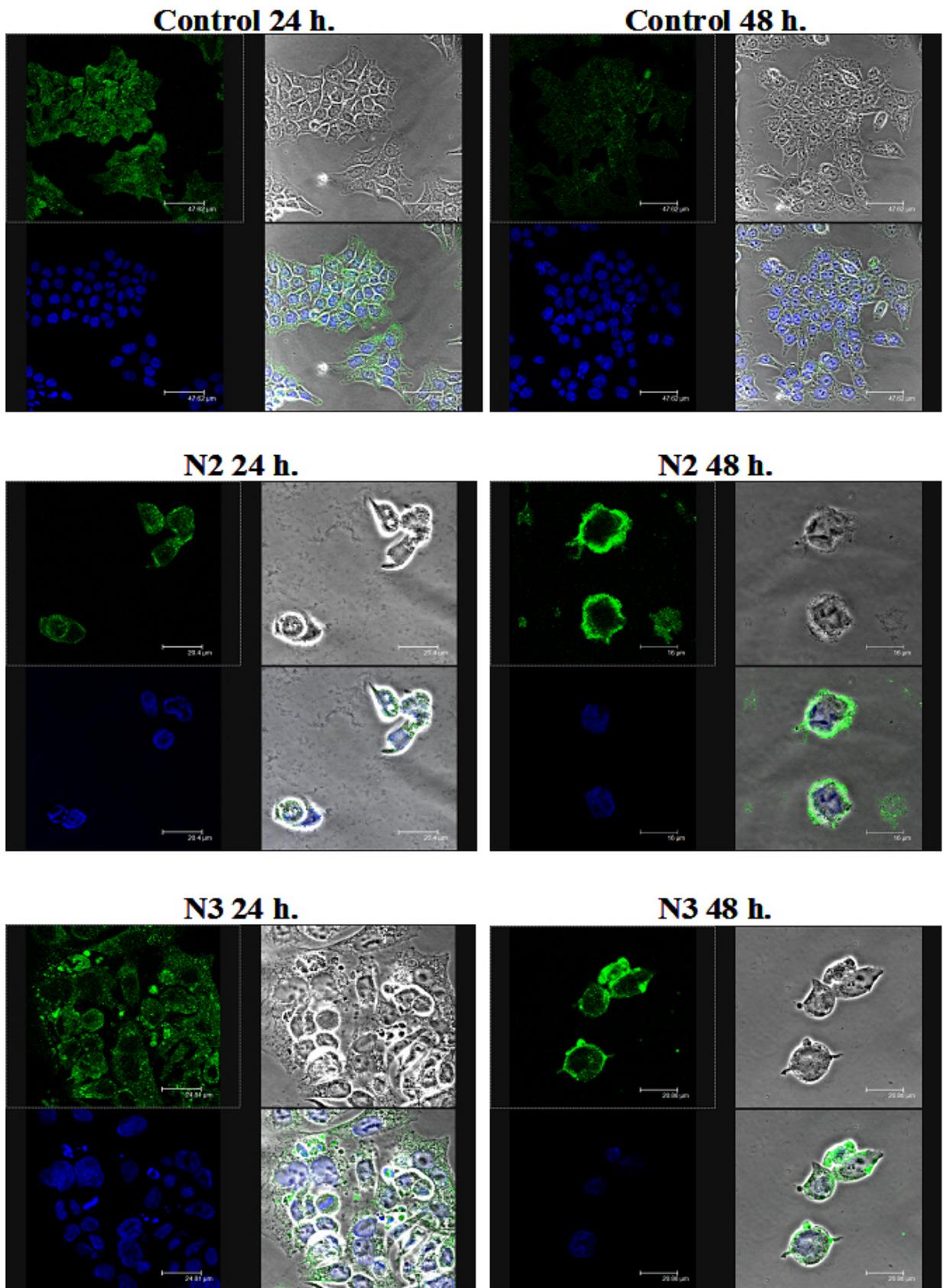


Figura 3.33: Imágenes de microscopía confocal para las células HCT116 p53 +/+ tratadas con N2 y N3 a un IC₈₀ durante 24 y 48 h.

La comparación de las imágenes obtenidas para las células control y las células tratadas con los complejos **N2** y **N3** durante 24 ó 48 horas muestran las siguientes diferencias:

Las células tratadas con el complejo **N2** durante 24 horas muestran que están más redondeadas, lo cual es normal para una morfología de células apoptóticas. Esta morfología se mantiene en las células que han sobrevivido tras 48 horas de exposición, pero se observa que el núcleo no presenta la cromatina condensada, lo cual puede implicar que está en una fase G_2 temprana y/o iniciándose la apoptosis a partir de ésta.

