



Universidad Autónoma de Madrid

Facultad de Ciencias

Departamento de Química Inorgánica

TESIS DOCTORAL

"Síntesis y reactividad a nivel molecular de diferentes series de complejos metálicos de Pt^{II}, Pt^{IV} y Pd^{II} con actividad antitumoral"

Francisco Navas López

Madrid, 2017



Facultad de Ciencias

Departamento de Química Inorgánica

Adoración Gómez Quiroga, profesora titular del Departamento de Química Inorgánica de la Universidad Autónoma de Madrid,

HACE CONSTAR:

Que la presente tesis doctoral titulada "**Síntesis y reactividad a nivel molecular de diferentes series de complejos metálicos de Pt^{II}, Pt^{IV} y Pd^{II} con actividad antitumoral**" ha sido realizada en el Departamento de Química Inorgánica de la Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma de Madrid bajo su dirección, y reúne las condiciones requeridas para optar al Grado de Doctor (Mención Doctorado Internacional).

Y para que así conste, fimo el presente en Madrid a 17 de abril de 2017.

Adoración Gómez Quiroga

La presente Tesis Doctoral ha sido realizada en el Departamento de Química Inorgánica de la Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma de Madrid, bajo la supervisión de la Dra. Adoración Gómez Quiroga. Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad de España (SAF2012-34424 y CTQ 2015-68779-R) y por el programa COST CM 1105.

Durante esta Tesis Doctoral se han publicado los siguientes artículos:

- Navas, F.; Perfahl, S.; Garino, C.; Salassa, L.; Novakova, O.; Navarro-Ranninger, C.; Bednarski, P. J.; Malina, J.; Quiroga, A. G. *J. Inorg. Biochem.*, **2015**, *153*, 211.
- Navas, F.; Mendes, F.; Santos, I.; Navarro-Ranninger, C.; Cabrera, S.; Quiroga, A. G. *Inorg. Chem.*, **2017**, in revision.
- Etxeberri, M.; Cama, M.; Alvarez-Valdés, A.; Navas, F.; Perles, J.; Sánchez, I.; Quiroga, A. G. *J. Inorg. Biochem.*, **2017**, in revision.

Agradecimientos

En primer lugar, quiero dar las gracias a mis padres por tanto esfuerzo, dedicación y paciencia durante toda mi formación académica, desde que empecé la carrera de Química hasta hoy, al final de mi doctorado. Sin ellos, sin su cariño y apoyo, sin esos ánimos constantes en los momentos más difíciles, esto no hubiese sido posible. Agradecer también a mis hermanos, Pedro y Mirella, su enorme ayuda, tanto psicológica como informática, demostrando que no puede haber hermanos mejores que ellos.

Quiero agradecer especialmente a mi tutora, la Dra. Adoración Gómez Quiroga, la oportunidad que me brindó en su día de poder realizar este proyecto tan bonito e interesante, por todo lo que me ha enseñado, por su enorme paciencia en más de una ocasión, por transmitirme esa pasión por la química que sólo he conocido en ella, y por todos los actos, estancias y cursos a los que me envió para completar mi formación.

A todos los profesores y personal del Departamento de Química Inorgánica de la UAM, por su constante apoyo. En especial a la Prof. Carmen Navarro Ranninger, por permitirme ser parte del grupo de investigación. A Amparo, por su continuo apoyo, cariño y gran experiencia. A Ana González, cuyo cariño, dedicación y ganas de ayudar, me han hecho conocer a una excelente persona y amiga. A Ana Matesanz, por toda su ayuda en el tramo final de la tesis. Y a Silvia, mi co-tutora durante el máster, por sus enseñanzas y ayudas durante estos años. Personas tan entrañables para mí, como Leti, Diego y Sonia, me han enseñado a tomarme las cosas con más tranquilidad, y a saber enfrentarme a las situaciones difíciles que se pueden presentar en este campo.

Quiero agradecer de corazón el esfuerzo y dedicación que durante estos dos últimos años me han dado las personas del IIB. A la Dra. Isabel Sánchez, por todo lo que me ha enseñado, por sus ánimos y por su ayuda en la participación y corrección de uno de los capítulos de este trabajo. A Jone, por ser una gran compañera y amiga, a Nuri y a Natalia.

A las personas que pude conocer durante la realización de mi estancia investigadora en Florencia, al Prof. Luigi Messori, Tiziano, Lara, Federica y Damiano. Y durante mi estancia en la República Checa, gracias al Prof. Viktor Brabec, al Dr. Jaroslav Malina, Olga y Michaela.

Gracias a todo el personal del SIdI. A Loli y Antonio de RMN, por su gran ayuda y paciencia. A todo el equipo de espectrometría de masas. A Pascual, por esos análisis elementales tan rápidos. A

Josefina Perlés, por toda la ayuda, información y alegrías que me ha regalado en estos últimos meses.

Gracias por esos momentos compartidos con toda la gente que ha trabajado en el laboratorio conmigo durante estos años de tesis y que hoy ya no están por aquí, como Estela, Laura, Andrea y Lidia. Esos buenos ratos y esa ayuda nunca serán olvidados. Y a las personas que hoy día forman parte de este laboratorio: Itziar, Mari Carmen, Eva, María, Marta, Paula y Raquel. Estoy convencido de que vuestras ganas de trabajar y aprender os llevarán muy lejos.

Quiero agradecer especialmente toda el apoyo y amistad que me brindaron personas tan entrañables como Ángeles, Toni, Álvaro y Marcelo, porque durante más de dos años hicieron que el trabajo en el laboratorio, además de fructífero, fuese de los más agradables que he podido tener. Esta tesis tiene una parte enteramente vuestra, y nuestra amistad durará para siempre.

A la colaboración de Ana Fernández Salor en uno de los capítulos de esta tesis doctoral. Juntos pudimos obtener algunos resultados tan bonitos como interesantes, y que hoy están reflejados en este trabajo.

A toda la gente de Becerril de la Sierra. Macarena, Inma y Rocho (mis tres grandes apoyos desde hace tanto tiempo), Juanma, Anita, Meri, Adri, Sofi, Lulu, Mariete, Vane, Patri, Miki y todos los de mi peña, por todas esas risas, fiestas y ánimos durante estos tres años. Porque cada vez que me llamabais cerebritito, sabía que era para animarme y para darme cuenta de la importancia de lo que estaba llevando a cabo. Y porque sé, sin duda alguna, que vosotros sois de las personas que se alegran de corazón, de que muy pronto pueda llamarme doctor.

Finalmente, no puedo terminar estos agradecimientos sin dedicarle unas líneas a tres personas tan importantes en mi vida, que prácticamente puedo llamarles hermanos: Jorge, Carolina y Leonor. Sé que nos vemos poco, que ya no es igual que antes, pero cada ánimo que he recibido por vuestra parte, siempre ha sido algo más que una ayuda. Porque no sé qué sería de mí sin vosotros, gracias de corazón.

"Hay más cosas en el cielo y la tierra, Horacio, de las que puede
soñar tu filosofía"

Hamlet. William Shakespeare.

Índice

Capítulo 1. Introducción

1.1	Introducción.....	2
1.1.1	Metales en Biología.....	2
1.1.2	Complejos metálicos en medicina	2
1.2	Complejos metálicos antitumorales clásicos: cisplatino y derivados.....	3
1.2.1	Descubrimiento del cisplatino	3
1.2.2	Síntesis del cisplatino	4
1.2.3	Mecanismo de acción del cisplatino	4
1.2.4	Resistencia	6
1.2.5	Otros complejos de Pt utilizados en clínica	6
1.3	Complejos metálicos con estructura no convencional.....	8
1.3.1	Complejos de Pt con isomería <i>trans</i> : Mecanismo de acción del transplatino	8
1.3.2	Complejos <i>trans</i> de Pt con actividad antitumoral	8
1.3.3	Variaciones en los ligandos salientes.....	9
1.3.4	Variaciones en el estado de oxidación: complejos de Pt ^{IV}	10
1.3.5	Variaciones en ligandos: coordinación de ligandos farmacológicamente activos a metales.....	11
1.3.6	Complejos metálicos con ligandos TSCN	12
1.4	Fotoactivación de complejos metálicos con luz UV	13
1.4.1	Transiciones electrónicas en complejos metálicos.....	13
1.4.2	Reactividad de los estados excitados en complejos metálicos	14
1.4.3	Terapias antitumorales en complejos activados con luz UV	15
1.4.4	Características de complejos metálicos fotoactivables	16
1.5	Bibliografía.....	18

Capítulo 2. Complejos de Pt^{II} con ligandos yoduro

2.1	Introducción.....	22
2.1.1	Complejos <i>cis</i> de Pt ^{II} con ligandos yoduro con las aminas alifáticas iguales	22
2.1.2	Complejos <i>cis</i> y <i>trans</i> de Pt ^{II} -I con la mismas aminas alifáticas	23
2.1.3	Complejos <i>trans</i> de Pt ^{II} -I con aminas alifáticas diferentes	25
2.1.4	Fotoactivación de complejos metálicos con luz UV.....	26
2.2	Resultados.....	27
2.2.1	Objetivos	27
2.2.2	Síntesis	27
2.2.3	Estudios de unión Pt-ADN en oscuridad para conocer la naturaleza de la interacción	28
2.2.4	Estudios de los complejos de Pt en presencia de radiación para conocer la naturaleza de la interacción	35
2.3	Parte experimental	42
2.3.1	Materiales y reactivos.....	42
2.3.2	Estudios de unión de los complejos al ADN <i>in vitro</i> en ausencia de radiación	43
2.3.3	Estudios de unión de los complejos al ADN <i>in vitro</i> en presencia de radiación.....	45
2.4	Bibliografía.....	48

Capítulo 3. Actividad citotóxica *in vitro* de complejos *cis* y *trans*-[PtX₂(amina)(amina')] (X = cloruro/yoduro), análisis de su impacto en la activación de la apoptosis y su reactividad frente a modelos de ADN

3.1	Introducción.....	51
3.1.1	Cáncer y carcinogénesis.....	51
3.1.2	Ciclo celular.....	51
3.2	Resultados.....	55
3.2.1	Objetivos.....	55
3.2.2	Síntesis.....	55
3.2.3	Reactividad del complejo I-5 frente a 9-EtG.....	55
3.2.4	Evaluación de la actividad citotóxica de los complejos de Pt-Cl con aminas alifáticas.....	57
3.2.5	Evaluación de la actividad citotóxica de los complejos de Pt-I con aminas alifáticas.....	58
3.2.6	Análisis del ciclo celular.....	58
3.2.7	Activación de la ruta apoptótica por los complejos.....	60
3.3	Parte experimental.....	62
3.3.1	Cultivos celulares y fármacos.....	62
3.3.2	Reactividad del complejo I-5 frente a 9-EtG.....	62
3.3.3	Estructura de rayos X.....	63
3.3.4	Ensayos de citotoxicidad de los complejos y cisplatino en la línea celular tumoral MKN45.....	63
3.3.5	Ensayos de ciclo celular.....	64
3.3.6	Ensayos de Western Blot con caspasa-3, PARP-1 y p53.....	64
3.4	Bibliografía.....	66

Capítulo 4. Complejos de Pt^{IV} con ligandos naftalimida

4.1	Introducción.....	69
4.1.1	Antecedentes.....	69
4.1.2	Complejos de Pt ^{IV} en terapia antitumoral.....	70
4.1.3	Mecanismo de acción y reducción de los complejos de Pt ^{IV}	71
4.1.4	Sustancias biológicas reductoras.....	73
4.1.5	Métodos de síntesis de complejos de Pt ^{IV} en la actualidad.....	74
4.1.6	Complejos de Pt ^{IV} con actividad biológica.....	75
4.2	Resultados.....	78
4.2.1	Objetivos.....	78
4.2.2	Síntesis de ligandos, complejos <i>cis</i> -[PtCl ₂ (amina) ₂] y complejos <i>trans</i> -[PtCl ₂ (amina)(L)] (L = abid, dibibi).....	78
4.2.3	Síntesis de los complejos <i>trans</i> de Pt ^{IV}	79
4.2.4	Estudios de la estabilidad de los complejos de Pt ^{IV}	82
4.2.5	Interacción de los complejos de Pt ^{IV} frente al ADN del plásmido pBR322 y reactividad en presencia de reductores biológicos.....	84
4.2.6	Estudios por ¹⁹⁵ Pt RMN de reducción de los complejos de Pt ^{IV} con reductores biológicos.....	87

4.2.7	Estudios por HPLC de reducción de los complejos Pt ^{IV} con reductores biológicos	88
4.2.8	Reactividad de los complejos Pt ^{IV} -1a y 2b con reductores biológicos por ESI MS	89
4.2.9	Evaluación de la actividad citotóxica de los complejos de Pt ^{II} y Pt ^{IV}	91
4.2.10	Determinación de la lipofilicidad de los complejos de Pt ^{IV} y Pt ^{II}	92
4.3	Parte experimental	94
4.3.1	Síntesis de compuestos de partida	94
4.3.2	Complejos <i>trans</i> -[PtCl ₄ (amina)(L)] (L = abid, dibibi)	96
4.3.3	Ensayos de estabilidad de los complejos por HPLC	97
4.3.4	Interacción de los complejos <i>trans</i> de Pt ^{IV} frente al ADN -pBR322	97
4.3.5	Estudio de la reactividad de los complejos <i>trans</i> de Pt ^{IV} con agentes reductores por resonancia de ¹⁹⁵ Pt RMN	98
4.3.6	Ensayos de citotoxicidad	98
4.3.7	Determinación de la lipofilicidad de los complejos de Pt ^{IV} y Pt ^{II}	99
4.4	Bibliografía	100

Capítulo 5. Complejos de Pd^{II} y Pt^{II} con ligandos farmacológicamente activos: tiosemicarbazonas

5.1	Introducción	103
5.1.1	Ligandos tiosemicarbazona	103
5.1.2	Coordinación de los ligandos TSCN	104
5.1.3	Propiedades farmacológicas de las TSCN	105
5.1.4	Metalación de las TSCN: complejos de Pd ^{II} y Pt ^{II}	106
5.1.5	Actividad farmacológica de complejos metálicos con ligandos TSCN	108
5.1.6	Complejos ciclometalados de Pt ^{II} y Pd ^{II} sintetizados en el grupo de investigación	109
5.2	Resultados	111
5.2.1	Objetivos	111
5.2.2	Síntesis de complejos TSCN de Pd ^{II}	111
5.2.3	Estudio del comportamiento en disolución y lipofilidad de complejos metálicos con ligandos TSCN	117
5.2.4	Estudios de interacción de los complejos frente a proteínas	120
5.2.5	Estudios de interacción del complejo C1 con 1-metilimidazol	127
5.2.6	Estudios de interacción de los complejos C1 y T5 con modelos de ADN	132
5.3	Parte experimental	134
5.3.1	Reactivos y disolventes	134
5.3.2	Síntesis de complejos TSCN de Pd ^{II}	134
5.3.3	Estructura de rayos X	137
5.3.4	Estudio del comportamiento en disolución y lipofilicidad de los complejos	138
5.3.5	Estudio de la afinidad de los complejos con lisozima y RNasa por UV-Vis	138
5.3.6	Estudio de la interacción del complejo 1 con Lisozima y RNasa mediante ESI MS	139
5.3.7	Interacción del complejo C1 con Melm por ¹ H-RMN	139
5.3.8	Estudios de interacción de los complejos C1 y T5 con modelos de ADN por UV-Vis	140
5.4	Bibliografía	142

Chapter 6. Summary and conclusions

Chapter 2	146
Chapter 3	147

Chapter 4.....	148
Chapter 5.....	150

Capítulo 6. Resumen y conclusiones

Capítulo 2.....	153
Capítulo 3.....	154
Capítulo 4.....	155
Capítulo 5.....	157

Abreviaturas y acrónimos

5'-GMP	5'-Guanosina monofosfato
9-EtG	9-Etil-guanina
A2780	Células de carcinoma de ovario
A2780cisR	Células de carcinoma de ovario resistentes a cisplatino
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AMP	Adenosina monofosfato
APAF-1	Proteasa apoptótica activadora del factor-1 (Apoptosis protease-activating factor-1)
ARN	Ácido ribonucleico
AsA	Ácido ascórbico
BCA	Ácido bicinconínico
CBDCA	Ciclobutano-1,1 dicarboxilato
CDDP	Cisplatino (<i>cis</i> -diaminodicloroplatino(II))
CDK	Complejo ciclinas-kinasa dependiente
CMP	Citosina monofosfato
CT	Transferencia de carga (Charge Transfer)
CT ADN	ADN de timo de ternera (Calf-Thymus DNA)
CTR1	Proteína transportadora de cobre (Copper Transport 1)
Cys	Cisteína
Cyt C	Citocromo C
DACH	Diaminociclohexano
DC	Dicroísmo circular
DDR	Respuesta al daño en el ADN (DNA damage response)
DFT	Teoría del Funcional de la Densidad (Density Functional Theory)
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
EPR	Resonancia paramagnética electrónica (Electronic Paramagnetic Resonance)
FAAS	Absorción atómica de llama
FDA	Administración de medicamentos y alimentos (Food and Drug Administration)
Gln	Glutamina
GSH	Glutación (γ-glutamilcisteinilglicina)
GST	Glutación-S-transferasa
HBL-100	Células epiteliales
HCT116+/+	Células de carcinoma de colon humano (HCT116wt)
HCT116-/-	Células de carcinoma de colon humano con supresión de p53 (HCT116ko)
HeLa	Células derivadas de cáncer cérvico-uterino
HEWL	Lisozima de huevo de gallina (Hen Egg-White Lysozyme)
His 15	Histidina 15
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation (RMN)
HMG	Grupo de alta movilidad (High mobility group)
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Correlation (RMN)
IC ₅₀	Concentración de inhibición del 50% del cultivo celular
ICL	Cruzamientos intercatenarios (Interstrand crosslinks)

JM 9	Iproplatino (<i>cis,trans,cis</i> -(dicloro-dihidroxo-diisopropilamina)platino(IV))
JM216	Satraplatino(<i>trans,cis,cis</i> -bis(acetato)aminodicloro(ciclohexilamina)platino(IV))
JM335	<i>trans,trans,trans</i> -[PtCl ₂ (OH) ₂ (C ₆ H ₁₁ NH ₂)(NH ₃)]
N-AcCys	N-Acetilcisteína
LCLC-103H	Células de adenocarcinoma de células no pequeñas de pulmón
L1210	Células de leucemia murina
LMCT	Transferencia de carga del ligando al metal (Ligand-Metal Charge Transfer)
L-Met	L-Metionina
Melm	1-metilimidazol
Mdm2	Proteína que se corresponde con el nombre tanto de la proteína como del gen que la codifica (murine double minute 2)
MKN45	Células de adenocarcinoma gástrico
MLCT	Transferencia de carga del metal al ligando (Metal-Ligand Charge Transfer)
MS ESI	Espectrometría de masas con ionización por electrospray
MS FAB	Espectrometría de masas de bombardeo rápido de átomos
NCI-H460	Células grandes de cáncer de pulmón
P388	Células de leucemia murina
Pam-ras	Línea celular de queratinocitos tumorales murinos que contienen el oncogén H-ras
PARP	Poli (ADP-ribosa) polimerasa
PBS	Tampón fosfato salino
PD	Fotodiagnos (Photodiagnosis)
PDT	Terapia fotodinámica (Photodynamic Therapy)
PT	Terapia fotoquímica (Photochemical Therapy)
PTT	Terapia fototérmica (Photothermic Therapy)
Rb	Gen de susceptibilidad del retinoblastoma
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
RNasa A	Ribonucleasa A de páncreas bovino
RPMI	Medio Roswell Park Memorial Institute
SAR	Reglas de estructura-actividad (Structure-Activity Relationship)
SISO	Células de adenocarcinoma uterino cervical
SW1573	Células no pequeñas de pulmón
ICL	Cruzamientos intercatenarios (Interstrand crosslinks)
T-47D	Células de cáncer de mama
TD-DFT	Teoría del funcional de la densidad dependiente del tiempo (Time-Dependent Density Functional Theory)
t_m	Temperatura de melting
TSCN	Tiosemicarbazona
TTBS	Disolución salina con Tris y polisorbato
TU	Tiourea
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana
VHS-1	Virus del herpes simple-1
WB	Western-Blot
WiDR	Células de cáncer de colon

Glosario

Apoptosis: Proceso ordenado por el que la célula muere ante estímulos extra ó intracelulares, también llamado muerte celular programada.

Apoptosoma: Complejo proteico que participa en la apoptosis dirigida desde la mitocondria ó apoptosis intrínseca.