La exposición al complejo **N3** durante 24 produce menor muerte celular (mayor número de células en la imagen) que el complejo **N2**.

Dado que la morfología de las células tratadas con **N3** durante 24 horas es ligeramente parecida a la del control, se podría pensar que las células se encuentran en G_0/G_1 aunque algo dañadas por el fármaco. A 48 horas la morfología es mucho más redondeada, y parecida a la que presentan las células tratadas con **N2** a dicho tiempo, típica de células apoptóticas, y el núcleo con regiones más condensadas que podría ser el comienzo de la condensación de la cromatina para formar los cuerpos apoptóticos.

En estos momentos estamos intentando teñir las células con anti- α - y anti- γ -tubulina para poder observar si se ha llegado a formar el uso acromático y las fibras de ásteres formados por α -tubulina y los dos centriolos formados por γ -tubulina tras un tratamiento con **N2** o **N3**.

3.5. Interacción con DNA

Los complejos *trans*-[PtCl₂(isopropilamina)(3-hidroximetilpiridina)], **N2**, y *trans*-[PtCl₂(isopropilamina)(4-hidroximetilpiridina)], **N3**, fueron seleccionados para este estudio a la vista de los datos de citotoxicidad y la solubilidad, la cual es fundamental para poder realizar este tipo de ensayos. Además, pensamos que el grupo hidroximetilo podría aumentar la interacción de estos complejos con el DNA por interacciones de enlace de hidrógeno.

En la tabla 3.6 se hace un breve resumen de las características más importantes observadas en la interacción con DNA de los complejos **N2** y **N3**.⁴⁸

	N2 ^b	N3 ^b	transplatino	cisplatino
Unión al DNA (t _{50%} , min) ^a	105	105	120 ^c	120 ^c
Preferencia de secuencia	G, A	G, A	G, C ^{d,e}	GG, AG ^d
% interstrand CLs/aducto	~10-12	~10-12	12 ^d	6 ^d
% lesiones monofuncionales /aducto después de 24 h	20	25	~60	~1-4 ^d
% intrastrand CLs/aducto	~69	~64	~28 ^e	~90 ^d
% disminución de fluorescencia del EtBr r _b = 0.1	37	37	24	42
Ángulo desenrollamiento /aducto	16°	16	9° ^f	13° ^f
Banda a 278 nm en CD	aumenta	aumenta	disminuye ^g	aumenta ^g

Tabla 3.6: Interacción con DNA. *a*: tiempo al cual ha reaccionado el 50% del complejo de Pt con el DNA. *b*: Ramos-Lima *et al.*⁴⁸ *c*: Bancroft *et al.*⁸⁰ *d*: Eastman *et al.*⁸¹ *e*: Brabec *et al.*⁸² *f*: Keck *et al.*⁸³ *g*: Brabec *et al.*⁸⁴

Tomando como premisa que el DNA es la diana farmacológica de los complejos de platino(II), los resultados muestran que el modo de unión es diferente al del inefectivo transplatino, lo cual está de acuerdo con el hecho de que el tipo de interacción con el DNA es un factor importante en la actividad tumoral.

La interacción con el DNA de los complejos **N2** y **N3** es, en varias de las características analizadas, similar a la del complejo *trans*-[PtCl₂(4-picolina)(piperazina)]⁺ y, lo que es más importante, también al cisplatino.⁸⁵

Complejos como *trans*-[PtCl₂(NH₃)(pz)] (t_{50%} = 20 min) o *trans*-[PtCl₂(NH₃)(pic)] (t_{50%} = 50 min) presentan un t_{50%} de unión al DNA más rápido que los complejos **N2** y **N3**.⁸⁶ Este hecho podría ser debido a que los ligandos isopropilamina e hidroximetilpiridina pueden producir un ligero impedimento estérico en comparación con el ligando NH₃ de estos complejos. El complejo *trans*-[PtCl₂(4-pic)(pz)]⁺ (t_{50%} = 10 min) es aún más rápido que nuestros complejos (t_{50%} = 105 min).⁸⁵ En este caso, el factor más importante es la carga positiva que presenta este complejo, la cual podría producir una rápida atracción electrostática entre el complejo catiónico y la cadena

polianiónica del DNA. Los complejos **N2** y **N3**, al no presentar esta carga positiva, difunden más lentamente a las proximidades de la doble hélice. Datos obtenidos para el complejo **N5** ($t_{50\%} = 300$ min) nos hacen pensar que la sustitución de un ligando NH_3 por un ligando hidroximetilpiridina en el transplatino no produce una rápida unión al DNA, lo cual puede influir en la baja citotoxicidad de los complejos, ya que éstos estarían más tiempo a mercé de la interacción con otros componentes celulares no deseados.^{50,52}

Por otro lado, complejos como el *trans*- $[\text{PtCl}_2(\text{py})_2]$ o *trans*- $[\text{PtCl}_2(\text{dma})(\text{ipr})]$ muestran que no se llega a unir el 100% del complejo al DNA en las condiciones de ensayo utilizadas.^{36,65,87} Los complejos **N2** y **N3** llegan a unirse al 100% con el DNA (tabla 2.51), lo que puede ser debido a la posibilidad de formar enlaces de hidrógeno adicionales gracias al grupo hidroximetilo de la piridina.

Algunos autores consideran que el volumen estérico, la solubilidad y los enlaces de hidrógeno contribuyen significativamente a la unión al DNA.^{86,88,89} A la vista de las comparaciones anteriores, es de esperar que las propiedades estéricas que presenta el ligando isopropilamina junto con la posibilidad de formar enlaces de hidrógeno por el grupo hidroximetilo de la piridina, condicionen la velocidad de unión al DNA.

Las posibles conformaciones que puede adoptar un complejo gracias a sus ligandos, la presencia o no de carga en el complejo o la posibilidad formar enlaces de hidrógeno, son características que pueden influir en la unión al DNA y, por lo tanto, su actividad biológica.

Un dato importante a tener en cuenta es que los complejos **N2** y **N3** producen bajo porcentaje de enlaces intercatenarios (interstrand CLs = ~10-12%) en comparación con otros complejos *trans* de platino, como **N5** (interstrand CLs = 26%), *trans*- $[\text{PtCl}_2(\text{NH}_3)(\text{metbut})]$ (40%), *trans*- $[\text{PtCl}_2(\text{NH}_3)(\text{secbut})]$ (50%), *trans*- $[\text{PtCl}_2(\text{NH}_3)(\text{quin})]$ (30%) o *trans*- $[\text{PtCl}_2(\text{NH}_3)(\text{pic})]$ (40%).^{52,58,86,90} Estos datos implican que la sustitución de un solo ligando NH_3 por otro ligando amina en el transplatino, produce una mayor eficiencia de formación de enlaces intercatenarios. Por otro lado, complejos donde han sido sustituidos ambos ligandos NH_3 del transplatino como es el caso del *trans*- $[\text{PtCl}_2(\text{py})_2]$ (17-14 %) o *trans*- $[\text{PtCl}_2(4\text{-pic})(\text{pz})]^+$ (6%) presentan una eficiencia parecida o inferior a nuestros complejos.^{65,85}

La formación de aductos bifuncionales con el DNA es un proceso en dos etapas. En una primera etapa se forma el aducto monofuncional, preferentemente sobre residuos de guanina. En una segunda etapa los monoadductos cierran a aductos bifuncionales. Es razonable suponer que el alto porcentaje de enlaces intercatenarios formados por análogos del transplatino, donde sólo se ha sustituido un ligando NH_3 , es debido a que los cambios conformacionales inducidos por el aducto monofuncional modulan la segunda unión, favoreciendo la formación del aducto intercatenario. Por el contrario, la sustitución de ambos grupos amino del transplatino, no permite un posicionamiento de los ligandos que favorezca la interacción del complejo con el DNA hacia la formación de enlaces intercatenarios con la doble hélice.

Complejos como *trans*- $[\text{PtCl}_2(\text{py})_2]$ y *trans*- $[\text{PtCl}_2(\text{dma})(\text{ipr})]$, producen ángulos de desenrollamiento en el DNA de 17° y 15° respectivamente.^{65,87} Los complejos **N2** y **N3**, que tienen como ligandos una piridina sustituida y la isopropilamina, producen un ángulo de desenrollamiento de 16° . Sin embargo, el complejo *trans*- $[\text{PtCl}_2(4\text{-pic})(\text{pz})]^+$ produce un desenrollamiento de 16° similar al de nuestros complejos.⁸⁵ Compuestos como *trans*- $[\text{PtCl}_2(\text{NH}_3)(\text{pz})]$ *trans*- $[\text{PtCl}_2(\text{NH}_3)(\text{pic})]$ o **N5**, mencionados anteriormente, presentan valores de 30° , 26° y 28° respectivamente.^{52,86} Estos datos indican que los complejos donde se han sustituido los dos grupos amino del transplatino por aminas alifáticas y/o heterociclos originan un menor desenrollamiento del DNA.