Carcinoma de ascitis de Erlich: Tumor transplantable maligno y pobremente diferenciado que crece en forma ascítica. Apareció originalmente como carcinoma espontaneo de mama en un ratón.

Cáncer pulmonar de Lewis: Descubierta por la Dra Margaret Lewis en 1951. Este tumor se origina espontáneamente como carcinoma de pulmón, no es muy hemorrágico y la mayor parte del tejido tumoral es una masa homogénea semifirme.

Citocromo C: Proteína pequeña de membrana que participa como transportador electrónico en la cadena respiratoria mitocondrial.

Cofactor enzimático: Componente no proteico y de baja masa molecular, necesario para la acción de una enzima.

Detoxificación: Sistema por el cual un organismo es capaz de neutralizar y eliminar toxinas.

Escorbuto: Enfermedad producida por la carencia o escasez de vitamina C, que se caracteriza por el empobrecimiento de la sangre, manchas lívidas, ulceraciones en las encías y hemorragias.

Esteroides: Conjunto de lípidos secretados por las glándulas endocrinas, presentes tanto en animales como en vegetales. Los esteroides incluyen el colesterol, las hormonas sexuales, los glucocorticoides y la aldosterona.

Hepatotoxicidad: Efecto tóxico sobre la actividad del hígado.

Isogénico: Organismos o células que comparten el mismo grupo de genes.

Nefrotoxicidad: Efecto tóxico sobre la actividad renal.

Neuropatía periférica: Lesiones producidas en un nervio ó grupo de nervios que llevan la información desde y hasta el cerebro.

Neurotoxicidad: Efecto tóxico que altera las funciones del sistema nervioso central.

Ototoxicidad: Perturbaciones transitorias ó definitivas de las funciones auditivas.

Proteína adaptadora: Proteína que posee dominios que sirven para el reconocimiento ó acoplamiento de una ó varias proteínas.

Receptor positivo de estrógenos: Células que tienen una proteína receptora que se une a la hormona estrógeno. Las células cancerosas que tienen receptores de estrógeno positivos pueden

necesitar estrógeno para formarse, y pueden dejar de crecer y morir cuando se las trata con sustancias que impiden tanto su unión con el estrógeno como la actividad de este.

Ribonucleótido reductasa: Enzima que cataliza la formación de desoxirribonucleótidos a partir de ribonucleótidos.

Topoisomerasa II (girasa): Enzima que actúa durante sobre el ADN durante el proceso de replicación, cortando las dos hebras, y pasando otra doble cadena intacta por el hueco formado en la ruptura.

Capítulo 1. Introducción

1.1 Introducción

1.1.1 Metales en Biología

Muchos elementos metálicos esenciales desarrollan un papel fundamental en los sistemas vivos, debido a que están dotados de unas propiedades únicas, entre las que se incluyen la actividad redox, números de coordinación variables y reactividad frente a muy diversos sustratos orgánicos¹.

La habilidad de los metales de perder fácilmente electrones, genera cationes solubles en los fluidos biológicos, y muy reactivos frente a moléculas biológicas ricas en electrones, como ADN y proteínas. Los metales realizan una amplia variedad de funciones biológicas, por ejemplo, el transporte de oxígeno a todo el organismo, transporte de electrones ó cofactores enzimáticos, etc². Metales como Cu, Zn, Fe y Mn forman parte de metaloenzimas, las cuales catalizan multitud de reacciones químicas necesarias para la vida. La hemoglobina es una proteína que contiene Fe y es capaz de unirse a O₂ para transportarlo; el Zn²⁺ es esencial para la organización estructural de los dedos de cinc, que regulan la función de genes en el núcleo celular; el Ca²⁺ es vital para el desarrollo de los huesos del cuerpo humano y también un importante catalizador en el sistema biológico; etc².

Debido a esta reactividad tan diversa, los metales esenciales se encuentran muy regulados en el organismo, ya que deficiencias en su concentración están asociadas con diversos desórdenes patológicos³.

La habilidad para reconocer y entender a nivel molecular las enfermedades asociadas a deficiencia de metales en el organismo, y como tratarlas, constituye un aspecto fundamental de la Química Bioinorgánica, además del estudio del papel de los iones metálicos y complejos metálicos como agentes farmacológicos³.

1.1.2 Complejos metálicos en medicina

La utilización de metales y sales metálicas para uso médico ha estado presente a través de la historia del ser humano. Quizás, uno de los hallazgos más importantes fue el descubrimiento serendípico de la actividad antitumoral del cisplatino por Rosenberg y colaboradores⁴ en 1965. Un sinnúmero de complejos metálicos han sido sintetizados y utilizados como fármacos y profármacos, con una gran variedad de fines: anticancerígenos, antiinflamatorios, antibacterianos, antirreumáticos y antimaláricos⁵. Algunos ejemplos se muestran en la Figura 1.1:

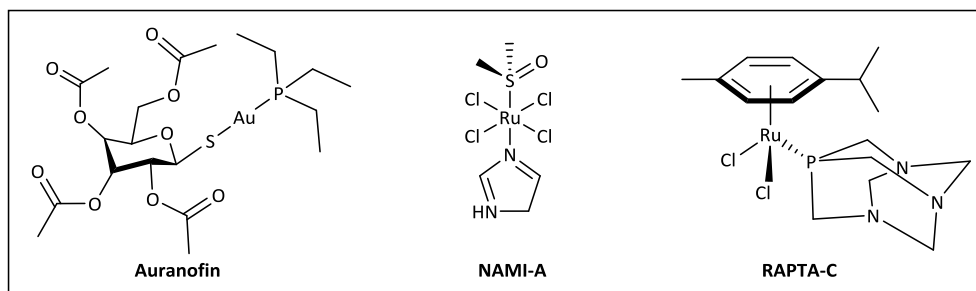


Figura 1.1. Estructuras moleculares de complejos metálicos con propiedades farmacológicas.

El auranofin (2,3,4,6-tetra-O-acetil-1-tio-O-D-glucopiranosato-S-trietilfosfina oro (I)), que se emplea en el tratamiento de la artritis reumatoide; o diversos complejos de Ru, como NAMI-A (*trans*-imidazol-dimetilsulfóxido-tetracloro rutenato); y RAPTA C ($\text{Ru}(\eta^6\text{-C}_6\text{H}_5\text{-isop-Me})(\text{PTA})\text{Cl}_2$), que entraron en fases clínicas I y II por sus propiedades antitumorales⁵.

La investigación de fármacos metálicos antitumorales ha evolucionado hasta desarrollar especies más selectivas frente a diversas dianas celulares^{6,7}. Por este motivo, la fusión entre la biología y la química llevó al nacimiento de la química bioinorgánica, que proporciona la rama de la ciencia más adecuada para descubrir y mejorar la investigación de fármacos metálicos antitumorales⁸.

1.2 Complejos metálicos antitumorales clásicos: cisplatino y derivados

1.2.1 Descubrimiento del cisplatino

Barnett Rosenberg era un biofísico de la Universidad de Michigan que estudiaba el papel de la corriente eléctrica en la división celular. Para ello, utilizaba células de la bacteria *Escherichia Coli* (*E. Coli*) en una disolución de cloruro amónico, sobre la que se aplicaba corriente eléctrica a partir de unos electrodos de Pt sumergidos en la disolución, que finalizó con la inhibición de la división celular. Tras muchos estudios, Rosenberg confirmó que este fenómeno no era debido a la corriente generada en la disolución, sino a la formación de productos de hidrólisis en la superficie de los electrodos de platino⁹. De esta manera se llegó al descubrimiento serendípico de la actividad anticancerígena del cisplatino, un complejo sintetizado por primera vez por Mychel Peyrone¹⁰ en 1845. El cisplatino fue aprobado en 1978 por la FDA (Food and Drug Administration) para su utilización como agente antitumoral en todo el mundo. Actualmente es el fármaco metálico más utilizado en terapia antitumoral, siendo muy activo en diversos tipos de cáncer como el de ovario y testículo¹¹.

1.2.2 Síntesis del cisplatino

La síntesis del cisplatino ha sufrido diversas variantes con el tiempo. Inicialmente, los métodos de síntesis a partir de K_2PtCl_4 llevaban a la inevitable formación de la sal verde de Magnus, $([Pt(NH_3)_4][PtCl_4])$ con formación del isómero *trans* como subproducto de la reacción, lo que implicaba métodos complejos y tediosos de separación¹². Este problema fue solventado por Dhara¹³ en 1970, y su método de síntesis del cisplatino (Figura 1.2) mejoró notablemente su pureza.

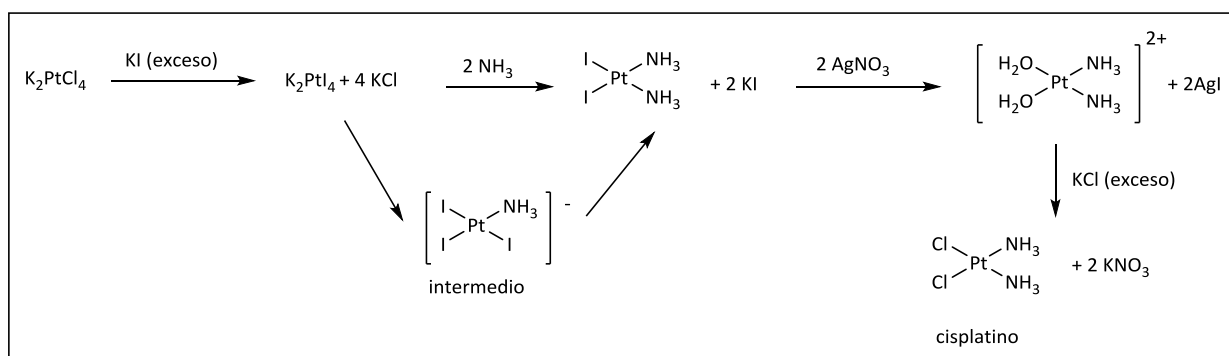


Figura 1.2. Esquema de síntesis del cisplatino.

Se obtiene un sólido amarillo, que es el cisplatino. La ausencia del isómero *trans* en este método de síntesis se atribuye al mayor efecto *trans* de los ligandos yoduro comparado con el de los ligandos cloruro frente al NH_3 ¹⁴.

1.2.3 Mecanismo de acción del cisplatino

La principal diana farmacológica del cisplatino es el ADN¹⁵. Este fármaco se administra intravenosamente al paciente debido a la alta concentración de iones cloruro (100 mM) presente en el plasma sanguíneo, que evita la sustitución de los ligandos cloruro coordinados al Pt por moléculas de H_2O , en un proceso conocido como acuación¹⁴. Sin embargo, debido a la alta afinidad del platino por azufre y selenio, presentes en proteínas plasmáticas, el cisplatino puede interaccionar con ellas. Se ha demostrado que entre 65-98% de este complejo queda retenido por las proteínas del plasma sanguíneo^{16,17}, lo que produce su desactivación y varios de los efectos secundarios asociados con su tratamiento^{16,18-20}. La cantidad de complejo que permanece inalterado llega a la célula y entra en ella principalmente por difusión pasiva, aunque en los últimos años se ha descubierto su proceso de transporte activo, mediado por proteínas de la membrana plasmática transportadoras de Cu, CTR1^{21,22}.

Una vez en el medio celular, la baja concentración de iones cloruro presentes en el mismo (4 mM) facilita el proceso de acuación del cisplatino²³, generando las especies $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}(\text{OH}_2)]^+$, que es la más reactiva, y $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{OH}_2)_2]^{2+}$. Aunque son muchos los componentes celulares que pueden interactuar con el cisplatino, su principal diana biológica es el ADN¹⁵, formando enlaces covalentes entre el Pt y el N7 de las bases de purina²³. Estas uniones generan primeramente cruzamientos 1,2 ó 1,3-intracatenarios y, en menor medida, cruzamientos intercatenarios (Figura 1.3). Los aductos generados por el cisplatino con el ADN producen la activación de varias señales de transducción²⁴.

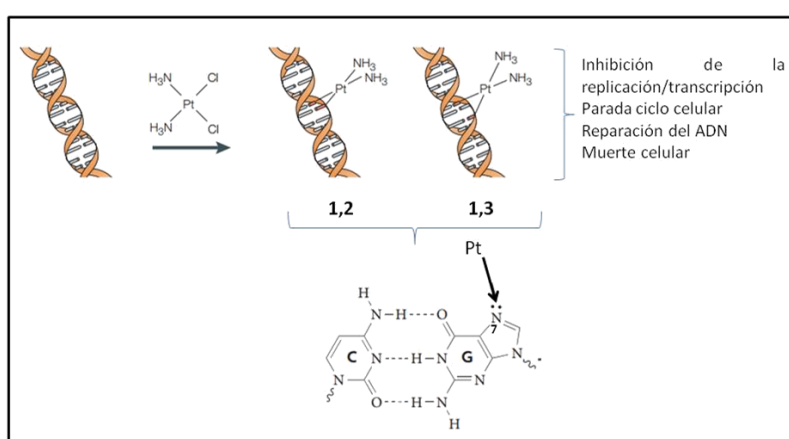


Figura 1.3. Formación y efectos de los aductos generados por el cisplatino en el ADN. Coordinación del Pt al N7 de las bases de purina²³.

La formación de aductos Pt-ADN provoca distorsiones en la estructura de la doble hélice, consecuencia de la platinación. Estas distorsiones son reconocidas por diversas proteínas celulares, algunas de las cuales participan además en el proceso de reparación²⁵. Los aductos Pt-ADN impiden el desarrollo normal de los procesos celulares, como la replicación y transcripción, que requieren la separación de las dos cadenas. En ambos casos, se produce la parada del ciclo celular. También se ven interferidos diversos procesos de transducción de señales, como los que controlan el crecimiento celular, la diferenciación y la respuesta al estrés²⁴. Como resultado final, se produce la muerte celular apoptótica²⁶.

Sin embargo, la administración de cisplatino en terapia antitumoral produce su acumulación en el organismo, lo que puede generar en el paciente graves efectos secundarios, como son nefro-, hepato-, oto- y neurotoxicidad, desórdenes gastrointestinales, pérdida del cabello o anemia²³. Otro gran inconveniente que presenta la administración de este fármaco, es la generación de resistencia al mismo en diversos tipos de cáncer²⁷.

1.2.4 Resistencia

El uso prolongado de cisplatino en quimioterapia puede acabar generando resistencia por parte del tumor. Esta resistencia puede ser intrínseca ó adquirida, y reduce la eficiencia de este fármaco²⁸. La resistencia se produce por cambios a nivel molecular en las células tumorales, entre los que destacan el aumento en los sistemas de expulsión, detoxificación por agentes como GSH, metalotioneínas y otros agentes antioxidantes, evasión de la apoptosis y el aumento en los niveles de reparación del daño en el ADN²⁹.

La combinación del cisplatino con otros agentes ha proporcionado la disminución de algunos de sus efectos secundarios, aunque otros efectos tóxicos como la ototoxicidad y neuropatías periféricas siguen siendo problemas graves. Esto ha llevado a la realización de diversas variaciones en la estructura de complejos de Pt, con el fin de minimizar los efectos secundarios y aumentar su eficacia frente al tumor⁵.

1.2.5 Otros complejos de Pt utilizados en clínica

Se comenzó una amplia e intensa búsqueda de análogos estructurales al cisplatino capaces de minimizar sus graves efectos secundarios. Sin embargo, únicamente dos de ellos fueron aprobados por la FDA para su uso mundial como agentes antitumorales, el carboplatino (1989) y el oxaliplatino (2002)³⁰, los cuales se muestran en la Figura 1.4. El carboplatino presenta menos efectos secundarios que el cisplatino, aunque su actividad clínica y resistencia es similar³¹. Por otra parte, el oxaliplatino muestra actividad anticancerígena frente células de leucemia L1210³², resistentes al cisplatino. Se cree que en este complejo, el ligando voluminoso DACH (diaminociclohexano), es el que contribuye al diferente proceso de reconocimiento del daño generado en el ADN platinado, de tal modo que esto le confiere un aumento de la actividad^{25,33}.

Otros complejos como nedaplatino, lobaplatino y heptaplatino (Figura 1.4) han sido aprobados para su uso exclusivamente en Japón, China y Corea, respectivamente⁵.

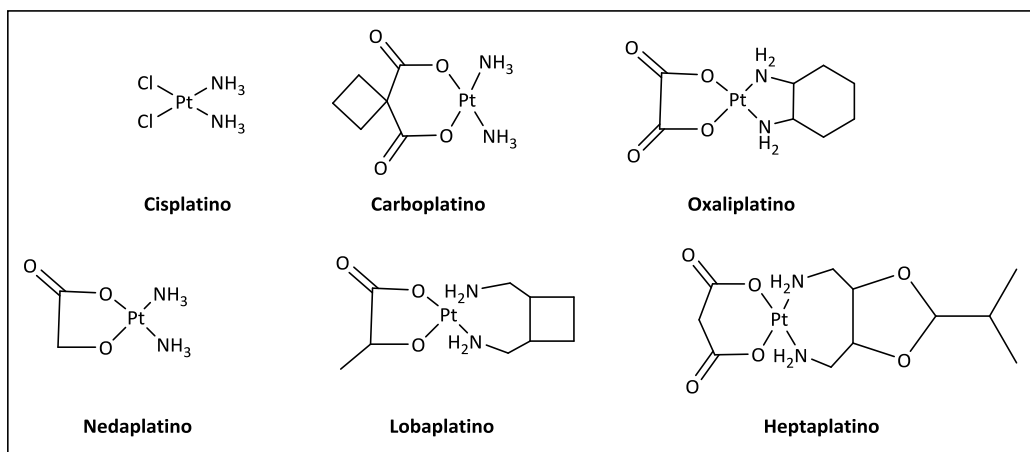


Figura 1.4. Complejos de Pt utilizados aprobados a nivel mundial y en algunos países.

Este escaso éxito obtenido en la búsqueda de análogos del cisplatino posiblemente fuese debido a la restricción de usar únicamente las "relaciones de estructura-actividad" (SAR) de este complejo, establecidas por Cleare y Hoeschele³⁴ en 1977, tras haber estudiado numerosos complejos de Pt, y que son las siguientes:

- Los complejos deben tener dos ligandos amina en posición *cis*, puesto que los de isomería *trans* eran inactivos.
- Es necesario, aunque no suficiente para el complejo, presentar dos grupos salientes. La facilidad con la que los dos grupos salientes se sustituyen en el complejo afecta directamente a su actividad y toxicidad.
- El complejo debe ser neutro.
- Los complejos que muestran una mayor actividad son aquellos que tienen un menor número de sustituyentes alquilo sobre los ligandos amina. Cada amina, además, debe poseer al menos un átomo de hidrógeno enlazado al nitrógeno.

De esta manera, la estructura general establecida para los complejos activos que siguen las SARs se muestra en la Figura 1.5:

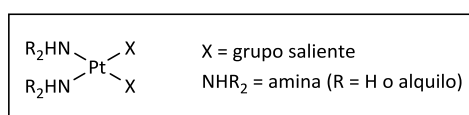


Figura 1.5. Estructura determinada por las SAR establecidas por Cleare y Hoeschele³⁴.

Las excepciones a estas reglas aparecieron mucho más tarde, cuando nuevos complejos de Pt con estructuras no clásicas mostraron una actividad citotóxica *in vitro* superior a la del cisplatino, por ejemplo, complejos de Pt con isomería *trans*^{35,36} y complejos de Pt^{IV}^{30,37,38}.

1.3 Complejos metálicos con estructura no convencional

1.3.1 Complejos de Pt con isomería *trans*: Mecanismo de acción del transplatino

El transplatino se sintetizó por primera vez³⁹ en 1844, pero no fue hasta la década de los sesenta, cuando se descubrió la actividad anticancerígena del cisplatino, que se ensayó su actividad *in vivo*. El transplatino resultó muy poco activo, debido a que se inactiva rápidamente por el gran número de reacciones secundarias que sufre en su camino hacia el ADN^{34,40}.

Los aductos formados con el ADN por el transplatino son cualitativamente diferentes de los del cisplatino, aunque también interacciona preferentemente con el N₇ de los residuos de guanina y adenina. Sin embargo, el transplatino presenta una baja capacidad para formar aductos bifuncionales en la doble hélice del ADN⁴¹, formando preferentemente lesiones monofuncionales⁴². Además, no forma cruzamientos 1,2-intracatenarios, que son las lesiones más comunes generadas por el cisplatino, lo que provoca que las distintas lesiones generadas por ambos isómeros en el ADN sean tratadas de manera diferente.