Un aumento excesivo del ángulo de desenrollamiento, como el producido por análogos del transplatino donde sólo se ha sustituido un ligando NH_3 por un ligando heterocíclico, podría afectar desfavorablemente a la citotoxicidad de los complejos.^{50,86,90}

La consecuencia más sorprendente de la sustitución de los ligandos NH_3 del transplatino por una amina alifática y un ligando heterocíclico es la alta cantidad relativa de aductos intracatenarios estables (intrastrand CLs). Se acepta que la ineffectividad del transplatino está asociada con su reducida capacidad para formar aductos bifuncionales estables con el DNA.⁹¹ Se piensa que una eficiencia alta para producir aductos intracatenarios y un aumento de la estabilidad de aductos 1,3-GXG intracatenarios con la doble hélice son factores importantes que deben de cumplir los complejos de platino de geometría *trans* para tener una importante respuesta citotóxica.

La presencia de dos heterociclos o un heterociclo y una amina alifática, como en nuestro caso, en compuestos de Pt con geometría *trans*, fomentan la estabilidad de los enlaces 1,3-intracatenarios, pero no de los intercatenarios con el DNA. Esta observación supone que el incremento de estabilidad de los aductos intracatenarios es un factor asociado al aumento de la actividad citotóxica de los complejos donde han sido sustituidos ambos grupos amino del transplatino.

Es importante mencionar que algunas de las características de la interacción de los complejos **N2** y **N3** con el DNA son similares a las producidas por el cisplatino. El aumento de la banda positiva a 280 nm observada por espectroscopía de dicroísmo circular es una de estas características (figura 2.24).

Se acepta de forma general que un aumento de dicha banda está asociado a cambios conformacionales en el DNA de carácter no desnaturizante.⁸⁴ Por otro lado, el transplatino y un gran número de análogos de éste, presentan una disminución en dicha banda, lo cual está asociado a la desnaturalización del DNA.^{52,58,65,86} Este resultado está de acuerdo con lo observado en general para el ángulo de desenrollamiento y la baja cantidad de aductos intercatenarios formados por **N2** y **N3**. Estos complejos no permiten posicionar los ligandos de forma que produzcan una interacción parecida a la del transplatino.

Por consiguiente, las lesiones típicas en el DNA producidas por los complejos **N2** y **N3** tienen como resultado cambios conformacionales en el DNA que juegan un papel importante sobre la actividad citotóxica. De este modo, los efectos relacionados con el reconocimiento y unión de otros componentes celulares, como proteínas, no son probablemente los mismos que modulan el reconocimiento de otros complejos de platino. Este hecho puede estar relacionado con lo observado mediante citometría de flujo, donde el simple cambio de la posición del grupo hidroximetilo en la piridina debe producir un reconocimiento diferente, de forma que el ciclo celular se detiene en distintas fases del ciclo para cada complejo.

El mecanismo subyacente a la actividad citotóxica de los complejos de platino es un proceso en el que están implicados multitud de factores.⁵⁷ Entre los componentes celulares que no operan directamente a nivel del DNA se encuentran aquellos que afectan a la cantidad de platino que puede llegar a enlazarse a la doble hélice, como

agentes detoxificantes tipo GSH o metalotioneína. Los resultados obtenidos sugieren que las moléculas libres de **N2** y **N3** que todavía no se han unido al DNA, y por consiguiente pueden reaccionar con GSH o MT-2, no juegan un papel importante en el efecto global de citotoxicidad de estos complejos. La GSH, la cual es capaz de eliminar los aductos Pt-DNA monofuncionales debido al efecto *trans*, presenta menor eficiencia para los monoadductos de los complejos **N2** y **N3** que para el transplatino (figura 2.19). Los aductos formados por **N2** y **N3** pueden permanecer en el DNA de las células tumorales por más tiempo y, por lo tanto, producir un mayor efecto citotóxico.