Los aductos generados por el cisplatino provocan una mayor inhibición en los procesos de replicación y transcripción⁴³ que los del transplatino, los cuales se reparan más rápidamente y no son reconocidos por las proteínas de alta movilidad (HMGB)⁴⁴. De la misma manera, ambos complejos activan distintas señales de transducción para la modulación del daño producido en el ADN^{45,46}. Esto pone de manifiesto que los aductos Pt-ADN formados por el cisplatino no son obligatoriamente determinantes para la actividad antitumoral de los fármacos antitumorales de Pt⁴⁷.

1.3.2 Complejos *trans* de Pt con actividad antitumoral

Los resultados obtenidos inicialmente con transplatino fueron decepcionantes y provocaron que durante varias décadas los complejos *trans* de Pt^{II} no se estudiaran en terapia antitumoral³⁹.

Sin embargo, nuevas modificaciones consiguieron que algunos complejos *trans* de Pt presentaran una significativa actividad *in vitro* frente a células tumorales resistentes al cisplatino. Los primeros análogos del transplatino, tal y como se muestra en la Figura 1.6, tenían como

ligandos aminas planares⁴⁸, iminoéteres⁴⁹ y aminas alifáticas⁵⁰, estos últimos sintetizados por la Prof. Navarro-Ranninger. Estos nuevos complejos mostraron una citotoxicidad similar e incluso superior al cisplatino, lo que supuso una transformación en el diseño de metalofármacos no convencionales.

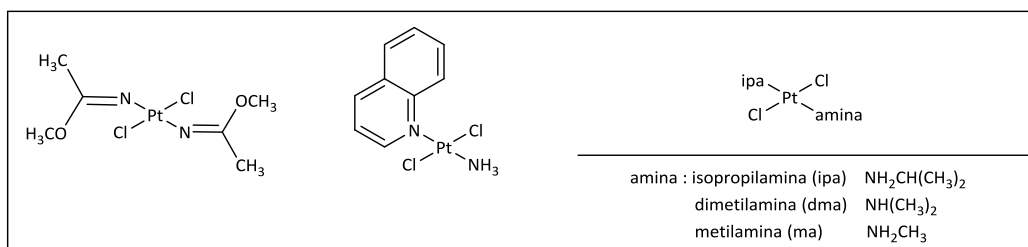


Figura 1.6. Complejos *trans* de Pt antitumorales con aminas planares⁴⁸, iminoéteres⁴⁹ y aminas alifáticas⁵⁰.

En general, la sustitución de los ligandos NH_3 en el transplatino por ligandos más voluminosos produce un aumento de capacidad antiproliferativa *in vitro* que, además, también se observa a menudo en células tumorales resistentes al cisplatino. Desde un punto de vista del mecanismo de acción de los complejos con configuración *trans*, la presencia de ligandos voluminosos produce un retardo en la velocidad de sustitución de los dos ligandos salientes cloruro, lo que disminuye la inestabilidad cinética de estos complejos⁵¹.

Los primeros estudios fueron realizados con derivados de transplatino, donde uno de los ligandos NH_3 es sustituido por un ligando aromático N-heterocíclico (como piridinas, tiazoles ó quinolinas), y mostraban una actividad antiproliferativa comparable a la del cisplatino y, además, no presentando resistencia cruzada⁵. Esta actividad ha sido estudiada en base a ligandos salientes más lábiles (como carboxilatos) y ya han sido determinadas sus interacciones con diferentes tipos de ADN. De este modo, las modificaciones estructurales en este tipo de complejos varían el daño producido en el ADN⁵².

1.3.3 Variaciones en los ligandos salientes

Al estudiar el mecanismo de acción del cisplatino, se comprobó que el enlace Pt-N es menos reactivo y más estable que el enlace Pt-Cl. Los ligandos cloruro sufren el proceso de acuación, produciendo la activación del complejo, por lo que son los ligandos salientes.

En el carboplatino (Figura 1.4), el ligando CBDCA (ciclobutano-1,1-dicarboxilato) sustituye a los dos cloruros del cisplatino, confiriendo a este complejo un aumento de la solubilidad en agua y gran estabilidad, debido a que forma un anillo de seis miembros con el átomo de Pt⁵³. En el

oxalipatino (Figura 1.4), el ligando saliente es una molécula de oxalato, que aumenta aún más la solubilidad en comparación con el carboplatino. Este complejo tiene menos efectos secundarios que cisplatino y carboplatino³², y contiene un anillo de cinco miembros.

Nuestro grupo de investigación sintetizó complejos *cis* de Pt^{II} con aminas alifáticas, sustituyendo los cloruros por haluros más voluminosos, como el yoduro⁵⁴. Debido a que el enlace Pt-I es menos reactivo que el enlace Pt-Cl en disolución acuosa⁵⁵, se esperaba que esta variación en los ligandos salientes podría generar especies antitumorales con mecanismos de acción diferentes al cisplatino. Los complejos *cis* de Pt^{II}-I mostraron actividad citotóxica y una sorprendente interacción frente a proteínas, al quedar retenidos los ligandos yoduro en el complejo, y producirse la pérdida de las aminas⁵⁶. Esta pérdida de los ligandos amina frente a proteínas fue un fenómeno que no se había publicado, hasta que nuestro grupo de investigación lo detectó por RMN, ESI MS y UV⁵⁶, y más tarde mediante difracción de rayos X con la enzima lisozima⁵⁷. También se sintetizaron los isómeros *trans* de Pt-I simétricos⁵⁶, y tres complejos *trans* con diferentes aminas alifáticas en su estructura⁵⁸. Al estudiar la interacción de estos complejos frente a proteínas, estos mostraron una reactividad clásica, similar a la del cisplatino, además una considerable actividad antitumoral, por lo que su estudio biológico necesita ser tratado en mayor detalle, como se hará en el capítulo 2 de esta tesis doctoral.

1.3.4 Variaciones en el estado de oxidación: complejos de Pt^{IV}

La oxidación de complejos de Pt^{II} a Pt^{IV} es otro área muy prometedora en el desarrollo de nuevos metalofármacos con potencial antitumoral⁵⁹. A diferencia de los fármacos de Pt^{II} utilizados actualmente en clínica, que han de administrarse intravenosamente, los complejos de Pt^{IV} son profármacos que se administran oralmente, ya que no hidrolizan a pH ácido. Estos profármacos se reducen en el medio celular, generando la especie de Pt^{II} activa⁶⁰.

Las propiedades fisico-químicas de los agentes de Pt^{IV} difieren significativamente de las de los complejos de Pt^{II}, debido a su diferente geometría. Los complejos de Pt^{IV} son octaédricos, y presentan dos sitios adicionales de coordinación⁶¹, lo que les hace presentar diversas propiedades distintas⁵⁹ a las de sus análogos de Pt^{II}, como se muestra en la Figura 1.7:

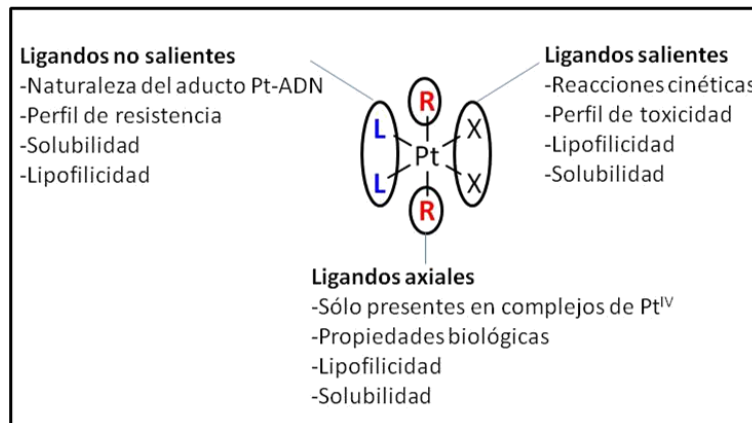


Figura 1.7. Composición de un profármaco de Pt^{IV} y propiedades de los ligandos que rodean al centro metálico⁵⁹.

El aumento en la esfera de coordinación de estos complejos, les hace muy resistentes a la sustitución de ligandos. Su baja reactividad frente a diversos componentes de la sangre, también se traduce en una reducción sistemática de su toxicidad³⁸ y en una mayor cantidad de complejo inalterado que llega a la célula⁶¹, aumentando así su actividad antitumoral⁶¹.

Las distintas modificaciones en los ligandos axiales⁶² de los complejos de Pt^{IV}, alteran la solubilidad de los mismos y, por tanto, su habilidad para penetrar en la célula después de haber sido reducido a su correspondiente complejo de Pt^{II}.

1.3.5 Variaciones en ligandos: coordinación de ligandos farmacológicamente activos a metales

Una estrategia utilizada para aumentar las propiedades farmacológicas de los metalofármacos es la coordinación del metal a ligandos biológicamente activos. Un ejemplo de este tipo de ligandos son las tiosemicarbazonas (TSCN), que son moléculas con amplias propiedades farmacológicas⁶³, presentando actividad antiparasitaria⁶⁴, antibacteriana⁶⁵ y antitumoral⁶⁶.

Una de las más conocidas es la 3-aminopiridina-2-carboxaldehído TSCN, ó Triapina (Figura 1.8), que es un potente inhibidor de la enzima ribonucleótido reductasa⁶⁷ y muy activa *in vitro* en diversos tipos de cáncer⁶⁸. Esta molécula se ha utilizado en diversos tratamientos de quimioterapia, en combinación con cisplatino y carboplatino⁶⁷.

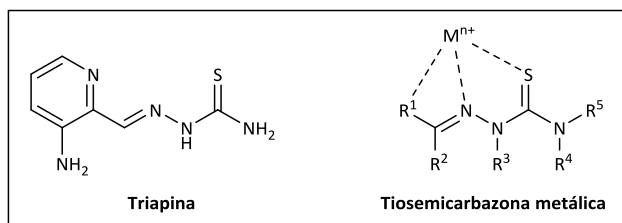


Figura 1.8. Estructura molecular de la Triapina y las potenciales posiciones de coordinación de un metal a una TSCN.

1.3.6 Complejos metálicos con ligandos TSCN

Muchas TSCN aumentan sus propiedades biológicas por a su habilidad para formar quelatos con cationes metálicos específicos⁶⁹. Estos compuestos provienen de la condensación entre una tiosemicarbazida y un aldehído⁷⁰, y presentan al menos dos sitios de unión a los centros metálicos, coordinándose través del N imínico (N dador duro) y el átomo de S (S dador blando). En algunos casos se puede dar coordinación tridentada por incorporación de algún grupo con un átomo dador⁷¹, lo que les hace ligandos muy versátiles (Figura 1.8).

Hay muchos estudios que describen la interacción de tiosemicarbazonas con diferentes iones metálicos, como Pt²⁺, Pd²⁺, Ni²⁺, Fe³⁺, Zn²⁺, etc. Su mecanismo de acción puede suponer la unión de la TSCN libre a un metal del medio biológico o bien el complejo metálico puede ser un agente citotóxico⁷¹. En el caso de las TSCN de Fe, la actividad redox es crucial para su actividad anticancerígena debido al daño oxidativo que genera y a la inhibición de las enzimas ribonucleótido reductasa^{72,73} y topoisomerasa II^{53,74}. En los últimos años se ha incrementado la síntesis de TSCN de Pt²⁺ y Pd²⁺ con alta actividad citotóxica *in vitro*, baja nefrotoxicidad y gran eficacia frente a células tumorales normales y resistentes al cisplatino⁷⁵⁻⁷⁷, lo que les convierte en interesantes candidatos a entrar en terapia antitumoral.

Los trabajos previos de la Prof. Navarro-Ranninger con benzoilbencilidenaminas⁷⁸ demostraron que las especies ciclometaladas presentan gran actividad antitumoral, lo que llevó al grupo de investigación a sintetizar complejos ciclometalados de Pt^{II} y Pd^{II} con tiosemicarbazonas CNS dadoras (Figura 1.9), puesto que las TSCN son ligandos adecuados para la síntesis de complejos ortometalados con estos cationes metálicos⁷⁹. El diseño de complejos ortometalados supuso un aumento de la actividad antiproliferativa de este tipo de complejos con ligandos TSCN.

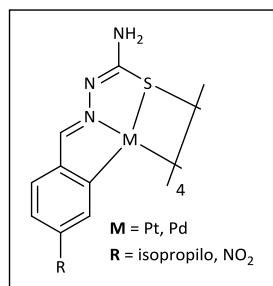


Figura 1.9. Compuestos ciclometalados de Pt y Pd sintetizados por nuestro grupo de investigación⁷⁹.

El análisis de la interacción de estos complejos ciclometalados con modelos de ADN mostró que son capaces de formar cruzamientos interhélice, a diferencia del cisplatino, que forma preferentemente cruzamientos intracatenarios⁷⁹.

1.4 Fotoactivación de complejos metálicos con luz UV

La fotoactivación de fármacos con luz UV es una herramienta utilizada en clínica para el tratamiento de diversos tipos de tumores. La irradiación de fármacos metálicos induce en los mismos un amplio rango de transiciones electrónicas²⁷, produciendo cambios en sus propiedades físicas y químicas, y aumentando su capacidad antitumoral⁸⁰. El estado excitado (Figura 1.10) que se genera tras la irradiación con luz UV tiene un tiempo de vida muy corto pero, al regresar al estado fundamental, el exceso de energía puede ser disipado en forma de luz o calor, en una modificación química de la estructura ó en la transferencia de dicha energía a otra/s especie/s. Al contrario que sucede con las especies puramente orgánicas, los metales poseen estados excitados que son fácilmente accesibles para la irradiación con luz UV y UV-Visible⁸⁰, lo que les convierte en mejores candidatos para su utilización en fotomedicina.

1.4.1 Transiciones electrónicas en complejos metálicos

Las propiedades de los estados excitados de complejos metálicos han sido ampliamente estudiadas en las últimas décadas, en las que han surgido diversas aplicaciones que explotan las propiedades fotofísicas y fotoquímicas de los mismos^{81,82}. La Figura 1.10 representa un esquema de los procesos físicos y químicos que tienen lugar tras la excitación de un fármaco metálico⁸³.

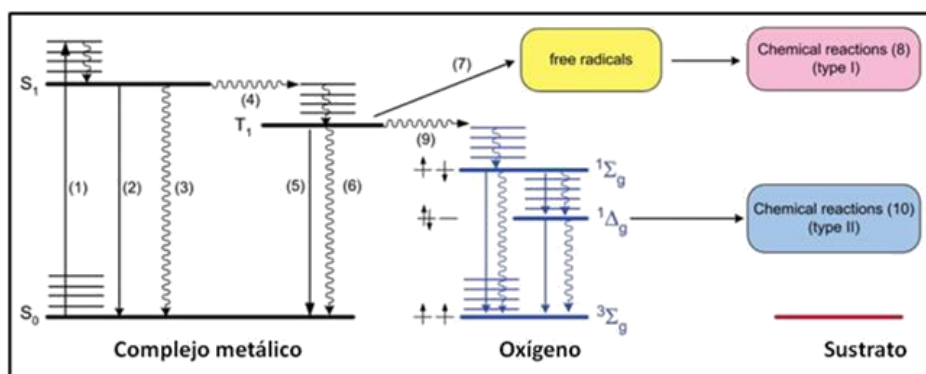


Figura 1.10. Transiciones electrónicas que producen los procesos físicos y químicos envueltos en PDT (7-9), PTT (3, 6) y PD (2, 5).

El fármaco metálico en su estado fundamental, denominado estado singlete (S_0), absorbe luz y alcanza el estado excitado. La absorción de un fotón genera el primer estado excitado singlete (S_1) (1), de un tiempo de vida muy corto. En este instante, el fármaco puede retornar de S_1 a S_0 por dos vías: emisión de la energía absorbida, en un proceso conocido como fluorescencia (2), o bien por conversión interna (3). De otra manera, del estado S_1 la molécula puede pasar al primer estado excitado triplete (T_1) por cruzamiento entre sistemas (4). Desde T_1 también se puede producir el regreso al estado fundamental S_0 por emisión de fosforescencia (5) o por decaimiento no radiativo (6). El estado T_1 tiene un tiempo de vida lo suficientemente largo como para formar parte de reacciones químicas basadas en transferencia de electrones (7), con generación de intermedios radicálicos que participan en reacciones fotodinámicas de tipo I (8). La energía transferida (9) desde el estado T_1 del fármaco a un aceptor cercano, generalmente oxígeno (singlete $1\Delta_g$), muy reactivo, participa en reacciones fotodinámicas de tipo II. Los intermedios radicálicos (principalmente especies de oxígeno reactivas (ROS)) y las especies oxígeno singlete son agentes altamente citotóxicos. En la mayoría de los casos, las reacciones de tipo II son dominantes en una técnica denominada terapia fotodinámica (PDT)^{84,85}. Sin embargo, las de tipo I son más eficientes a baja concentración de oxígeno y altas concentraciones de sustrato⁸⁶.

1.4.2 Reactividad de los estados excitados en complejos metálicos

Las reacciones fotoquímicas que se producen en un complejo metálico (disociación de ligando, procesos redox, etc) pueden ocurrir en cualquiera de las etapas que van desde el estado excitado hasta el estado fundamental (Figura 1.10), dependiendo principalmente de la naturaleza de la especie que ha sufrido la excitación y de la energía aplicada para lograr dicha excitación⁸⁰.

La energía de los estados excitados de los complejos metálicos puede convertirse en los siguientes procesos:

- **Transiciones centradas en el metal (MC):** d-d. Son transiciones que generan absorciones muy débiles, y que involucran generalmente orbitales antienlazantes⁸⁷. Los estados excitados generados conducen frecuentemente a un alargamiento del enlace, favoreciendo la sustitución del ligando.

- **Transiciones de transferencia de carga (CT):** pueden ser del metal al ligando (**MLCT**), del ligando al metal (**LMCT**) ó del disolvente al metal (**TS**). Son transiciones más intensas y pueden llegar a generar procesos redox, lo que suele provocar roturas homolíticas del enlace, reducción del centro metálico y generación de radicales. La irradiación de complejos de Pt en cualquiera de las bandas LMCT ($\lambda_{irr} = 365 \text{ nm}$) o en las transiciones d-d a λ mayores ($\lambda_{irr} = 420, 514 \text{ nm}$) es causante de la fotodisociación de ligandos en estos complejos. Los cálculos DFT y TD-DFT muestran que estas transiciones involucran orbitales σ -antienlazantes, que favorecen la disociación del ligando una vez están ocupados⁸⁰.

- **Transiciones centradas en el ligando (LC) o entre ligandos (IL):** involucran generalmente orbitales pertenecientes al ligando y son típicas de sistemas deslocalizados⁸⁰.

1.4.3 Terapias antitumorales en complejos activados con luz UV

El conocimiento de las propiedades fotoquímicas y fotofísicas, así como de las transiciones electrónicas que se producen en el fármaco metálico, es esencial para determinar su modo de acción. Actualmente se conocen varios tipos de terapias derivadas de la irradiación de fármacos:

1) **Fotodiagnos (PD):** también conocida como **diagnosis fotodinámica (PDD)**, es muy utilizada en la detección de lesiones cancerígenas^{88,89}. En ella, la sustancia fotoactivada emite la energía de excitación en forma de fluorescencia.

2) **Terapia fototérmica (PTT):** conversión de la energía del estado excitado en energía térmica. Debido a la ausencia de un decaimiento radiativo, la energía es disipada en forma de calor, lo que produce la destrucción del tejido tumoral⁹⁰.

3) **Terapia fotodinámica (PDT):** ocurre cuando la especie excitada se encuentra en el primer estado triplete T_1 , que al poseer un tiempo de vida relativamente largo, puede participar en reacciones de tipo I, con generación de intermedios radicálicos altamente reactivos y citotóxicos⁸⁵ (Figura 1.10). Por tanto, la eficacia de un complejo metálico en PDT, depende principalmente de las propiedades fotofísicas del estado T_1 . Este estado debe tener una energía apropiada y un tiempo de vida lo suficientemente largo como para permitir la transferencia de un electrón a una molécula de

oxígeno o a otra especie, que se convertirá en un intermedio radicalico muy reactivo y altamente citotóxico⁸³. Las reacciones que siguen a la formación del oxígeno singlete en sistemas biológicos generan daño en el ADN, destrucción de proteínas y lisis celular, destruyendo el tumor⁸⁵.

4) **Terapia fotoquímica (PT)**: se produce por reacción directa entre el metal y un agente biológico, por ejemplo, entre Pt y DNA ó proteínas. Estos complejos metálicos, por acción de la luz UV ó visible, son capaces de unirse al ADN más rápidamente, ya que se favorecen las fotoreacciones de sustitución de ligandos.