Todos estos datos confirman que la formación de un mayor número de aductos intracatenarios estables, la menor capacidad de labilización de los aductos por parte de otros componentes celulares, así como, los cambios conformacionales en la doble hélice de carácter no desnaturalizante, son necesarios para producir una buena actividad citotóxica, tanto en células resistentes como no resistentes al cisplatino.

3.6. Bibliografía

- (1) Hartley, F. R. *Chem. Soc. Rev.* **1973**, 2, 163.
- (2) Cheesema.Tp; Odell, A. L.; Raethel, H. A. *Chem Commun* 1968, 1496-&.
- (3) Chatt, J.; Venanzi, L. M. *J. Chem. Soc.* **1955**, 2787.
- (4) Goodfellow, R. J.; Venanzi, L. M. *J. Chem. Soc.* **1965**, 7533.
- (5) Hartley, F. R.; Searle, G. W. *Inorg. Chem.* **1973**, 12, 1949.
- (6) Baratta, W.; Pregosin, P. S. *Inorg. Chim. Acta.* **1993**, 209, 85.
- (7) Boag, N. M.; Ravetz, M. S. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **1995**, 3473.
- (8) Gillard, R. D.; Pilbrow, M. F. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **1974**, 2320.
- (9) Anderson, G. K.; Cross, R. J. *Chem. Soc. Rev.* **1980**, 9, 185.
- (10) Cattalin.L; Martelli, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1969**, 91, 312.
- (11) Louw, W. J. *Inorg. Chem.* **1977**, 16, 2147.
- (12) Nakamoto, K. En: *Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds*; 5th ed.; John Wiley & Sons: New York, **1997**; Vol. B: Application in coordination, Organometallic, and Bioinorganic Chemistry.

- (13) Roundhill, D. M. En: *Comprehensive Coordination Chemistry*; 1st ed.; Wilkinson, G., Gillard, R. D., McCleverty, J. A., Eds.; Pergamon Press: Oxford, **1987**; Vol. 5, 351.
- (14) Pregosin, P. S. *Phosphorus-31 NMR Spectroscopy in Stereochemical analysis*; VCH Publishers: New York, **1987**.
- (15) Appleton, T. G.; Clark, H. C.; Manzer, L. E. *Coord. Chem. Rev.* **1973**, *10*, 335.
- (16) Al-Najjar, I. M. *Inorg. Chim. Acta.* **1987**, *128*, 93.
- (17) Mastin, S. H.; Haake, P. *J. Chem. Soc., Chem. Comm.* **1970**, 202.
- (18) Haake, P.; Pfeiffer, R. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, *92*, 4996.
- (19) Anderson, G. K.; Cross, R. J. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **1980**, 1988.
- (20) Cross, R. J.; Davidson, M. F.; Rocamora, M. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **1988**, 1147.
- (21) Cross, R. J.; Davidson, M. F. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **1987**, 139.
- (22) Davies, J. A.; Sood, A. *Inorg. Chem.* **1985**, *24*, 4213.
- (23) Goodfellow, R. J.; Goggin, P. L.; Venanzi, L. M. *J. Chem. Soc., A.* **1967**, 1897.
- (24) Cariati, F.; Mason, R.; Robertso, Gb; Ugo, R. *Chem. Comm.* **1967**, 408.
- (25) Jain, V. K.; Jain, L. *Coord. Chem. Rev.* **2005**, *249*, 3075.
- (26) Simms, B. L.; Shang, M.; Lu, J.; Youngs, W. J.; Ibers, J. A. *Organometallics* **1987**, *6*, 1118.
- (27) Blake, A. J.; Gould, R. O.; Marr, A. M.; Rankin, D. W. H.; Schroder, M. *Acta Crystallogr. C.* **1989**, *45*, 1218.
- (28) Boag, N. M.; Ravetz, M. S. *Acta Crystallogr. C.* **1996**, *52*, 1942.
- (29) Cobley, C. J.; Ellis, D. D.; Orpen, A. G.; Pringle, P. G. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **2000**, *7*, 1101.
- (30) Black, M.; Mais, R. H. B.; Owston, P. G. *Acta Crystallogr. B-Stru.* **1969**, *B 25*, 1760.
- (31) Croxtall, B.; Fawcett, J.; Hope, E. G.; Stuart, A. M. *J. Chem. Soc., Dalton Trans* **2002**, 491.
- (32) Johansson, M. H.; Otto, S. *Acta Crystallogr. C.* **2000**, *56*, e12.
- (33) Taylor, R.; Kennard, O. *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 5063.
- (34) Braga, D.; Draper, S. M.; Champeil, E.; Grepioni, F. *J. Organomet. Chem.* **1999**, *573*, 73.
- (35) Xu, H.; Song, Y. L.; Mi, L. W.; Hou, H. W.; Tang, M. S.; Sang, Y. L.; Fan, Y. T.; Pan, Y. *Dalton Trans.* **2006**, 838.