Estudios de irradiación con transplatino, cisplatino y complejos similares al cisplatino muestran que es capaz de inducir la sustitución de los ligandos cloruro por moléculas del disolvente (H_2O , DMSO)⁹¹, como se muestra en la Figura 1.11:

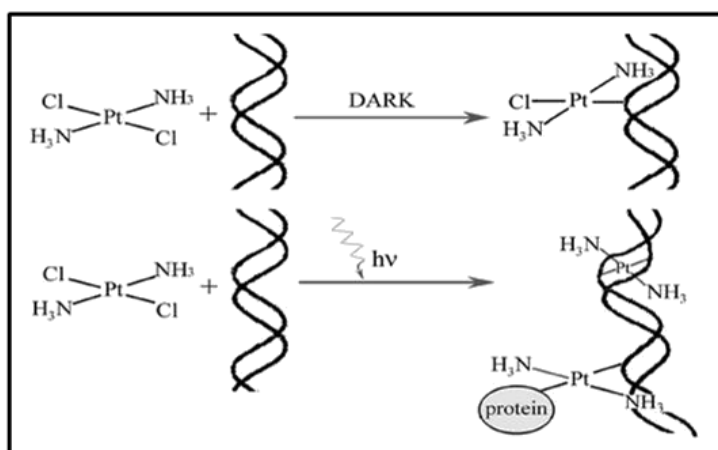


Figura 1.11. Reactividad del transplatino frente al ADN en ausencia y presencia de radiación⁹¹.

La luz UVA genera la pérdida del segundo ligando cloruro en el transplatino, aumentando su capacidad citotóxica y de unión al ADN. Esta pérdida del segundo ligando cloruro también es capaz de generar en el transplatino un aumento de reactividad frente a proteínas⁹².

1.4.4 Características de complejos metálicos fotoactivables

Fenómenos como la solubilidad en disolución acuosa, estabilidad en el medio biológico e internalización celular, son muy importantes en el desarrollo de metalofármacos⁸⁷. Los aspectos más importantes que deben tenerse en cuenta cuando se desarrollan fármacos antitumorales fotoactivables son los siguientes:

- El fármaco debe presentar diferencias notables en su actividad citotóxica en presencia y ausencia de radiación, con el fin de limitar los efectos secundarios, que también pueden reducir su eficacia⁸⁰.

- La λ de activación de activación ideal debería encontrarse dentro de un rango terapéutico de 620-850 nm, ya que este rango de λ presenta el máximo poder de penetración en el tejido de mamíferos⁸³.
- La dependencia de oxígeno, ya que los tumores presentan variaciones en los niveles de oxigenación⁹³. Bajos niveles pueden reducir la eficacia del fármaco, por ejemplo fármacos de PDT, y para otros complejos fotoactivos, su acción se ve aumentada en presencia ó ausencia de oxígeno. La terapia fotoquímica no precisa de oxígeno, por lo que en tumores donde no hay dependencia de oxigenación, es más efectiva.

1.5 Bibliografía

- (1) Sadler, P. J. In *Advances in Inorganic Chemistry*; Sykes, A. G., Ed.; Academic Press: 1991; Vol. Volume 36, p 1.
- (2) Orvig, C.; Abrams, M. J. *Chem. Rev.*, **1999**, *99*, 2201.
- (3) Frezza, M.; Hindo, S.; Chen, D.; Davenport, A.; Schmitt, S.; Tomco, D.; Dou, Q. P. *Curr. Pharm. Des.*, **2010**, *16*, 1813.
- (4) Rosenberg, B.; Van Camp, L.; Krigas, T. *Nature*, **1965**, *205*, 698.
- (5) Medici, S.; Peana, M.; Nurchi, V. M.; Lachowicz, J. I.; Crisponi, G.; Zoroddu, M. A. *Coord. Chem. Rev.*, **2015**, *284*, 329.
- (6) DeVita, V. T., Jr.; Chu, E. *Cancer Res.*, **2008**, *68*, 8643.
- (7) Hambley, T. W.; Hait, W. N. *Cancer Res.*, **2009**, *69*, 1259.
- (8) Neidle, S.; Thurston, D. E. *Nat. Rev. Cancer*, **2005**, *5*, 285.
- (9) Alderden, R. A.; Hall, M. D.; Hambley, T. W. *J. Chem. Educ.*, **2006**, *83*, 728.
- (10) Peyrone, M. *Ann*, **1845**, *51*, 15.
- (11) Kelland, L. *Nat. Rev. Cancer.*, **2007**, *7*, 573.
- (12) Wilson, J. J.; Lippard, S. J. *Chem. Rev.*, **2014**, *114*, 4470.
- (13) Dhara, S. C. *Indian J. Chem.*, **1970**, *8*, 193.
- (14) Wilson, J. J.; Lippard, S. J. *Chem. Rev.*, **2014**, *114*, 4470.
- (15) Jamieson, E. R.; Lippard, S. J. *Chem. Rev.*, **1999**, *99*, 2467.
- (16) Ivanov, A. I.; Christodoulou, J.; Parkinson, J. A.; Barnham, K. J.; Tucker, A.; Woodrow, J.; Sadler, P. J. *J. Biol. Chem.*, **1998**, *273*, 14721.
- (17) DeConti, R. C.; Toftness, B. R.; Lange, R. C.; Creasey, W. A. *Cancer Res.*, **1973**, *33*, 1310.
- (18) Barnham, K. J.; Djuran, M. I.; Murdoch, P. d. S.; Ranford, J. D.; Sadler, P. J. *Inorg. Chem.*, **1996**, *35*, 1065.
- (19) Andrews, P. A.; Wung, W. E.; Howell, S. B. *Anal. Biochem.*, **1984**, *143*, 46.
- (20) Dolman, R. C.; Deacon, G. B.; Hambley, T. W. *J. Inorg. Biochem.*, **2002**, *88*, 260.
- (21) Ishida, S.; Lee, J.; Thiele, D. J.; Herskowitz, I. *Proc. Natl. Acad. Sci*, **2002**, *99*, 14298.
- (22) Katano, K.; Kondo, A.; Safaei, R.; Holzer, A.; Samimi, G.; Mishima, M.; Kuo, Y. M.; Rochdi, M.; Howell, S. B. *Cancer Res.*, **2002**, *62*, 6559.
- (23) Wang, D.; Lippard, S. J. *Nature reviews. Drug discovery* **2005**, *4*, 307.
- (24) Siddik, Z. H. *Oncogene*, **2003**, *22*, 7265.
- (25) Chaney, S. G.; Campbell, S. L.; Temple, B.; Bassett, E.; Wu, Y.; Faldu, M. *J. Inorg. Biochem.*, **2004**, *98*, 1551.
- (26) Eastman, A. *Cancer Cells*, **1990**, *2*, 275.
- (27) Quiroga, A. G. *J. Inorg. Biochem.*, **2012**, *114*, 106.
- (28) Galluzzi, L.; Senovilla, L.; Vitale, I.; Michels, J.; Martins, I.; Kepp, O.; Castedo, M.; Kroemer, G. *Oncogene*, **2012**, *31*, 1869.
- (29) Shen, D. W.; Pouliot, L. M.; Hall, M. D.; Gottesman, M. M. *Pharmacol. Rev.*, **2012**, *64*, 706.
- (30) Wheate, N. J.; Walker, S.; Craig, G. E.; Oun, R. *Dalton Trans.*, **2010**, *39*, 8113.
- (31) Rixe, O.; Ortuzar, W.; Alvarez, M.; Parker, R.; Reed, E.; Paull, K.; Fojo, T. *Biochem. Pharmacol.*, **1996**, *52*, 1855.
- (32) Tashiro, T.; Kawada, Y.; Sakurai, Y.; Kidani, Y. *Biomed. Pharmacother.*, **1989**, *43*, 251.
- (33) Jung, Y.; Lippard, S. J. *J. Biol. Chem.*, **2003**, *278*, 52084.
- (34) Cleare, M. J.; Hoeschele, J. D. *Bioinorg. Chem.*, **1973**, *2*, 187.
- (35) Natile, G.; Coluccia, M. *Met. Ions Biol. Syst.*, **2004**, *42*, 209.

- (36) Aris, S. M.; Farrell, N. P. *Eur. J. Inorg. Chem.*, **2009**, 2009, 1293.
- (37) Kelland, L. R.; Barnard, F. J.; Evans, I. G.; Murrer, B. A.; Theobald, B. R. C.; Wyer, S. B.; Goddard, P. M.; Jones, M.; Valenti, M. *J. Med. Chem.*, **1995**, 38, 3016.
- (38) Hall, M. D.; Mellor, H. R.; Callaghan, R.; Hambley, T. W. *J. Med. Chem.*, **2007**, 50, 3403.
- (39) Natile, G.; Coluccia, M. *Coord. Chem. Rev.*, **2001**, 216–217, 383.
- (40) Hambley, T. W. *Coord. Chem. Rev.*, **1997**, 166, 181.
- (41) Boudvillain, M.; Dalbiès, R.; Aussourd, C.; Leng, M. *Nucleic Acids Res.*, **1995**, 23, 2381.
- (42) Eastman, A. *Pharmacol. Ther.*, **1987**, 34, 155.
- (43) Mello, J. A.; Lippard, S. J.; Essigmann, J. M. *Biochem. J.*, **1995**, 34, 14783.
- (44) Pil, P. M.; Lippard, S. J. *Science*, **1992**, 256, 234.
- (45) Hernandez Losa, J.; Parada Cobo, C.; Guinea Viniegra, J.; Sanchez-Arevalo Lobo, V. J.; Ramon y Cajal, S.; Sanchez-Prieto, R. *Oncogene*, **2003**, 22, 3998.
- (46) Sanchez-Perez, I.; Martinez-Gomariz, M.; Williams, D.; Keyse, S. M.; Perona, R. *Oncogene*, **2000**, 19, 5142.
- (47) Coluccia, M.; Natile, G. *Anticancer Agents Med. Chem.*, **2007**, 7, 111.
- (48) Bierbach, U.; Qu, Y.; Hambley, T. W.; Peroutka, J.; Nguyen, H. L.; Doedee, M.; Farrell, N. *Inorg. Chem.*, **1999**, 38, 3535.
- (49) Coluccia, M.; Boccarelli, A.; Mariggio, M. A.; Cardellicchio, N.; Caputo, P.; Intini, F. P.; Natile, G. *Chem. Biol. Interact.*, **1995**, 98, 251.
- (50) Montero, E. I.; Diaz, S.; Gonzalez-Vadillo, A. M.; Perez, J. M.; Alonso, C.; Navarro-Ranninger, C. *J. Med. Chem.*, **1999**, 42, 4264.
- (51) Komeda, S.; Casini, A. *Curr. Top. Med. Chem.*, **2012**, 12, 219.
- (52) Musetti, C.; Nazarov, A. A.; Farrell, N. P.; Sissi, C. *ChemMedChem*, **2011**, 6, 1283.
- (53) Wong, E.; Giandomenico, C. M. *Chem. Rev.*, **1999**, 99, 2451.
- (54) Messori, L.; Casini, A.; Gabbiani, C.; Michelucci, E.; Cubo, L.; Ríos-Luci, C.; Padrón, J. M.; Navarro-Ranninger, C.; Quiroga, A. G. *ACS Med. Chem. Lett.*, **2010**, 1, 381.
- (55) Basolo, F.; Gray, H. B.; Pearson, R. G. *J. Am. Chem. Soc.*, **1960**, 82, 4200.
- (56) Messori, L.; Cubo, L.; Gabbiani, C.; Álvarez-Valdés, A.; Michelucci, E.; Pieraccini, G.; Ríos-Luci, C.; León, L. G.; Padrón, J. M.; Navarro-Ranninger, C.; Casini, A.; Quiroga, A. G. *Inorg. Chem.*, **2012**, 51, 1717.
- (57) Messori, L.; Marzo, T.; Gabbiani, C.; Valdes, A. A.; Quiroga, A. G.; Merlino, A. *Inorg. Chem.*, **2013**, 52, 13827.
- (58) Parro, T.; Medrano, M. A.; Cubo, L.; Munoz-Galvan, S.; Carnero, A.; Navarro-Ranninger, C.; Quiroga, A. G. *J. Inorg. Biochem.*, **2013**, 127, 182.
- (59) Johnstone, T. C.; Suntharalingam, K.; Lippard, S. J. *Chem. Rev.*, **2016**, 116, 3436.
- (60) Hall, M. D.; Mellor, H. R.; Callaghan, R.; Hambley, T. W. *J. Med. Chem.*, **2007**, 50, 3403.
- (61) Hall, M. D.; Hambley, T. W. *Coord. Chem. Rev.*, **2002**, 232, 49.
- (62) Rosenberg, B.; Vancamp, L.; Trosko, J. E.; Mansour, V. H. *Nature*, **1969**, 222, 385.
- (63) Duffy, K. J.; Price, A. T.; Delorme, E.; Dillon, S. B.; Duquenne, C.; Erickson-Miller, C.; Giampa, L.; Huang, Y.; Keenan, R. M.; Lamb, P.; Liu, N.; Miller, S. G.; Rosen, J.; Shaw, A. N.; Smith, H.; Wiggall, K. J.; Zhang, L.; Luengo, J. I. *J. Med. Chem.*, **2002**, 45, 3576.
- (64) Du, X.; Guo, C.; Hansell, E.; Doyle, P. S.; Caffrey, C. R.; Holler, T. P.; McKerrow, J. H.; Cohen, F. E. *J. Med. Chem.*, **2002**, 45, 2695.
- (65) Kovala-Demertzi, D.; Demertzis, M. A.; Filiou, E.; Pantazaki, A. A.; Yadav, P. N.; Miller, J. R.; Zheng, Y.; Kyriakidis, D. A. *Biometals*, **2003**, 16, 411.

- (66) Papageorgiou, A.; Iakovidou, Z.; Mourelatos, D.; Mioglou, E.; Boutis, L.; Kotsis, A.; Kovala-Demertzi, D.; Domopoulou, A.; West, D. X.; Dermetzis, M. A. *AntiCancer Res.*, **1997**, *17*, 247.
- (67) Ratner, E. S.; Zhu, Y.-L.; Penketh, P. G.; Berenblum, J.; Whicker, M. E.; Huang, P. H.; Lee, Y.; Ishiguro, K.; Zhu, R.; Sartorelli, A. C.; Lin, Z. P. *Br. J. Cancer*, **2016**, *114*, 777.
- (68) Alvero, A. B.; Chen, W.; Sartorelli, A. C.; Schwartz, P.; Rutherford, T.; Mor, G. J. *Soc. Gynecol. Investig.*, **2006**, *13*, 145.
- (69) Farrell, N. *Coord. Chem. Rev.*, **2002**, *232*, 1.
- (70) Sharma, R. K.; Singh, R. V.; Tandon, J. P. *J. Inorg. Nuc. Chem.*, **1980**, *42*, 463.
- (71) Quiroga, A. G.; Navarro Ranninger, C. *Coord. Chem. Rev.*, **2004**, *248*, 119.
- (72) Kalinowski, D. S.; Quach, P.; Richardson, D. R. *Future Med. Chem.*, **2009**, *1*, 1143.
- (73) Miller, M. C., 3rd; Stineman, C. N.; Vance, J. R.; West, D. X.; Hall, I. H. *AntiCancer Res.*, **1998**, *18*, 4131.
- (74) Huang, H.; Chen, Q.; Ku, X.; Meng, L.; Lin, L.; Wang, X.; Zhu, C.; Wang, Y.; Chen, Z.; Li, M.; Jiang, H.; Chen, K.; Ding, J.; Liu, H. *J. Med. Chem.*, **2010**, *53*, 3048.
- (75) Ibrahim, A. A.; Khaledi, H.; Hassandarvish, P.; Mohd Ali, H.; Karimian, H. *Dalton Trans.*, **2014**, *43*, 3850.
- (76) Matesanz, A. I.; Hernandez, C.; Rodriguez, A.; Souza, P. *Dalton Trans.*, **2011**, *40*, 5738.
- (77) Matesanz, A. I.; Perles, J.; Souza, P. *Dalton Trans.*, **2012**, *41*, 12538.
- (78) Garcia-Ruano, J. L.; Lopez-Solera, I.; Masaguer, J. R.; Navarro-Ranninger, C.; Rodriguez, J. H.; Martinez-Carrera, S. *Organometallics*, **1992**, *11*, 3013.
- (79) Quiroga, A. G.; Perez, J. M.; Lopez-Solera, I.; Masaguer, J. R.; Luque, A.; Roman, P.; Edwards, A.; Alonso, C.; Navarro-Ranninger, C. *J. Med. Chem.*, **1998**, *41*, 1399.
- (80) Farrer, N. J.; Salassa, L.; Sadler, P. J. *Dalton Trans.*, **2009**, 10690.
- (81) Meyer, T. J. *Acc. Chem. Res.*, **1989**, *22*, 163.
- (82) Buda, M.; Kalyuzhny, G.; Bard, A. J. *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, *124*, 6090.
- (83) Szacilowski, K.; Macyk, W.; Drzewiecka-Matuszek, A.; Brindell, M.; Stochel, G. *Chem. Rev.*, **2005**, *105*, 2647.
- (84) Oleinick, N. L.; Morris, R. L.; Belichenko, I. *Photochem. Photobiol. Sci.*, **2002**, *1*, 1.
- (85) Henderson, B. W.; Dougherty, T. J. *Photochem. Photobiol.*, **1992**, *55*, 145.
- (86) Sobolev, A. S.; Jans, D. A.; Rosenkranz, A. A. *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, **2000**, *73*, 51.
- (87) Salassa, L.; Garino, C.; Salassa, G.; Gobetto, R.; Nervi, C. *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, *130*, 9590.
- (88) Banerjee, A.; George, J. *Curr. Opin. Pulm. Med.*, **2000**, *6*, 378.
- (89) Pogue, B. W.; Hasan, T. *Opt. Photonics News*, **2003**, *14*, 36.
- (90) Jori, G.; Spikes, J. D. *J. Photochem. Photobiol.*, **1990**, *6*, 93.
- (91) Fry, H. C.; Deal, C.; Barr, E.; Cummings, S. D. *J. Photochem. Photobiol.*, **2002**, *150*, 37.
- (92) Heringova, P.; Woods, J.; Mackay, F. S.; Kasparkova, J.; Sadler, P. J.; Brabec, V. *J. Med. Chem.*, **2006**, *49*, 7792.
- (93) Hambley, T. W. *Aust. J. Chem.*, **2008**, *61*, 647.

Capítulo 2. Complejos de Pt^{II} con ligandos yoduro

En este capítulo se describe la interacción y mecanismo de acción de cinco complejos de fórmula general $[\text{PtI}_2(\text{amina})(\text{amina}')]]$ e isomería *cis* y *trans* frente a modelos de ADN en ausencia y presencia de luz UV. Además, se ha evaluado la actividad citotóxica de estos complejos en dos líneas celulares tumorales en ausencia y presencia de radiación. También, se han realizado una serie de cálculos teóricos con el objetivo de obtener una mayor información sobre el comportamiento fotoquímico y el impacto que la radiación genera en la reactividad de los complejos.

2.1 Introducción

El cisplatino ha sido y es uno de los fármacos más utilizados en clínica para el tratamiento de diversos tipos de cáncer, en especial el de ovario y testículo¹. Sin embargo, este fármaco presenta una serie de efectos secundarios, por lo que siempre ha existido un gran interés por desarrollar nuevos complejos metálicos que minimicen dichos efectos.

Como ya se introdujo en el primer capítulo, los complejos análogos al cisplatino con ligandos yoduro no fueron muy estudiados con fines farmacológicos, debido a que el complejo *cis*- $[\text{PtI}_2(\text{NH}_3)_2]$ no presentaba actividad antitumoral en modelos animales². Esta inactividad se atribuyó a la gran estabilidad y baja reactividad del enlace Pt-I comparada con la de enlace Pt-Cl en disolución acuosa³. Más tarde, aparecieron estudios de complejos de Pt^{II} y Pt^{IV} con ligandos yoduro y propiedades antitumorales, mostrando una reactividad inesperada e interesante frente a diversos tipos de biomoléculas, como proteínas séricas⁴.

2.1.1 Complejos *cis* de Pt^{II} con ligandos yoduro con las aminas alifáticas iguales

Ya hemos mencionado (sección 1.3.3, capítulo 1) que nuestro grupo de investigación fue el primero en estudiar las propiedades de los complejos con fórmula *cis*- $[\text{PtI}_2(\text{amina})_2]$, y comenzó con la especie *cis*- $[\text{PtI}_2(\text{ipa})_2]$ (ipa = isopropilamina), estudiando su reactividad frente a diversas biomoléculas *in vitro* y evaluando su capacidad antiproliferativa⁵. Los resultados fueron muy satisfactorios, ya que su actividad citotóxica fue superior a la del cisplatino en todas las líneas celulares testadas, como se puede observar en la Tabla 2. 1:

Tabla 2. 1. Actividad antiproliferativa (IC₅₀ μM) del complejo *cis*-[PtI₂(ipa)₂] en comparación con cisplatino en diversas líneas celulares tumorales.