- (36) Pérez, J. M.; Montero, E. I.; González, A. M.; Solans, X.; Font-Bardía, M.; Fuertes, M. A.; Alonso, C.; Navarro-Ranninger, C. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 2411.
- (37) Ramos-Lima, F. J.; Quiroga, A. G.; Pérez, J. M.; Font-Bardía, M.; Solans, X.; Navarro-Ranninger, C. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2003**, 1591.
- (38) Burrows, A. D.; Mahon, M. F.; Palmer, M. T. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **2000**, 3615.
- (39) Margiotta, N.; Habtemariam, A.; Sadler, P. J. *Angew. Chem. Int. Edit.* **1997**, *36*, 1185.
- (40) Albinati, A.; Pregosin, P. S.; Wombacher, F. *Inorg. Chem.* **1990**, *29*, 1812.
- (41) Ammann, C.; Pregosin, P. S.; Scriveranti, A. *Inorg. Chim. Acta.* **1989**, *155*, 217.
- (42) Albinati, A.; Lianza, F.; Berger, H.; Pregosin, P. S.; Ruegger, H.; Kunz, R. W. *Inorg. Chem.* **1993**, *32*, 478.
- (43) Coluccia, M.; Nassi, A.; Loseto, F.; Boccarelli, A.; Mariggio, M. A.; Giordano, D.; Intini, F. P.; Caputo, P.; Natile, G. *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 510.
- (44) Adams, C. J.; Anderson, K. M.; Baber, R. A.; Connelly, N. G.; Kandiah, M.; Orpen, A. G. *Dalton Trans.* **2004**, 3353.
- (45) Allen, F. H.; Taylor, R. *Chem. Soc. Rev.* **2004**, *33*, 463.
- (46) Bellard, S. *Comput. Phys. Comm.* **1984**, *33*, 71.
- (47) Guerrero, G.; Mutin, P. H.; Dahan, F.; Vioux, A. *J. Organomet. Chem.* **2002**, *649*, 113.
- (48) Ramos-Lima, F. J.; Vrana, O.; Quiroga, A. G.; Navarro-Ranninger, C.; Halamikova, A.; Rybnickova, H.; Hejmalova, L.; Brabec, V. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 2640.
- (49) Enroe, P.; Philippe, B.; Christian, A. *Structure Determination of Organic Compounds*; 3rd ed.; Springer-Verlag: New York, **2000**.
- (50) Ramos-Lima, F. J.; Quiroga, A. G.; Perez, J. M.; C., N.-R. *Polyhedron.* **2003**, 3379.
- (51) Martinez, A.; Lorenzo, J.; Prieto, M. J.; de Llorens, R.; Font-Bardía, M.; Solans, X.; Aviles, F. X.; Moreno, V. *Chembiochem.* **2005**, *6*, 2068.
- (52) Stehlikova, K.; Kasparkova, J.; Novakova, O.; Martinez, A.; Moreno, V.; Brabec, V. *Febs. J.* **2006**, *273*, 301.
- (53) Pregosin, P. S. *Coord. Chem. Rev.* **1982**, *44*, 247.
- (54) Van Beusichem, M.; Farrell, N. *Inorg. Chem.* **1992**, *31*, 634.