Línea celular	<i>cis</i> -[PtI ₂ (ipa) ₂]	cisplatino
A2780	0.26	1.9
HBL-100	1.1	1.9
HeLa	1.9	2.0
SW1573	1.4	3.4
T-47D	2.6	15
WiDR	2.3	26

Además, se estudió su reactividad frente al ADN de plásmido pBR322, mostrando interacción a una concentración muy superior a la del cisplatino. Si bien ambos complejos interaccionan de la misma manera, los complejos de Pt-I lo hacen más despacio, por lo que el ADN pudiera no ser su principal diana farmacológica. Así, se exploró la reactividad del complejo con otros modelos biológicos, como son la proteína globular citocromo C (cyt C) y el aminoácido N-acetilmetionina (N-AcMet), usando la técnica ESI-MS (espectrometría de masas con ionización por electrospray) y RMN. Los resultados de interacción con ambos modelos indicaron la formación de aductos en los que se perdían uno o los dos ligandos amina del complejo, que no suelen ser los ligandos salientes, y se mantenían los ligandos yoduro.

2.1.2 Complejos *cis* y *trans* de Pt^{II}-I con la mismas aminas alifáticas

Se estudió posteriormente la serie completa de complejos *cis* y *trans* con las mismas aminas alifáticas en su estructura: ipa, dma y ma (Figura 2.1), para encontrar qué complejos de dicha serie mostraban un patrón de reactividad similar⁶.

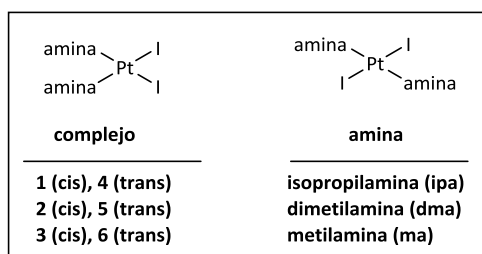


Figura 2.1. Complejos *cis* 1-3 y *trans* 4-6 con ligandos yoduro y aminas alifáticas.

La capacidad antiproliferativa de todos los complejos en diferentes líneas celulares⁶ mostró que los más activos eran los complejos *trans* 4 y 5, por encima de sus análogos *cis* y del propio

cisplatino. La reactividad de estos complejos frente a diversos tipos de biomoléculas mostró que la interacción frente a N-acetilcisteína (N-AcCys), N-acetilmetionina y cyt C como modelos de proteínas, y frente a 9-etilguanina (9-EtG) como modelo de ADN (Figura 2.2) era diferente para los complejos *cis* que para los *trans*.

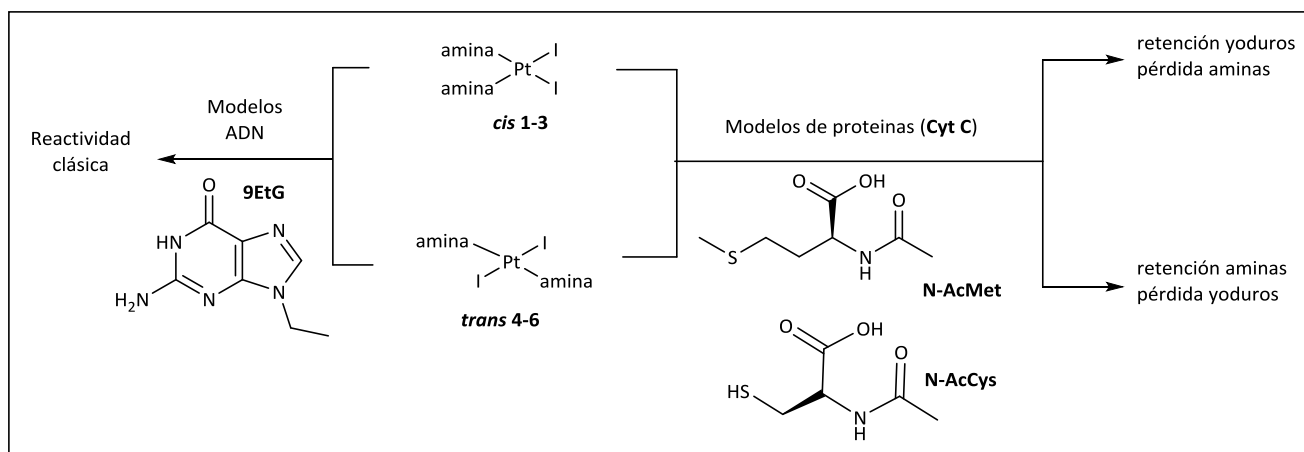


Figura 2.2. Interacción de los complejos *cis* 1-3 y *trans* 4-6 frente a modelos de ADN y proteínas.

Los tres complejos *cis* perdían los ligandos amina, mientras que los isómeros *trans* 4-6 los mantenían en su estructura, perdiendo uno o los dos ligandos yoduro. Por otra parte, todos los complejos frente a modelos de ADN presentaron una reactividad clásica, similar a la del cisplatino.

Más tarde, y como ya se comentó en el capítulo 1, nuestro grupo de investigación demostró mediante una estructura de rayos X, que el complejo *cis*-[PtI₂(NH₃)₂] reaccionaba con lisozima de huevo de gallina⁷, generando un aducto en el que el Pt se coordina al N_ε del imidazol de la His 15 (Histidina 15), con pérdida de un ligando NH₃, y reteniendo los dos ligandos yoduro enlazados al Pt (Figura 2.3).

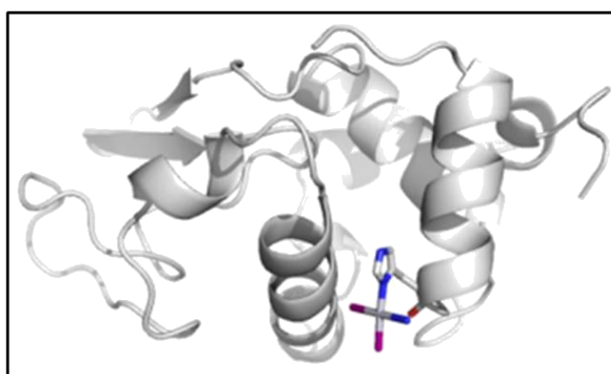


Figura 2.3. Estructura del aducto formado entre el complejo *cis*-[PtI₂(NH₃)₂] y la lisozima de huevo de gallina⁷.

2.1.3 Complejos *trans* de Pt^{II}-I con aminas alifáticas diferentes

La utilización de diferentes ligandos en *trans* a las aminas alifáticas ha resultado siempre de gran éxito; de hecho, se han logrado complejos activos con ligandos fosfina⁸, aminas planares⁹ y con ligandos transportadores de tipo esteroide¹⁰. Así, nuestro grupo de investigación sintetizó tres nuevos complejos *trans* de Pt^{II}-I con diferentes aminas alifáticas en su estructura (Figura 2.4).

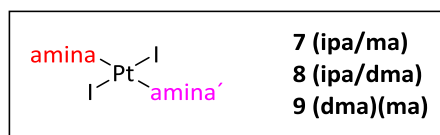


Figura 2.4. Complejos de fórmula *trans*-[PtI₂(amina)(amina´)].

La actividad antiproliferativa de los tres complejos con aminas diferentes resultó ser, en general, menor que la del cisplatino¹¹. El complejo 8 fue una excepción y en la línea celular NCI-H460 de cáncer de pulmón mostró una actividad superior a la del cisplatino, aunque siempre en el mismo rango de concentración.

Se ha sugerido que complejos de Pt con isomería *trans* forman aductos con el ADN que podrían conducir a una activación de la proteína supresora de tumores p53^{12,13}. Esta proteína es uno de los componentes de mayor relevancia relacionados con el crecimiento de células tumorales y juega un papel fundamental en numerosos procesos celulares. p53 se activa en respuesta a daños producidos en el ADN¹⁴, y se cree que la sensibilidad al cisplatino está relacionada con su expresión¹⁵. Células tumorales deficientes en p53 muestran una mayor resistencia al cisplatino que las líneas que expresan normalmente esta proteína¹⁶. Un buen modelo para este estudio es el de las dos líneas celulares isogénicas de carcinoma de colon humano, HCT116 (+/+), que presenta niveles normales de p53, y HCT116 (-/-), que es deficiente en dicha proteína.

Tabla 2.2. Actividad citotóxica (IC₅₀ μM) de los complejos asimétricos *trans* 7-9 en comparación con cisplatino en las líneas celulares tumorales isogénicas HCT116 (+/+) y HCT116 (-/-).

Línea celular	7	8	9	cisplatino
HCT116 (+/+)	42.9	78	41.5	12.0
HCT116 (-/-)	45.4	8.7	80.9	50.2

Los tres complejos resultaron ser menos activos que el cisplatino en la línea HCT116 (+/+) (Tabla 2.2). Sin embargo, en la línea HCT116 (-/-), deficiente en p53, el complejo 8 era más activo

que el cisplatino, lo que indicaba que este complejo era más eficaz en líneas celulares que no expresen esta proteína¹¹.

La reactividad de los tres complejos frente a dos modelos de ADN como 9-EtG y 5'-guanosina monofosfato (5'-GMP) (Figura 2.5) se estudió por ¹H-RMN.

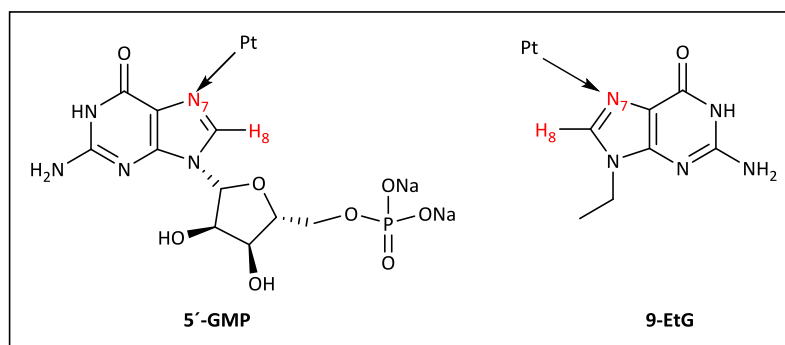


Figura 2.5. Coordinación del Pt al N₇ de la 5'-GMP y 9-EtG¹¹.

El complejo 7 formaba mono y bisaductos, con pérdida de ligandos yoduro, mientras que 8 y 9 generaban una mayor especiación. Las tres especies mostraron una reactividad similar a la del cisplatino en su interacción con el plásmido pBR322, aunque a una concentración mayor.

La interacción de los complejos 7-9 en presencia de N-AcMet y N-AcCys mostró un patrón similar a la de los complejos *trans* simétricos, aunque el complejo 8 no reaccionó con ninguna de las dos moléculas; el complejo 7 formó monoadductos únicamente con N-AcCys, y el complejo 9 presentó monoadductos con ambas¹¹. Esta diferencia en la reactividad pone de manifiesto la necesidad de estudiar esta interacción con mayor detalle.

2.1.4 Fotoactivación de complejos metálicos con luz UV

Como ya se comentó en la introducción, la fotoactivación de complejos metálicos con luz UV es una herramienta utilizada en clínica para el tratamiento de diversos tipos de tumores. Nuestro grupo de investigación decidió demostrar que el efecto de la luz UVA (365 nm) aumentaba la reactividad del complejo *trans*-[PtCl₂(ipa)(ma)] frente a biomoléculas y su capacidad anticancerígena^{17,18} (Figura 2.6). Mientras que la especie *trans*-[PtCl₂(ipa)(ma)] permanecía inalterada en oscuridad, tras ser irradiada generaba las especies mono y bisaquó, con pérdida de los ligandos cloruro coordinados al Pt. La reactividad del complejo frente a modelos de ADN con luz UVA, como son AMP, GMP y CMP, mostró una clara especificidad frente a la 5'-GMP (Figura 2.6), con formación preferente de la especie bisaducto [Pt(GMP)₂(ipa)(ma)]²⁺, que no fue observada con

AMP ni CMP. Esto demostró que la irradiación a 365 nm, favorece la formación de bisaductos con derivados de guanina, que es el sitio preferente de unión al ADN de los fármacos de Pt.

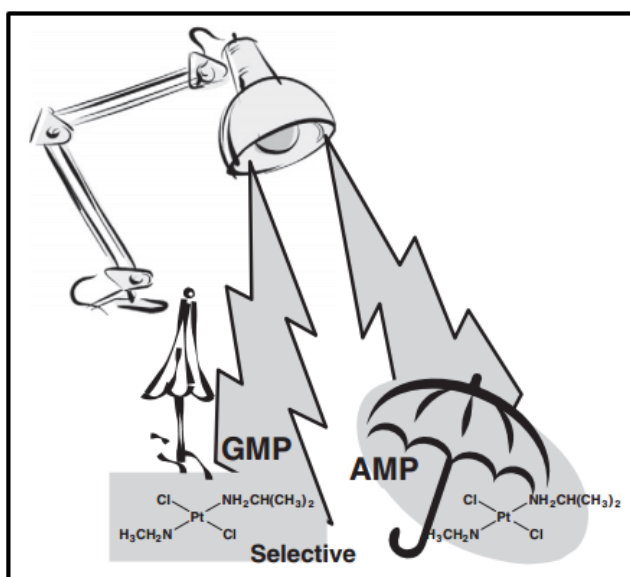


Figura 2.6. La irradiación promueve la especificidad del complejo *trans*-[PtCl₂(ipa)(ma)] por la 5'-GMP.

2.2 Resultados

2.2.1 Objetivos

Tras los resultados obtenidos previamente por nuestro grupo de investigación con complejos *cis* y *trans* de Pt^{II}-I con aminas alifáticas, nos propusimos el estudio en profundidad de la reactividad de los complejos *trans* frente al modelos de ADN, en ausencia y presencia de radiación, utilizando el complejo *cis*-[Pt₂(ipa)₂] para realizar un estudio comparativo. En este capítulo nos proponemos estudiar el tipo de unión de estos complejos al ADN, la cuantificación de los aductos formados y la determinación del grado de desenrollamiento que ejercen en el ADN, en ausencia de radiación. Una vez determinados estos parámetros, se analizaron sus cinéticas de unión al ADN y reactividad con modelos más sencillos, como 5'-GMP, en presencia de radiación. También se realizaron los estudios de citotoxicidad en presencia de luz y, finalmente, una serie de cálculos teóricos justifican el comportamiento fotoquímico de estos complejos frente a modelos de ADN.

2.2.2 Síntesis

La síntesis de los complejos se muestra en la Figura 2.7 y se realizó siguiendo el procedimiento descrito en la sección experimental⁶. Inicialmente se sintetizó el complejo *cis*, que por reacción con la amina correspondiente dio lugar al derivado *trans*. Esta reacción se llevó a cabo

en agua y en un sólo paso, sin necesidad de aislar la tetraamina ($[\text{Pt}(\text{amina})_4]^{2+}$). Los complejos deseados se obtuvieron por evaporación muy lenta a alta temperatura en presencia de un exceso de KI y se caracterizaron por las técnicas usuales.

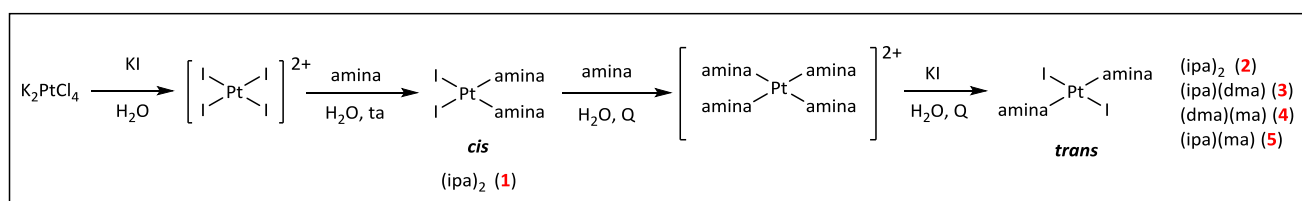


Figura 2.7. Síntesis de complejos *cis* y *trans*- $[\text{PtI}_2(\text{amina})_2]$ y complejos 1-5 usados en este trabajo.

2.2.3 Estudios de unión Pt-ADN en oscuridad para conocer la naturaleza de la interacción

Se procedió al estudio detallado de la naturaleza de la interacción de los complejos 1-5 frente al ADN (plasmídico y CT) en ausencia de radiación, utilizando métodos biofísicos y bioquímicos, además de la técnica de ^1H -RMN.

2.2.3.1 Mapeo transcripcional de los aductos Pt-ADN

La técnica de mapeo transcripcional de los aductos se realizó con el objetivo de identificar los sitios preferentes de unión de los complejos 1-5 en el ADN, utilizando para ello un fragmento de ADN que contiene el promotor de la ARN polimerasa T7. La síntesis de ARN *in vitro* utiliza moldes de ADN y se detiene prematuramente en el sitio exacto de la formación del aducto con el Pt, o bien en las proximidades del mismo. La enzima ARN polimerasa T7 es capaz de reconocer las lesiones generadas por los complejos de Pt, parando la transcripción¹⁹. En la Figura 2.8 se ilustra el proceso de iniciación de la transcripción de una secuencia de ADN que contiene el promotor de la ARN T7 polimerasa en un molde de ADN.

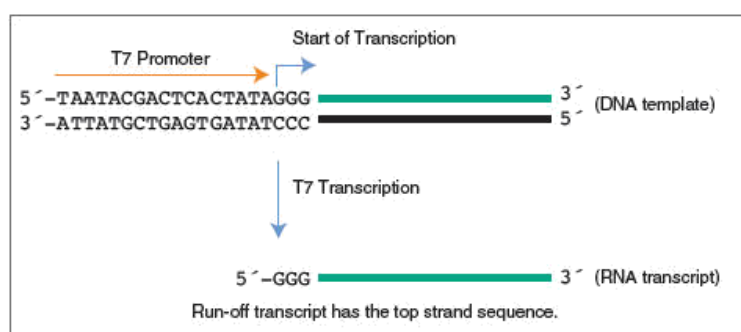


Figura 2.8. Proceso de transcripción de un molde de ADN que contiene la secuencia promotora de la ARN T7 polimerasa.

Cuando la ARN T7 polimerasa reconoce la secuencia promotora en el ADN, se une a ella y comienza el proceso de transcripción, originando el transcrito de ARN. Cuando esta enzima llega a una lesión generada en el ADN por la platinación, la transcripción se detiene prematuramente.

Para la realización de este experimento, se utiliza un fragmento de ADN del plásmido pSP73KB tras ser linearizado por las endonucleasas NdeI/HpaI, el cual es incubado con los complejos de Pt 1-5, cisplatino y transplatino a un valor de $r_b = 0.015$ (r_b se define como el número de moléculas del complejo metálico por nucleótido). La Figura 2.9A muestra la síntesis de ARN en un molde modificado por los complejos de Pt en fragmentos de tamaños definidos. Estos fragmentos indican que la síntesis de ARN en estos moldes ha terminado prematuramente, es decir, debe existir una platinación cercana.

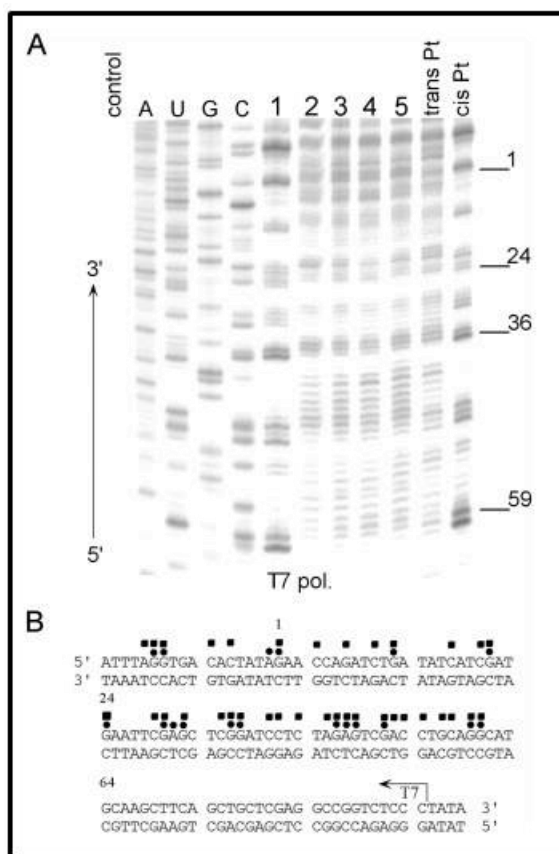


Figura 2.9. A) Síntesis de ARN por la ARN T7 polimerasa en el fragmento NdeI/HpaI del plásmido pSP73KB modificado por cisplatino, transplatino y los complejos 1-5. Autorradiograma al 8% de poliacrilamida/8 M gel de secuencia de urea. Líneas: control, molde no platinado: A, U, C, y G, marcadores de terminación de la cadena de ARN; 1-5, transplatino, cisplatino, molde modificado por los complejos 1, 2, 3, 4, 5, transplatino o cisplatino, respectivamente a un $r_b = 0.015$. B) Secuencia del fragmento NdeI/HpaI del plásmido pSP73KB. La flecha indica el comienzo de la síntesis de la ARN T7 polimerasa. Los números corresponden al número de cada nucleótido en la secuencia del plásmido pSP73KB. Círculos y cuadrados indican las señales de stop generadas en la síntesis de ARN para cisplatino y transplatino, respectivamente.

El análisis de estas secuencias mostró que las bandas mayores, resultantes de la parada en la síntesis de ARN por los aductos de los complejos *trans* **2-5**, son similares a las generadas por el transplatino. Por otra parte, las bandas producidas por el complejos *cis* **1** son similares a las del cisplatino. Esta técnica de mapeo transcripcional revela que los complejos **1-5** dan lugar a aductos con el ADN de tipo bidentado y que los sitios preferentes de unión de estos complejos en el ADN son los residuos de guanina (Figura 2.9B).

Sin embargo, con esta información no podemos conocer si estas lesiones bifuncionales son intra ó intercatenarias. Para conocer la naturaleza de dichas lesiones se realizó la medición de la temperatura de melting.

2.2.3.2 Temperatura de fusión del ADN con los complejos de Pt^{II}

La temperatura de fusión, t_m (melting temperature del inglés) se define como la temperatura a la cual la doble hélice del ADN se desnaturaliza, disociándose en dos cadenas simples²⁰. La variación en la temperatura de fusión (Δt_m) del ADN en presencia de los complejos metálicos refleja cómo afecta la unión de los mismos a la estabilidad de la doble hélice.

Existen tres factores²¹ que afectan a la estabilidad térmica del ADN modificado por complejos de Pt capaces de inducir entrecruzamientos en el mismo: i) un efecto desestabilizante de las distorsiones conformacionales debido a la formación de entrecruzamientos en el ADN por la coordinación del Pt; ii) efectos estabilizantes de los entrecruzamientos intercatenarios en el ADN que previenen la disociación de las dos cadenas; y iii) la introducción de cargas positivas por el centro metálico, que resulta en una estabilización de la doble hélice por una disminución de la repulsión electrostática de los grupos fosfato cargados negativamente.

Para la realización de este estudio, se incubaron los complejos **1-5** con CT ADN, a valores de r_b de 0.02, 0.05 y 0.1. Los resultados se registraron midiendo la absorbancia a $\lambda = 260$ nm en función de la temperatura, y representando posteriormente Δt_m frente a r_b , como se muestra en la Figura 2.10.

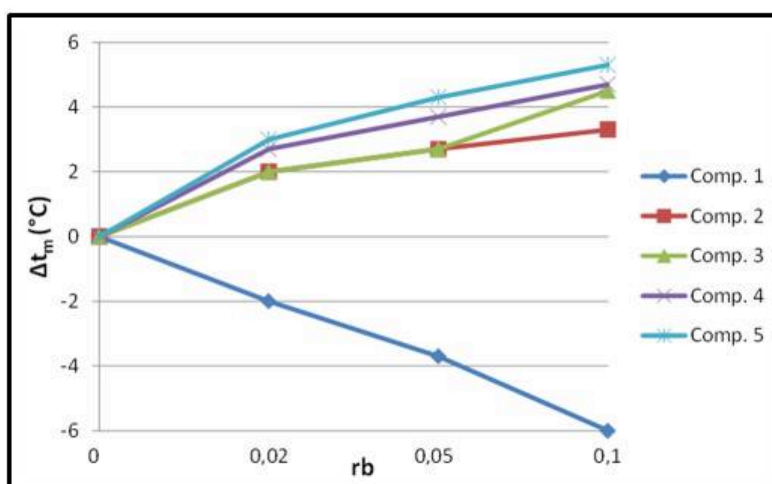


Figura 2.10. Variación de Δt_m del CT DNA modificado por 1, 2, 3, 4 y 5. Δt_m es la diferencia entre los valores de t_m de las muestras platinadas y las muestras no modificadas.

La temperatura de melting del CT ADN modificado por los complejos *trans* 2-5 aumenta al aumentar el nivel de platinación, mientras que para el complejo *cis* 1, t_m disminuye. En la gráfica de la Figura 2.10 puede observarse, que de los cuatro complejos *trans*, es el 5 el que genera una mayor variación de t_m , lo que indica que este complejo produce una mayor estabilización en el ADN. Por su parte, la especie *cis* 1 genera una menor cantidad de lesiones intercatenarias, ya que forma preferencialmente aductos intracatenarios que desestabilizan la hélice.

2.2.3.3 Cuantificación de los aductos intercatenarios (ICLs) con ADN

Los complejos *trans* 2-5 forman preferentemente aductos intercatenarios (ICLs), uniéndose covalentemente a las dos cadenas de ADN, dificultando su separación y bloqueando el metabolismo normal de esta biomolécula. Se ha demostrado que este tipo de lesiones afectan más a la estructura de la doble hélice que los aductos intracatenarios, siendo estos últimos del orden de mil veces menos citotóxicos²².

Debido a su importancia, se procedió a la cuantificación del % de ICLs generados por los complejos en el plásmido pSP73KB (2455 pb), el cual debe ser previamente linearizado por la endonucleasa PvuII. Esta enzima, una vez dentro del plásmido, únicamente genera un corte que permite linearizarlo. Posteriormente, este ADN se incubó con los complejos de Pt 1-5, cisplatino y transplatino a distintos valores de r_b . Los geles obtenidos se muestran en la Figura 2.11.

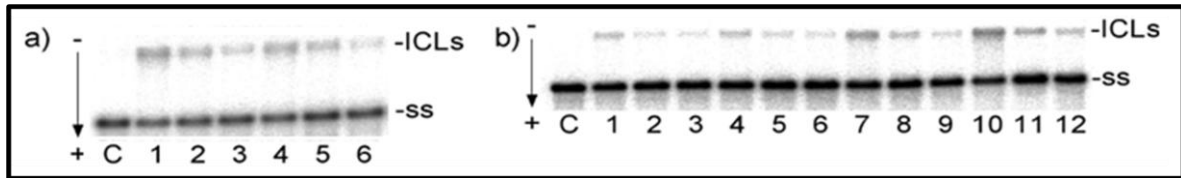


Figura 2. 11. Autorradiograma de un gel de agarosa al 1% en condiciones desnaturalizantes de ADN linearizado por la endonucleasa PvuII del plásmido de ADN pSP73KB con a) cisplatino a un $r_b = 1.1 \times 10^{-3}$, 5.5×10^{-4} , 2.75×10^{-4} en las líneas 1-3, y complejo 1 a un $r_b = 6.6 \times 10^{-4}$, 3.3×10^{-4} , 1.65×10^{-4} en las líneas 4-6, y b) con los complejos: 2 en líneas 1-3 y 3 en líneas 4-6, ambos a un $r_b = 1 \times 10^{-4}$, 5×10^{-5} , 2.5×10^{-5} , respectivamente; 4 en líneas 7-9 a un $r_b = 1.6 \times 10^{-4}$, 8×10^{-5} , 4×10^{-5} ; y 5 en líneas 10-12 a un $r_b = 3.2 \times 10^{-4}$, 1.6×10^{-4} , 8×10^{-5} .

En los gels de electroforesis, las bandas que han corrido más, pertenecen a la cadena simple del plásmido linearizado que no contiene ICLs (Figura 2.11, gels a y b, "ss"). Las bandas que migran más lentamente corresponden a secuencias de ADN con aductos intercatenarios, que tienen una mayor masa molecular (Figura 2.11, gels a y b, "ICLs").

Se calculó la cantidad de ICLs midiendo la radiactividad asociada con las bandas individuales en cada carril, usando la distribución de Poisson²³ en combinación con los valores de r_b y el tamaño del fragmento, como se detalla en la sección experimental. Se obtuvo que el complejo *cis* **1** y el cisplatino tienen una eficiencia de entrecruzamientos muy similar, de 5 y 6% ICL por molécula, respectivamente. Aunque la eficiencia de %ICL de los complejos *trans* **2-5** no pudo ser estimada de una manera precisa, se pudo establecer un rango de 12-25% ICL, que es superior a la generada por el transplatino (11%).

2.2.3.4 Interacción de los complejos de Pt con ADN plasmídico superenrollado

Posteriormente procedimos a cuantificar el grado de desenrollamiento inducido por los complejos en el plásmido pSP73KB. La interacción de complejos metálicos con ADN plasmídico puede determinarse por su capacidad de alterar la movilidad electroforética de las dos conformaciones: la forma circular covalentemente cerrada (CCC) y la forma circular abierta (OC) o relajada. El desenrollamiento generado por el cisplatino en la forma covalentemente cerrada y superenrollada del ADN plasmídico conduce a la forma abierta ó relajada del mismo, llegando a la comigración²⁴. Además, la disminución del grado de migración a través del gel de la forma relajada, hace posible ver y cuantificar el ángulo de desenrollamiento Φ , como se detalla en la sección experimental. Tras realizar la incubación del plásmido con los complejos **1-5**, se obtuvieron los gels de electroforesis que se muestran en la Figura 2.12:

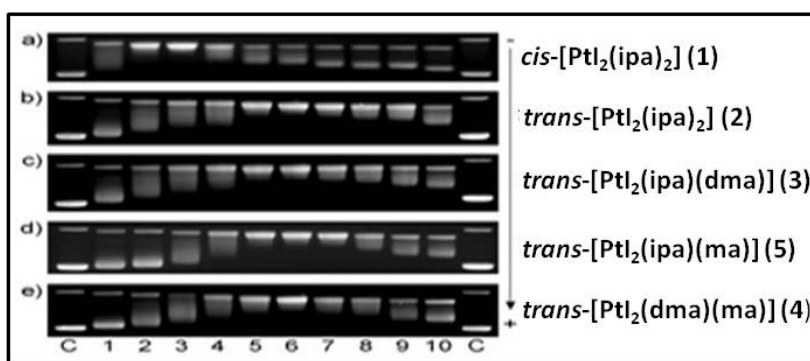


Figura 2.12. Gel de agarosa del plásmido de ADN superenrollado pSP73KB con los complejos. La línea C en todos los paneles corresponde al plásmido no modificado. (a) complejo 1 a un $r_b = 0.034, 0.045, 0.055, 0.066, 0.075, 0.085, 0.095, 0.105, 0.116, 0.125$ en líneas 1-10; (b) 2 y (c) 3 en líneas 1-10, ambos a un $r_b = 0.009, 0.018, 0.022, 0.026, 0.030, 0.034, 0.038, 0.042, 0.052, 0.060$, respectivamente; (d) 5 y (e) 4 en líneas 1-10, ambos a un $r_b = 0.006, 0.013, 0.017, 0.023, 0.028, 0.034, 0.040, 0.045, 0.057, 0.068$, respectivamente.

Analizando los geles a-e, la primera y última serie, marcadas como C, corresponden al ADN plasmídico sin complejos de Pt. Se utiliza como control y sirve para analizar el grado de interacción de cada uno de los complejos con el plásmido a cada r_b . La banda inferior corresponde a la forma covalentemente cerrada y superenrollada del plásmido, mientras que la banda superior corresponde a la forma abierta o relajada.

El grado de desenrollamiento se incrementa al aumentar el nivel de platinación y considerando los datos del cisplatino publicados en la bibliografía²¹, se obtiene un valor de $\Phi = 13^\circ$. Usando esta aproximación, los valores de ϕ calculados para los complejos 1-5 se muestran en la Tabla 2.3:

Tabla 2.3. Valores del ángulo de desenrollamiento Φ generados por los complejos 1-5, cisplatino y transplatino en el plásmido pSP73KB.

Complejo	Ángulo de desenrollamiento (Φ)
cisplatino	13
1	14 ± 3
transplatino	9
2	22 ± 3
3	23 ± 3
4	24 ± 3
5	23 ± 3

El valor del complejo *cis* 1 es muy similar al de los aductos del cisplatino, mientras que los ángulos generados por los complejos *trans* son significativamente mayores que el Φ de 9°

determinado para los aductos del transplatino. También, se aprecia claramente que los complejos **2-5** inducen en el plásmido un grado de desenrollamiento muy similar entre ellos, siendo el complejo **4** el que muestra un valor superior de Φ en una unidad.

2.2.3.5 Cuantificación de aductos monofuncionales de Pt mediante tratamiento con Tiourea

La actividad antineoplásica del cisplatino y complejos bifuncionales de Pt se justifica en base a la formación de diversos tipos de aductos con el ADN. Los complejos de Pt pueden coordinar al ADN formando monoadductos, que posteriormente evolucionan hacia las lesiones bifuncionales²⁵. Para poder cuantificar el número de lesiones monofuncionales generadas por los complejos en el ADN, se utiliza tiourea (TU), que se enlaza a los monoadductos formados con el ADN en posición *trans*, lo que puede provocar reacciones de sustitución en el Pt (Figura 2.13) y posterior eliminación del monoadducto. De esta forma, los aductos monofuncionales son desplazados por la TU, mientras que los bifuncionales no se ven afectados²⁶.

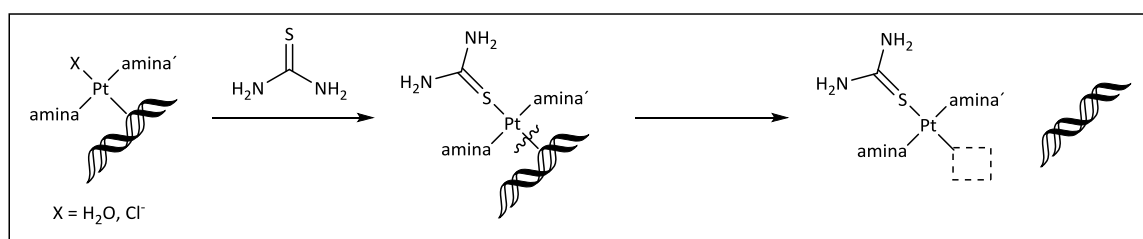


Figura 2.13. Labilización del enlace Pt-N de la nucleobase por coordinación de TU en posición *trans* al Pt.

Así, el tratamiento de los complejos *trans* **2-5** con TU a un $r_b = 0.05$, usando transplatino como control se muestra en la gráfica de la Figura 2.14, y se han representado el % los de lesiones bifuncionales de Pt en el CT ADN frente al tiempo. Mientras que el **transplatino** forma alrededor de un 60% de bisaductos con el ADN tras 24 h de incubación, los complejos *trans* **2-5** generan entre un 80-90%, siendo el complejo **4** el que más lesiones de este tipo produce en el ADN. Estos resultados indican que los complejos *trans* con ligandos yoduro y aminas alifáticas generan lesiones bidentadas más rápidamente y de manera más eficiente que el transplatino.

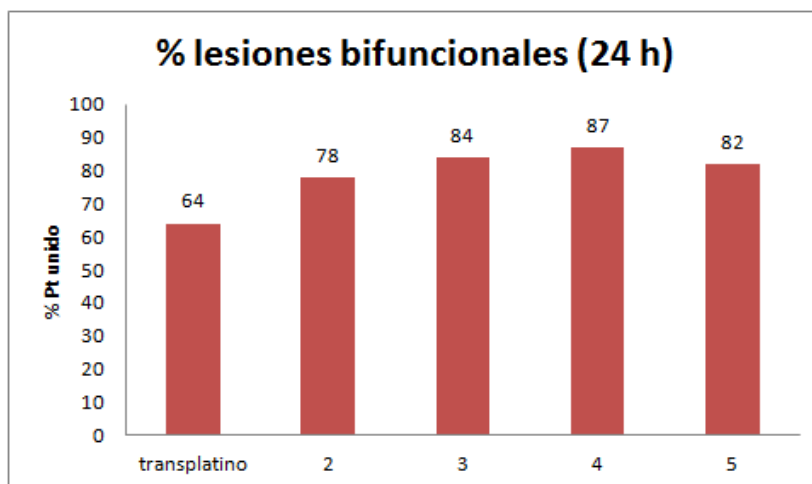


Figura 2.14. % de Pt unido a CT DNA tras adición de TU 0,5 M tras 24 h de incubación a 37 °C en oscuridad.

2.2.4 Estudios de los complejos de Pt en presencia de radiación para conocer la naturaleza de la interacción

Como ya se comentó en la introducción, la terapia fotodinámica (PDT) es una herramienta usada en clínica para aumentar las propiedades antitumorales de fármacos metálicos²⁷. La fotoquímica de los complejos de Pt es de particular interés debido al amplio rango de transiciones electrónicas generadas en los mismos durante la irradiación²⁸. Nos pareció de gran importancia conocer si los complejos de Pt con ligandos yoduro aumentaban su actividad y reactividad bajo irradiación y, para ello, se procedió a evaluar su actividad citotóxica e interacción con ADN (y sus modelos). Estos estudios nos ayudaron a relacionar la actividad de los complejos bajo la acción de la luz UVA. Finalmente, los cálculos teóricos se realizaron para comprender mejor su comportamiento fotoquímico.

2.2.4.1 Determinación de la actividad citotóxica *in vitro* de los complejos en células tumorales.

La actividad citotóxica de los complejos **1**, **2**, **3** y **5** (el complejo **4** no se ensayó al haber mostrado una reactividad similar a la del resto de complejos *trans*) se determinó por el método del cristal violeta, incubando los complejos con las células en ausencia y presencia de radiación. Se seleccionaron dos líneas celulares de tumores sólidos, SISO (adenocarcinoma uterino cervical) y LCLC-103H (adenocarcinoma de células no pequeñas de pulmón). Las células se preincubaron con los complejos de Pt durante 1 h, y se irradiaron después durante 90 min. Este protocolo se determinó gracias a los estudios de reactividad de los complejos (sección 2.2.4.3)

Los complejos se testaron a una concentración de 5 μ M. A esta concentración, el complejo *cis* **1** no mostró cambios en su actividad citotóxica en ninguna de las dos líneas tras irradiación, en

comparación con los controles en oscuridad. Por esta razón, el complejo **1** no volvió a ser evaluado posteriormente. Los complejos *trans* **2**, **3** y **5**, por su parte, presentaron un notable incremento de su actividad cuando el tratamiento se combinaba con la luz UV. En la Figura 2.15 están representadas las curvas dosis-respuesta para el complejo **2**, observándose un aumento significativo de su actividad bajo irradiación.

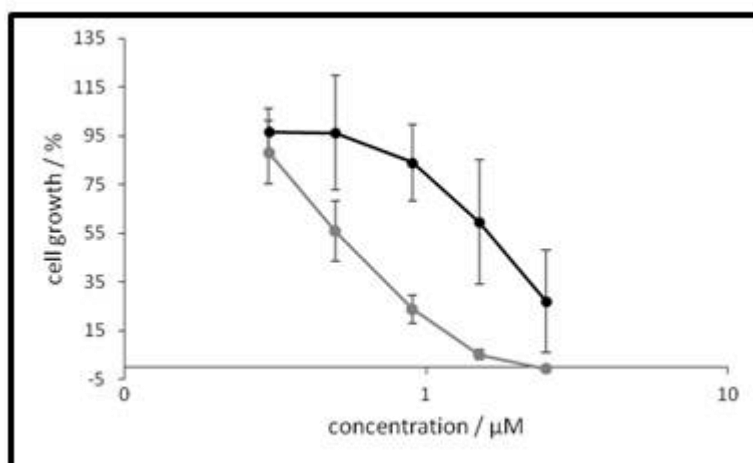


Figura 2.15. Inhibición del crecimiento de las células LCLC-103H tras incubación con el complejo **2** bajo irradiación (curva gris) y en oscuridad (curva negra).

Los valores de actividad citotóxica de los complejos **2**, **3** y **5** en las líneas celulares SISO y LCLC-103H en ausencia y presencia de radiación se muestran en los gráficos de la Figura 2.16. En este experimento se utilizó como referencia el complejo *trans*-[PtCl₂(ipa)(ma)], debido a su alta citotoxicidad y su buena respuesta a la radiación, ya previamente testadas¹⁷.