- (55) Alley, M. C.; Scudiero, D. A.; Monks, A.; Hursey, M. L.; Czerwinski, M. J.; Fine, D. L.; Abbott, B. J.; Mayo, J. G.; Shoemaker, R. H.; Boyd, M. R. *Cancer Res.* **1988**, *48*, 589.
- (56) Fuertes, M. A.; Alonso, C.; Pérez, J. M. *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 645.
- (57) Brabec, V.; Kasparkova, J. *Drug Resist. Update.* **2002**, *5*, 147.
- (58) Prokop, R.; Kasparkova, J.; Novakova, O.; Marini, V.; Pizarro, A. M.; Navarro-Ranninger, C.; Brabec, V. *Biochem. Pharmacol.* **2004**, *67*, 1097.
- (59) Kelland, L. R.; Murrer, B. A.; Abel, G.; Giandomenico, C. M.; Mistry, P.; Harrap, K. R. *Cancer Res.* **1992**, *52*, 822.
- (60) Ormerod, M. G.; O'Neill, C.; Robertson, D.; Kelland, L. R.; Harrap, K. R. *Cancer Chemoth. Pharm.* **1996**, *37*, 463.
- (61) Pérez, J. M.; Fuertes, M. A.; Alonso, C.; Navarro-Ranninger, C. *Crit. Rev. Oncol. Hemat.* **2000**, *35*, 109.
- (62) Boccarelli, A.; Intini, F. P.; Sasanelli, R.; Sivo, M. F.; Coluccia, M.; Natile, G. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 829.
- (63) Intini, F. P.; Boccarelli, A.; Francia, V. C.; Pacifico, C.; Sivo, M. F.; Natile, G.; Giordano, D.; De Rinaldis, P.; Coluccia, M. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2004**, *9*, 768.
- (64) Bierbach, U.; Qu, Y.; Hambley, T. W.; Peroutka, J.; Nguyen, H. L.; Doedee, M.; Farrell, N. *Inorg. Chem.* **1999**, *38*, 3535.
- (65) Zou, Y.; Vanhouten, B.; Farrell, N. *Biochemistry.* **1993**, *32*, 9632.
- (66) Morgan, S. E.; Kastan, M. B. *Adv. Cancer Res.* **1997**, *71*, 1.
- (67) Wang, D.; Lippard, S. J. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2005**, *4*, 307.
- (68) Balint, E.; Vousden, K. H. *Brit. J. Cancer.* **2001**, *85*, 1813.
- (69) Zhou, J.; Ahn, J.; Wilson, S. H.; Prives, C. *Embo J* 2001, *20*, 914-923.
- (70) Bunz, F.; Hwang, P. M.; Torrance, C.; Waldman, T.; Zhang, Y. G.; Dillehay, L.; Williams, J.; Lengauer, C.; Kinzler, K. W.; Vogelstein, B. *J. Clin. Invest.* **1999**, *104*, 263.
- (71) Waldman, T.; Zhang, Y. G.; Dillehay, L.; Yu, J.; Kinzler, K.; Vogelstein, B.; Williams, J. *Nat. Med.* **1997**, *3*, 1034.
- (72) Siddik, Z. H. *Oncogene.* **2003**, *22*, 7265.
- (73) Ormerod, M. G.; Orr, R. M.; Peacock, J. H. *Brit. J. Cancer.* **1994**, *69*, 93.
- (74) Taylor, W. R.; Stark, G. R. *Oncogene.* **2001**, *20*, 1803.
- (75) Bhonde, M. R.; Hanski, M. L.; Notter, M.; Gillissen, B. F.; Daniel, P. T.; Zeitz, M.; Hanski, C. *Oncogene.* **2006**, *25*, 165.

- (76) Ho, Y. P.; Au-Yeung, S. C. F.; To, K. K. W. *Med. Res. Rev.* **2003**, *23*, 633.
- (77) Servidei, T.; Ferlini, C.; Riccardi, A.; Meco, D.; Scambia, G.; Segni, G.; Manzotti, C.; Riccardi, R. *Eur. J. Cancer.* **2001**, *37*, 930.
- (78) Coluccia, M.; Nassi, A.; Boccarelli, A.; Giordano, D.; Cardellicchio, N.; Intini, F. P.; Natile, G.; Barletta, A.; Paradiso, A. *Int. J. Oncol.* **1999**, *15*, 1039.
- (79) O'Neill, C. F.; Ormerod, M. G.; Robertson, D.; Titley, J. C.; CumberWalsweer, Y.; Kelland, L. R. *Brit. J. Cancer.* **1996**, *74*, 1037.
- (80) Bancroft, D. P.; Lepre, C. A.; Lippard, S. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 6860.
- (81) Eastman, A. *Pharmacol. Therapeut.* **1987**, *34*, 155.
- (82) Brabec, V.; Leng, M. P. *Natl. Acad. Sci.* **1993**, *90*, 5345.
- (83) Keck, M. V.; Lippard, S. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 3386.
- (84) Brabec, V.; Kleinwachter, V.; Butour, J. L.; Johnson, N. P. *Biophys. Chem.* **1990**, *35*, 129.
- (85) Najajreh, Y.; Kasparikova, J.; Marini, V.; Gibson, D.; Brabec, V. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2005**, *10*, 722.
- (86) Kasparikova, J.; Marini, V.; Najajreh, Y.; Gibson, D.; Brabec, V. *Biochemistry.* **2003**, *42*, 6321.
- (87) Montero, E. I.; Perez, J. M.; Schwartz, A.; Fuertes, M. A.; Malinge, J. M.; Alonso, C.; Leng, M.; Navarro-Ranninger, C. *Chembiochem.* **2002**, *3*, 61.
- (88) Brabec, V.; Nepelchova, K.; Kasparikova, J.; Farrell, N. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2000**, *5*, 364.
- (89) Reedijk, J. P. *Natl. Acad. Sci.* **2003**, *100*, 3611.
- (90) Zakovska, A.; Novakova, O.; Balcarova, Z.; Bierbach, U.; Farrell, N.; Brabec, V. *Eur. J. Biochem.* **1998**, *254*, 547.
- (91) Leng, M.; Schwartz, A.; J., G.-P. M. En: *Platinum-Based Drugs in Cancer Therapy*; Kelland, L. R., Farrell, N., Eds.; Humana Press: Totowa, NJ, **2000**; Vol. 7, 63.