Los compuestos **2**, **3** y **5** tienen una alta actividad citotóxica en ambas líneas bajo irradiación en comparación con el tratamiento en oscuridad, que también muestra valores muy notables. El complejo **5** es el más citotóxico en la línea SISO, siendo su IC₅₀ (que se define como la dosis de un fármaco necesaria para matar al 50% de las células presentes en un cultivo) 1,84 veces menor que el obtenido en oscuridad, seguido por el complejo **3** (1,80) y finalmente por el complejo **2** (1,63%). Este incremento en la actividad antiproliferativa de los tres complejos es incluso mayor en la línea LCLC-103H, aunque en este caso, el complejo más activo es **3**, seguido por los complejos **2** y **5**, respectivamente. Por tanto, la línea LCLC-103H es más sensible a los complejos seleccionados y, además, los tres son más activos que el complejo usado como control.

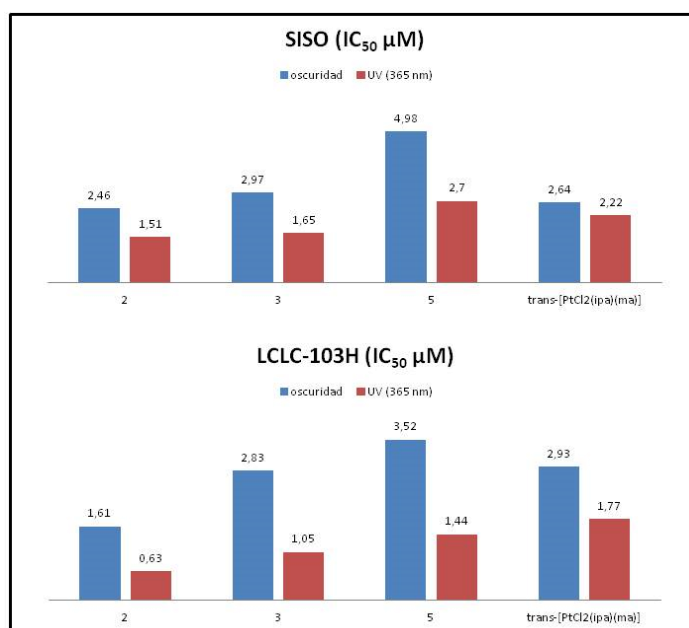


Figura 2.16. Valores de IC₅₀ calculados para los complejos 2, 3 y 5 y el complejo t-[PtCl₂(ipa)(ma)] en las líneas celulares tumorales humanas en ausencia y en presencia de luz UV.

Los valores de la Figura 2.16 confirman que la luz UV aumenta la actividad citotóxica de los complejos *trans* por su activación en el medio celular.

2.2.4.2 Cinéticas de unión al ADN

Con este ensayo se cuantificó la cantidad de Pt unido a CT ADN a distintos tiempos en presencia y ausencia de radiación. Se seleccionaron únicamente los compuestos 2 y 5 (ya que 3 y 4 habían mostrado una reactividad y un patrón de unión al ADN muy similar a 5). Se prepararon dos grupos de muestras de CT ADN para cada complejo a un $r_b = 0.1$ en NaClO₄ (10 mM) a 37 °C. Un grupo se irradió con luz UV ($\lambda_{max} = 365$ nm) durante 4 h inmediatamente después de añadir el compuesto y, posteriormente, se incubó en oscuridad hasta 24 h. En paralelo, el segundo grupo se incubó en oscuridad durante 24 h. Durante este tiempo, se fueron extrayendo alícuotas a 0; 2; 4 y 24 h, midiendo la concentración de Pt unido al ADN por FAAS. Los resultados obtenidos se muestran en la gráfica de la Figura 2.17, en la que se representa el % de Pt unido al ADN en presencia y ausencia de radiación frente al tiempo.

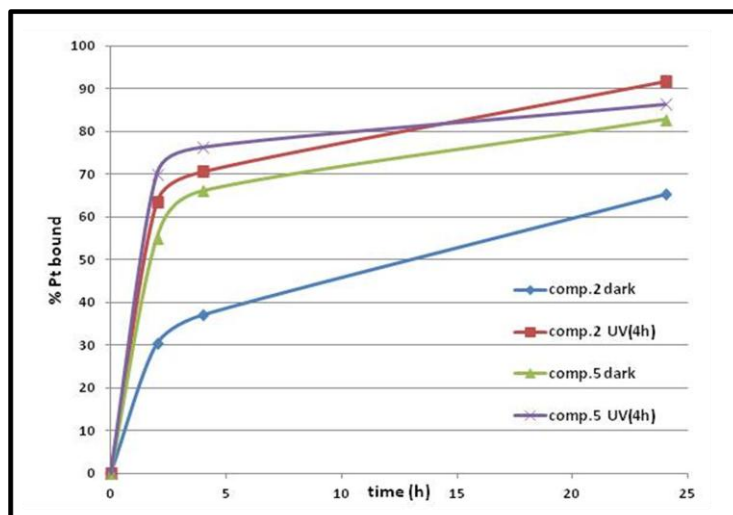


Figura 2.17. Estudio cinético de la reacción de los complejos 2 y 5 con CT ADN irradiados con luz UV durante 4 h, e incubados 24 h en oscuridad.

Como se puede observar, la cantidad de Pt unido a CT ADN de las muestras irradiadas aumenta más rápidamente que las incubadas en oscuridad.

- El complejo **2** presenta un 37% de Pt unido al ADN después de 4 horas en oscuridad, cantidad que aumenta hasta un 65% tras 24 h. Tras ser irradiado 4 h, hay un 70% de Pt unido, y un 86% a las 24 h.
- El complejo **5** muestra un 55% de Pt unido al ADN después de 4 h en oscuridad, y un 83% a las 24 h. Tras ser irradiado durante 4 h, hay un 76% de Pt unido, cantidad que aumenta hasta un 92% hasta las 24 h.

Con estos datos se confirma que la irradiación aumenta la capacidad de unión de estos complejos al ADN, y que el complejo **5** presenta una mayor afinidad de unión que **2**. Cabe destacar que la segunda amina enlazada al Pt en el complejo **5** es metilamina (ma), de menor tamaño que la isopropilamina (ipa). Este hecho seguramente es lo que genera una mayor reactividad en el complejo **5** comparada con el complejo *trans* simétrico **2**, que tiene dos ligandos ipa en su estructura.

2.2.4.3 Reactividad de los complejos 2 y 5 versus 5'-GMP

Con el fin de intentar comprender la reactividad de estos complejos, estudiamos su interacción con **2** y **5** frente a un modelo de ADN más sencillo, como la 5'-GMP, en ausencia y presencia de radiación, por ^1H RMN. Esto permite evaluar la variación en el δ del H_8 de la 5'-GMP, que es el más afectado tras la coordinación del Pt al N_7 de ambos modelos¹¹ (Figura 2.5).

Partíamos ya del conocimiento de la interacción con 9-EtG y 5'-GMP de los complejos *cis* **1** y *trans* **2** y **5**, pero tan sólo se había realizado en oscuridad^{6,11}, por lo que se tuvo que realizar el estudio con luz UVA. Se incubaron los complejos **2** y **5** con 5'-GMP (4:1) a distintos tiempos y con una irradiación de $\lambda = 350$ nm. En la Figura 2.18 se muestran los espectros de ¹H-RMN correspondientes a la monitorización de la reacción del complejo **2** frente a 5-GMP. Tras 1 hora de incubación, en ambos espectros se observa la formación de la especie monoadducto, que en la muestra sin irradiar permanece, apareciendo la especie bisadducto a las 4 horas. En la muestra irradiada, por el contrario, la especie monoadducto desaparece con el tiempo.

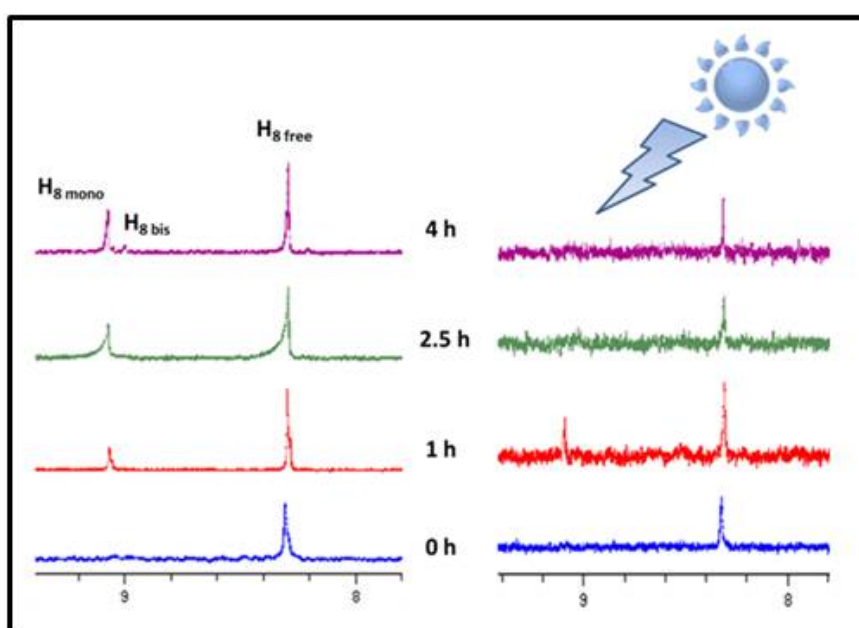


Figura 2.18. Comparación de los espectros de ¹H-RMN en la región del H₈ de la 5'-GMP tras incubación con el complejo **2** en oscuridad (izquierda) y bajo irradiación (derecha).

Al examinar los espectros de la Figura 2.19, que corresponden a la interacción del complejo **5** frente a 5'-GMP, se observan diferencias con respecto al complejo **2** (Figura 2.18). En la muestra sin irradiar, a $t = 0$ h ya hay formación del monoadducto y tan sólo una hora después comienza a aparecer la señal correspondiente a la especie bis, cuya intensidad va aumentando hasta que alcanzar una proporción 1:1 a las 5 horas. Sin embargo, tras irradiar la muestra, a tiempos largos la acción de la luz UV produce que ambas señales desaparezcan del espectro. Con estos resultados, podemos confirmar que la luz UV produce aumenta la reactividad de los complejos **2** y **5** frente a 5'-GMP.

Hay que destacar la formación de una emulsión en todas las muestras con el paso del tiempo, por lo que se procedió a centrifugar cada una de ellas para aislar el sólido, resultando ser únicamente solubles en DMSO. El espectro de ^1H -RMN (DMSO-d_6) del sólido correspondiente al complejo **2** con 5'-GMP se muestra en la Figura 2.20. Aunque la resolución obtenida es baja, se puede observar la presencia de 5'-GMP libre y coordinada y de las aminas enlazadas al centro metálico.

A partir de estos resultados, se confirma que el complejo **5** tiene mayor afinidad por la 5'-GMP que **2**.

2.2.4.4 Cálculos teóricos

Con el fin de obtener una mayor información sobre el comportamiento fotoquímico y la influencia que la radiación genera en la reactividad de los complejos, se realizaron una serie de cálculos DFT y TD-DFT de las transiciones energéticas de los complejos **1**, **2** y **5** y los aductos que forman al reaccionar con 9-EtG. Esta molécula, al ser más sencilla, se empleó en vez de 5'-GMP con el fin de facilitar el trabajo computacional. Tras optimizar la geometría, se evaluaron las transiciones singlete-singlete en los complejos y la fotoquímica de los estados excitados. Las transiciones singlete-singlete calculadas y los espectros de UV-Vis teóricos de los complejos **1**, **2** y **5** concuerdan con los datos experimentales obtenidos. Estos espectros muestran un máximo de absorción comprendido entre 275-300 nm y una cola de absorción en torno a 350 nm para los complejos *trans* **2** y **5**, y a 400 nm para *cis* **1** (Figura 2.21).

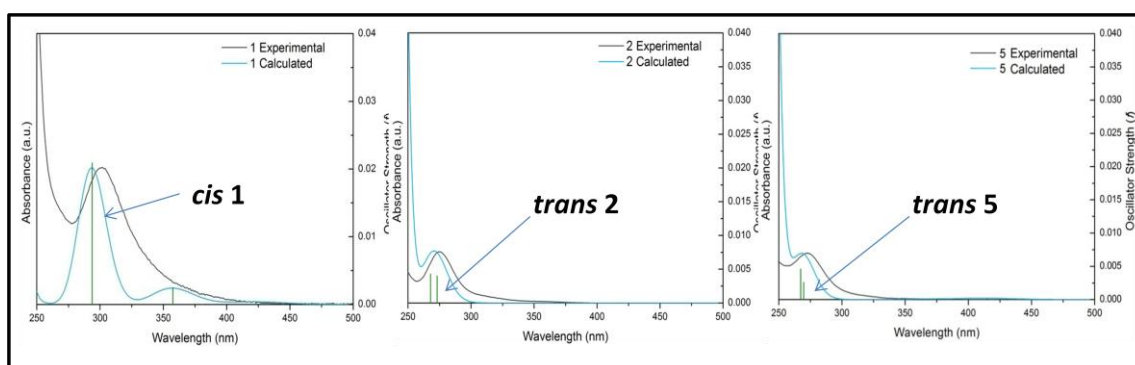


Figura 2.21. Espectros de UV-Vis (250-500 nm) teórico y experimental de los complejos **1**, **2** y **5**.

El análisis de estas transiciones mostró un carácter disociativo "d-d" debido a las contribuciones dominantes del orbital LUMO (orbital molecular no ocupado de más baja energía). Este orbital es σ antienlazante respecto del enlace Pt-amina en el complejo *cis* **1**, y respecto del

enlace Pt-I en los complejos *trans* **2** y **5**. Por tanto, la irradiación a $\lambda = 365$ nm debería promover la escisión de estos ligandos, que en el caso de **2** y **5** se deriva en la pérdida de los dos ligandos yoduro. Este resultado concuerda con el aumento de las propiedades de unión de los complejos bajo irradiación en comparación con el tratamiento en oscuridad.

Además, hay que tener en cuenta la formación de otras posibles especies de Pt de los complejos en disolución cuando estos son irradiados. Por este motivo, también se optimizaron y calcularon los estados singlete excitados para los derivados de **2** y **5** con 9-EtG. Se estudiaron los monoadductos de 9-EtG en posición *trans* a una molécula de agua o un ligando yoduro (2-9EtG, 2-9EtG-OH₂, 5-9EtG y 5-9EtG-OH₂) y los bisadductos 2-9EtG₂ y 5-9EtG₂, obteniendo resultados muy interesantes, ya que todos los monoadductos poseían transiciones disociativas. Esto indica que la irradiación es capaz de promover fotoreacciones sucesivas. Por el contrario, los bisadductos poseen transiciones prohibidas por encima de 300 nm, y sus orbitales LUMO son π - π^* centrados en los dos ligandos 9-EtG.

2.3 Parte experimental

La síntesis y caracterización de los complejos **1-5** se realizó de acuerdo a trabajos anteriores llevados a cabo por el grupo de investigación^{5,11}. Los complejos fueron caracterizados por las técnicas usuales (¹H-RMN, ¹³C-RMN, ¹⁹⁵Pt-RMN y análisis elemental).

2.3.1 Materiales y reactivos

Las disoluciones stock de los complejos **1-5** se prepararon en N,N-dimetilformamida (DMF) y se conservaron en oscuridad y a baja temperatura para los ensayos en ausencia de radiación. La concentración de Pt en cada una de las disoluciones stock y posterior dilución en agua se determinó mediante Espectrometría de Absorción Atómica (FAAS). El ADN Calf Thymus (CT ADN) (42% G+C, peso molecular aproximado 20,000 KDa) y DMF se obtuvieron de Sigma (Praga, República Checa). Los plásmidos pUC19 (2686 pares de bases (pb)) y pSP73KB (2455 pb) se aislaron de acuerdo con el procedimiento estándar. Las endonucleasas de restricción y la enzima T4 polinucleótido kinasa provienen de New England Biolabs; ARN polimerasa T7 y el inhibidor de ribonucleasa RNasin, de Promega (Manheim, Alemania). Ribonucleótidos y desoxiribonucleótidos trifosfato provenían de Roche Diagnostics, GmbH (Alemania) y la tiourea, de Merck (Darmstadt, Alemania). La agarosa se

obtuvo de FMC Bioproducts (Rockland, ME, USA) y los reactivos radiactivos de MP Biomedicals (Irvine, CA, USA).

2.3.2 Estudios de unión de los complejos al ADN *in vitro* en ausencia de radiación

2.3.2.1 Mapeo transcripcional de los aductos de ADN

El plásmido pSP73KB (2455 pb) se purificó siguiendo el procedimiento estándar. Las enzimas de restricción las proporcionó New England Biolabs (Frankfurt am Main, Germany). La ARN polimerasa T7, ribonucleótidos y ARNs in ribonucleasa son componentes de "Riboprobe® *in vitro* Transcription Systems kit" que se adquirió en Promega (Mannheim, Germany). El reactivo [α - 32 P]CTP radioactivo se obtuvo de MP Biomedicals (Irvine, CA, USA).

La transcripción del fragmento de restricción (*NdeI/HpaI*) del ADN plásmidico pSP73KB usando la enzima ARN polimerasa T7 y el análisis electroforético de los transcritos se realizaron de acuerdo a los protocolos recomendados por Promega [Promega Protocols and Applications, 43–46 (1989/90)]^{23,29}. La concentración de ADN usada en este ensayo fue de 4.0×10^{-5} (relativo al contenido monomérico por nucleótido).

La síntesis *in vitro* de ARN por las ARN polimerasas en los moldes de ADN, conteniendo diversos tipos de aductos generados por los complejos **1-5** debe terminarse prematuramente al nivel o en las proximidades de los aductos. El corte del plásmido por las enzimas de restricción *NdeI* y *HpaI* generaron un fragmento de 212 pb. Este fragmento contiene el promotor de la ARN polimerasa T7.

Los experimentos se realizaron usando el fragmento de ADN lineal, modificado con valores de $r_b = 0.015$ por cisplatino y los complejos **1-5**.

2.3.2.2 Cuantificación de los aductos intercatenarios

Los complejos de Pt se incubaron con 0.8 μ g del plásmido pSP73KB (2455 pb) linearizado previamente con la endonucleasa *PvuII* y marcado en el extremo 5' con ATP [γ - 32 P], usando la enzima T4 polinucleótido Kinasa. La incubación con los complejos se mantuvo a 37 °C durante 24 h. El %ICLs generado por cada complejo se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa alcalina (1%) en condiciones desnaturizantes. Una vez finalizada la electroforesis, se cuantificó la intensidad de las bandas correspondientes a cadenas simples de ADN y los dúplex de enrollamientos intercatenarios. La frecuencia de aductos intercatenarios se calculó como %ICL/Pt = $XL/5372 \times r_b$ (el plásmido pSP73KB contiene 419 nucleótidos), donde %ICL/Pt es el número de

cruzamientos intercatenarios por aducto multiplicado por 100 y XL el número de cruzamientos intercatenarios por molécula de dúplex de ADN linearizado, asumiendo una distribución de Poisson de los enrollamientos intercatenarios en la que $XL = -\ln A$, siendo A la fracción de moléculas que corren como una banda correspondiente al ADN no entrecruzado³⁰.

2.3.2.3 Temperatura de melting del ADN

Las curvas de melting del CT ADN usado como control e incubado con los complejos **1-5** se registraron por medición de la absorbancia a 260 nm como función de la temperatura (utilizando un ancho de banda 1 nm, tiempo promedio 10 s, y velocidad de calentamiento 0,4 °C). El experimento se realizó simultáneamente en 6 cubetas opacas de 1 cm y 1.2 mL de volumen, usando un controlador Peltier de 6 muestras en un espectrofotómetro UV/Vis Varian Cary. Las curvas de melting se registraron en un medio que contenía NaClO₄ (10 mM) en buffer Tris-HCl (1 mM) + EDTA (0.1 mM, pH 7.4). El valor de t_m se determinó como la temperatura correspondiente al máximo de la primera derivada de las curvas de melting. Los valores de t_m se determinaron con una exactitud de ± 0.3 °C.

2.3.2.4 Caracterización de los aductos de platino por Tiourea (TU)

Se prepararon dos grupos de muestras con CT ADN (1×10^{-4} M). El primer grupo se incubó con transplatino (en agua) y los complejos *trans* **2-5** a un $r_i = 0.05$ en DMF conteniendo NaClO₄ (10 mM) a 37 °C durante 24 h. La reacción se detuvo mediante diálisis de las muestras durante toda una noche a 4 °C. En el segundo grupo, las reacciones se interrumpieron por adición de soluciones de TU 0.5 M. Estas muestras con TU se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente y posteriormente se dializaron toda la noche a 4 °C. La cantidad de Pt unido al ADN con y sin TU se determinó por FAAS.