4. Conclusiones

1. La comparación de los datos de citotoxicidad de los complejos *trans*-[PtCl₂(R y S-1-metilpropilamina)(PPh₃)] y *trans*-[PtCl₂(S-2-metilbutilamina)(PPh₃)] con los de sus correspondientes racémicos, muestra que no existe diferencia en la actividad citotóxica de los complejos al utilizar aminas enantiómeras en la síntesis de los mismos.
2. La introducción del ligando voluminoso PPh₃ en el entorno del átomo de platino, con aminas alifáticas en *trans*, produce un aumento en la actividad citotóxica tanto en células normales como tumorales. Este aumento de la citotoxicidad podría ser debido a un mayor daño o distorsión en el DNA producido por el volumen estérico de la fosfina, así como una mayor acumulación de complejo en la célula debido al carácter lipofílico de ésta, que le permitiría atravesar la membrana plasmática de la célula con mayor facilidad.
3. La determinación de la actividad citotóxica de los complejos de Pt(II): *trans*-[PtCl₂(isopropilamina)(PPh₃)] y *trans*-[PtCl₂(amina)(4-hidroximetilpiridina)] y *trans*-[PtCl₂(amina)(3-hidroximetilpiridina)], donde amina = NH₃ o isopropilamina, en células normales y tumorales, pone de manifiesto que la sustitución de un ligando NH₃ por la 3 ó 4- hidroximetilpiridina en la molécula de transplatino no produce aumento de actividad citotóxica en células tumorales; sin embargo, la sustitución de los dos ligandos NH₃ por la isopropilamina y el ligando 3 ó 4- hidroximetilpiridina provoca un aumento de la citotoxicidad en células tumorales, tanto sensibles como resistentes al cisplatino.
4. Los datos de citotoxicidad, junto con la solubilidad, de los complejos *trans*-[PtCl₂(isopropilamina)(3-hidroximetilpiridina)] y *trans*-[PtCl₂(isopropilamina)(4-hidroximetilpiridina)], indican que éstos son los más interesantes para un estudio más completo.

5. Los complejos de platino que presentan los ligandos isopropilamina y 3- ó 4-hidroximetilpiridina en *trans*, producen un mayor número de aductos intracatenarios estables, menor capacidad de labilización de los aductos por otros componentes celulares, y cambios conformacionales en la doble hélice de carácter no desnaturalizante, que parecen ser necesarios para producir una buena actividad citotóxica

6. Aunque el daño producido en el DNA por los complejos *trans*-[PtCl₂(isopropilamina)(3-hidroximetilpiridina)] y *trans*-[PtCl₂(isopropilamina)(4-hidroximetilpiridina)] es similar, la diferente posición del grupo hidroximetilo parece influir sobre la respuesta de la maquinaria celular al daño.

7. La presencia de la proteína p53 y la diferente posición del grupo hidroximetilo en los complejos *trans*-[PtCl₂(isopropilamina)(3-hidroximetilpiridina)] y *trans*-[PtCl₂(isopropilamina)(4-hidroximetilpiridina)] influye sobre la fase donde se puede detener el ciclo celular.