2.3.2.5 Relajamiento de ADN plasmídico superenrollado negativamente

El desenrollamiento del plásmido superenrollado cerrado y circular pSP73KB se determinó por electroforesis en gel de agarosa. El ángulo de desenrollamiento ϕ , inducido por la formación de un aducto Pt-ADN, se calculó con el valor r_b al cual el complejo produce la completa transformación de la forma superenrollada a la forma relajada. Las muestras de ADN plasmídico a una concentración de 2.2×10^{-4} M, se incubaron con los complejos a 37 °C a distintos r_b en oscuridad durante 24 h. Posteriormente se precipitaron con etanol y se redisolieron en buffer TAE (Tris-

acetato-EDTA). De este precipitado se extrajo una alícuota y se corrió mediante electroforesis en gel de agarosa (1%) a 25 °C en oscuridad con buffer TAE y a 40 V. Los geles obtenidos se revelaron con bromuro de etidio, seguido de una fotografía realizada con un transiluminador. El resto de cada alícuota se utilizó para la determinación de los valores de r_b por FAAS. El ángulo de desenrollamiento Φ puede ser calculado usando la relación $\Phi = -18\sigma / r_b(c)$, donde σ es la densidad superhelicoidal y $r_b(c)$ es el valor de r_b al cual las formas superenrollada y relajada comigran³¹.

2.3.3 Estudios de unión de los complejos al ADN *in vitro* en presencia de radiación

2.3.3.1 Estudio de las cinéticas de unión al ADN de los complejos fotoactivados

En este experimento se evaluó la cantidad de Pt unido al ADN con los complejos **2** y **5**. Inicialmente se incubaron dos grupos de muestras de CT ADN con los complejos en DMF (1 %) conteniendo NaClO₄ (10 mM) a un $r_b = 0.1$ y a 37 °C. El primer grupo se irradió con luz UV ($\lambda = 365$ nm), mientras que el segundo se incubó en oscuridad. Se fueron extrayendo alícuotas de las muestras a tiempo 0, 2, 4 y 24 h, cuantificando la cantidad de Pt unido al ADN por FAAS. El generador de luz UV utilizado en este ensayo es un fotorreactor LZC-ICH2 de Luzchem (Canadá) con lámparas de UV incorporadas (4.3 mW/cm², $\lambda_{\max} = 365$ nm). La temperatura en la cámara de luz durante el experimento fue de 37 °C.

2.3.3.2 Reactividad de los complejos frente a 5'-GMP

Las muestras se prepararon en una disolución de los complejos **2** ó **5** (3 mM) con 5'-GMP (3 mg, 22.5×10^{-3} mmol), usando una mezcla de disolventes D₂O:acetona-d₆ (1:2), siendo el volumen final de 0.5 mL (volumen final necesario en un tubo de RMN). La adición de la disolución de 5'-GMP en D₂O se realizó muy lentamente y con agitación constante en un termoagitador (Thermomixer C, Eppendorf, España) a 37 °C sobre la disolución que contenía el complejo en acetona-d₆, para evitar problemas de precipitación. Un tubo de RMN se mantuvo bajo agitación durante 24 h a 37 °C en oscuridad. Otro tubo se colocó en un carrusel dentro del fotoactivador (Luzchem Research, Inc. Option 1), equipado con lámparas de UV de $\lambda_{\max} = 350$ nm y que alcanza una irradiación de 270 nm. La monitorización de la reacción se realizó por ¹H-RMN de 0 a 24 h. En ambos casos, se obtuvo un sólido blanco que se aisló por centrifugación. Se procedió a caracterizar únicamente el sólido procecente del complejo **2**, por ¹H RMN y ESI MS en DMSO-d₆.

2.3.3.3 Ensayos de fototoxicidad

Las líneas celulares tumorales humanas SiSo (adenocarcinoma uterino cervical) y LCLC-103H (adenocarcinoma de células no embrionarias de pulmón) provenían de la Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares (DSMZ) (Braunschweig, Germany). El medio celular RPMI 1640, de PAN Biotech (Aidenbach, Germany) fue suplementado con un 10% de suero de ternera fetal y antibióticos (penicilina y estreptomycin). Las lámparas de UV usadas para los experimentos celulares fueron Hitachi FL 8BL-B 8 W, las cuales emiten luz entre 300 y 400 nm, con $\lambda_{\max} = 350$ nm. Se incorporaron cinco lámparas en un panel Luzchem Expo (Luzchem Research Inc., Ontario, Canada), montado en la parte superior del incubador, 25 cm por encima de las placas multipocillo, que fueron incubadas a 37 °C. Un filtro de 3 mm grueso de cristal acrílico situado entre las lámparas y las placas, filtra la luz <300 nm.

Las células se sembraron a una densidad de 1000 (SiSo) y 250 (LCLC-103H) células por pocillo e incubadas durante 24 h a 37 °C, en atmosfera de 5% de CO₂. Posteriormente, las células se trataron con diluciones de los complejos en 0,1% de DMF y se preincubaron 1 h en oscuridad, para después irradiarlas con luz UV ($\lambda_{\max} = 350$ nm, $I = 0.12$ mW/cm²) durante 90 min. Pasado este tiempo, las células se conservaron en oscuridad 6 h antes de que el medio fuese reemplazado por medio fresco (200 μ L por pocillo). Posteriormente, las células se incubaron 88.5 h con medio fresco. Se fijaron las células con glutaraldehído (10%) y se realizó un ensayo de antiproliferación mediante el método del cristal violeta. Los valores de IC₅₀ se obtuvieron a partir de tres experimentos realizados de manera independiente.

2.3.3.4 Estudios computacionales

Los cálculos DFT y TD-DFT de los complejos **1**, **2** y **5** y sus aductos con 9-etilguanina (9-EtG) se llevaron a cabo con el programa Gaussian 09 (G09) al nivel PBE1PBE:LANL08/6-31G** de teoría para la optimización de la geometría y al nivel CAM-B3LYP/LANL08/6-31G** para evaluar las transiciones singlete-singlete. El nivel LANL08 para I y Pt fue generado usando la EMSL Basis Set Exchange Library. El efecto del disolvente (agua) es incluido empleando el Polarizable Continuum Model (PCM), usando la variante de formalismo de la ecuación integral (IEFPCM) implementada en G09. Por defecto, el programa aumenta la cavidad usando el radio UFF, el cual crea una esfera alrededor de cada átomo de soluto, con el radio del campo de fuerza escalado por un factor de 1.1. Los átomos de hidrógeno poseen esferas individuales (hidrógenos específicos). El programa GaussSum 2.2.5 fue empleado para simular los espectros electrónicos y para visualizar las

transiciones del estado excitado como mapas de diferencia de densidad electrónica. Las imágenes moleculares de gráficos se generaron usando el paquete USCF Chimera from the Resource for Biocomputing, Visualization, and Informatics at the University of California, San Francisco (Financiado por NIHP41 RR0010819).

2.4 Bibliografía

- (1) Kelland, L. *Nat. Rev. Cancer*, **2007**, *7*, 573.
- (2) Cleare, M. J.; Hoeschele, J. D. *Bioinorg. Chem.*, **1973**, *2*, 187.
- (3) Basolo, F.; Gray, H. B.; Pearson, R. G. *J. Am. Chem. Soc.*, **1960**, *82*, 4200.
- (4) Timerbaev, A. R.; Hartinger, C. G.; Aleksenko, S. S.; Keppler, B. K. *Chem. Rev.*, **2006**, *106*, 2224.
- (5) Messori, L.; Casini, A.; Gabbiani, C.; Michelucci, E.; Cubo, L.; Ríos-Luci, C.; Padrón, J. M.; Navarro-Ranninger, C.; Quiroga, A. G. *ACS Med. Chem. Lett.*, **2010**, *1*, 381.
- (6) Messori, L.; Cubo, L.; Gabbiani, C.; Álvarez-Valdés, A.; Michelucci, E.; Pieraccini, G.; Ríos-Luci, C.; León, L. G.; Padrón, J. M.; Navarro-Ranninger, C.; Casini, A.; Quiroga, A. G. *Inorg. Chem.*, **2012**, *51*, 1717.
- (7) Messori, L.; Marzo, T.; Gabbiani, C.; Valdes, A. A.; Quiroga, A. G.; Merlino, A. *Inorg. Chem.*, **2013**, *52*, 13827.
- (8) Ramos-Lima, F. J.; Quiroga, A. G.; García-Serrelde, B.; Blanco, F.; Carnero, A.; Navarro-Ranninger, C. *J. Med. Chem.*, **2007**, *50*, 2194.
- (9) Ramos-Lima, F. J.; Vrána, O.; Quiroga, A. G.; Navarro-Ranninger, C.; Halámiková, A.; Rybníčková, H.; Hejmalová, L.; Brabec, V. *J. Med. Chem.*, **2006**, *49*, 2640.
- (10) Huxley, M.; Sanchez-Cano, C.; Browning, M. J.; Navarro-Ranninger, C.; Quiroga, A. G.; Rodger, A.; Hannon, M. J. *Dalton Trans.*, **2010**, *39*, 11353.
- (11) Parro, T.; Medrano, M. A.; Cubo, L.; Munoz-Galvan, S.; Carnero, A.; Navarro-Ranninger, C.; Quiroga, A. G. *J. Inorg. Biochem.*, **2013**, *127*, 182.
- (12) Šebest, P.; Brázdová, M.; Fojta, M.; Pivoňková, H. *Int. J. Mol. Sci.*, **2015**, *16*, 3163.
- (13) Aris, S. M.; Farrell, N. P. *Eur. J. Inorg. Chem.*, **2009**, *2009*, 1293.
- (14) Vousden, K. H.; Lu, X. *Nat. Rev. Cancer*, **2002**, *2*, 594.
- (15) Vekris, A.; Meynard, D.; Haaz, M. C.; Bayssas, M.; Bonnet, J.; Robert, J. *Cancer Res.* **2004**, *64*, 356.
- (16) Perego, P.; Giarola, M.; Righetti, S. C.; Supino, R.; Caserini, C.; Delia, D.; Pierotti, M. A.; Miyashita, T.; Reed, J. C.; Zunino, F. *Cancer Res.*, **1996**, *56*, 556.
- (17) Cubo, L.; Pizarro, A. M.; Quiroga, A. G.; Salassa, L.; Navarro-Ranninger, C.; Sadler, P. J. *J. Inorg. Biochem.*, **2010**, *104*, 909.
- (18) Cubo, L. **2010**, *104*, 909.
- (19) Nováková, O.; Nazarov, A. A.; Hartinger, C. G.; Keppler, B. K.; Brabec, V. *Biochem. Pharmacol.*, **2009**, *77*, 364.
- (20) Žaludová, R.; Kleinwächter, V.; Brabec, V. *Biophys. Chem.*, **1996**, *60*, 135.
- (21) Frybortova, M.; Novakova, O.; Stepankova, J.; Novohradsky, V.; Gibson, D.; Kasparikova, J.; Brabec, V. *J. Inorg. Biochem.*, **2013**, *126*, 46.
- (22) Chang, C.-L.; Lando, D. Y.; Fridman, A. S.; Hu, C.-K. *Biopolymers*, **2012**, *97*, 807.
- (23) Brabec, V.; Leng, M. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **1993**, *90*, 5345.
- (24) Hongo, A.; Seki, S.; Akiyama, K.; Kudo, T. *Int. J. Biochem.*, **1994**, *26*, 1009.
- (25) Fichtinger-Schepman, A. M. J.; Van der Veer, J. L.; Den Hartog, J. H. J.; Lohman, P. H. M.; Reedijk, J. *Biochem.*, **1985**, *24*, 707.
- (26) Wilson, J. J.; Lippard, S. J. *Chem. Rev.*, **2014**, *114*, 4470.
- (27) Desoize, B. *Anticancer Res.*, **2004**, *24*, 1529.
- (28) Quiroga, A. G. *J. Inorg. Biochem.*, **2012**, *114*, 106.
- (29) Lemaire, M. A.; Schwartz, A.; Rahmouni, A. R.; Leng, M. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **1991**, *88*, 1982.

- (30) Navas, F.; Perfahl, S.; Garino, C.; Salassa, L.; Novakova, O.; Navarro-Ranninger, C.; Bednarski, P. J.; Malina, J.; Quiroga, A. G. *J. Inorg. Biochem.*, **2015**, *153*, 211.
- (31) Keck, M. V.; Lippard, S. J. *J. Am. Chem. Soc.*, **1992**, *114*, 3386.

Capítulo 3. Actividad citotóxica *in vitro* de complejos *cis* y *trans*-[PtX₂(amina)(amina´)] (X = cloruro/yoduro), análisis de su impacto en la activación de la apoptosis y su reactividad frente a modelos de ADN

En este capítulo se describe la actividad de una serie de complejos *cis* y *trans* de Pt^{II} con ligandos cloruro ó yoduro y aminas alifáticas, sintetizados en el grupo de investigación, en células de cáncer gástrico. Se han realizado estudios de la actividad citotóxica, ciclo celular y activación de apoptosis en presencia de estos de estos compuestos.

3.1 Introducción

3.1.1 Cáncer y carcinogénesis

El **cáncer** es la segunda causa de muerte en todo el mundo después de las enfermedades cardiovasculares, y se produce por un crecimiento aberrante y descontrolado de células transformadas¹. La **carcinogénesis** involucra multitud de etapas y se inicia cuando las células acumulan una sucesión de mutaciones genéticas, generando la transformación final de una célula normal en una maligna. Estas células malignas adquieren las capacidades de crecer, migrar e invadir el tejido adyacente².

Los tejidos sanos responden a las señales y activan rutas de señalización que permiten a la célula crecer y entrar en división, garantizando un número correcto de células y el mantenimiento de la arquitectura normal del tejido y su función. En tejidos tumorales, sin embargo, se produce una regulación anómala de estas señales, provocando fallos en el control del ciclo celular, aumento descontrolado del crecimiento de la célula, de su supervivencia y del metabolismo energético³.

La investigación actual se centra en dos aspectos fundamentales: i) comprender los complejos mecanismos por los que se desarrolla el cáncer a nivel molecular, para identificar nuevas dianas moleculares que permitan el desarrollo de agentes quimioterápicos más específicos; y ii) modificaciones químicas de los fármacos utilizados actualmente en clínica, que permitan una mayor eficiencia frente al tumor con reducidos efectos secundarios a nivel sistémico en todo el organismo, en comparación con los agentes citotóxicos convencionales⁴.

3.1.2 Ciclo celular

El ciclo celular es un proceso complejo constituido por una secuencia de eventos que culminan en la mitosis y en la producción de dos células hijas, que contienen un material genético idéntico al de la célula parental.⁵ El ciclo celular comprende las fases **G1**, **S**, **G2** y **M**. En la fase **G1**, la célula se prepara para la síntesis de ADN, cuya replicación ocurre en la **fase S**. En **G2**, se genera una reorganización del contenido celular para entrar en mitosis (**fase M**), donde se produce la segregación de los cromosomas⁶. Las etapas de la mitosis se resumen en la Figura 3.1:

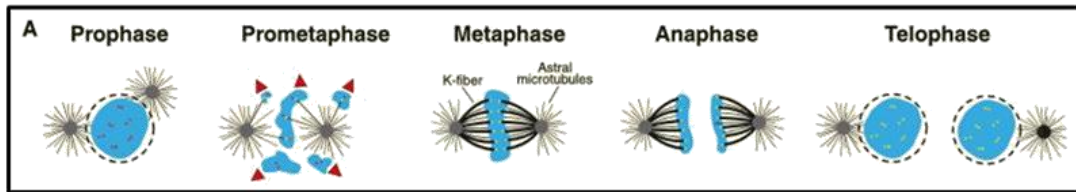


Figura 3.1. Esquema de las fases de la mitosis celular⁵.

El control de la progresión a través de las distintas fases del ciclo celular y las transiciones de una fase a la siguiente lo ejercen los puntos de control y los complejos ciclinas-kinasa dependientes (CDK), encargados de mantener un estricto orden de todos los eventos que conducirán finalmente la división celular^{6,7}. Si se producen lesiones en el ADN, los puntos de control detienen el ciclo, proporcionando el tiempo necesario para que la célula repare el ADN y prevenir así la transmisión de mutaciones a las células hijas. La regulación incorrecta del ciclo y la pérdida de función en los puntos de control, puede conducir a una proliferación celular descontrolada, originando un cáncer⁶.

- **Transición G1-S:** fallos producidos en esta etapa, como por ejemplo lesiones en el ADN, generan alteraciones en diversas proteínas, variando la normal progresión del ciclo. El producto Rb (gen de susceptibilidad del retinoblastoma) juega un papel central en esta transición, parando el ciclo hasta que la célula esté preparada y se den las condiciones adecuadas⁷.

- **Transición G2/M:** en esta etapa tiene lugar el segundo mayor punto de control del ciclo celular.

Las lesiones producidas en el ADN por complejos de Pt son reconocidas por la maquinaria celular, provocando la parada de la transcripción y la replicación del ADN. Además, se activa la ruta de señalización por daño en el DNA (DNA damage response, DDR), provocando la activación de los puntos de control de ciclo celular, lo que provoca una parada de ciclo, proporcionando tiempo suficiente para que la maquinaria de reparación se active y repare las lesiones producidas. En caso de que las lesiones sean muy abundantes y no se puedan reparar, se activará la ruta de muerte celular, parando el ciclo⁸, siendo la apoptosis la vía más frecuentemente activada por los agentes antitumorales. En el caso del cisplatino, la activación de los puntos de control del daño en el ADN inducen la parada del ciclo en las fases G1 y G2⁹.

3.1.2.1 Muerte celular. Apoptosis

En 1972, Kerr y colaboradores definieron la apoptosis como una forma de muerte celular programada, que se da en ciertos procesos fisio y patológicos¹⁰, como reacciones del sistema

inmunológico, enfermedades que dañan directamente a la célula o por ataque de sustancias químicas¹¹. La respuesta apoptótica depende de la severidad de la lesión ocurrida en la célula y de la diana celular que ha sido dañada, además del estadio de desarrollo en la que esta se encuentre¹².

3.1.2.2 Caspasas: rutas de activación

Miura y colaboradores mostraron que el proceso apoptótico se origina por la activación de una familia de cisteína-proteasas denominadas caspasas¹³. Las caspasas se unen a sitios específicos dentro de las proteínas, requiriendo un residuo de aspartato para su unión. A diferencia de otras muchas proteasas, las caspasas se sintetizan como zimógenos, y posteriormente se activan por proteólisis. Se diferencian en dos grandes grupos, según la función que realizan: los **iniciadores**, como las caspasas -8 y -9, y los **efectores**, como las caspasas -3, -6 y -7, en mamíferos¹⁴.

Existen dos rutas apoptóticas que involucran la activación de caspasas: la **vía extrínseca** y la **vía intrínseca ó mitocondrial**¹⁵, las cuales se resumen en la Figura 3.2:

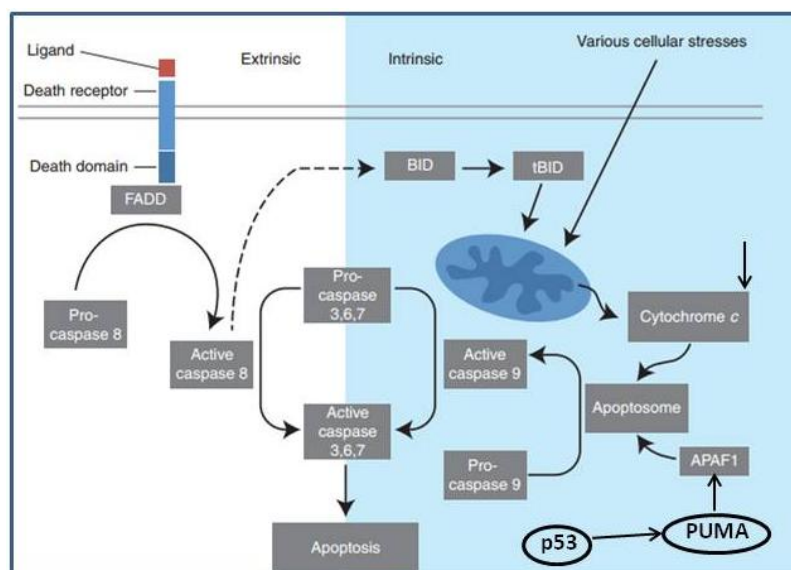


Figura 3.2. Rutas de activación extrínseca (izquierda) e intrínseca (derecha) de apoptosis¹⁵.

a) La vía de apoptosis extrínseca se activa a través de la unión a un receptor de muerte, que conduce a su vez, con la ayuda de proteínas adaptadoras (FADD/TRADD), al reclutamiento, dimerización y activación de la caspasa-8. Una vez activa, la caspasa-8 inicia directamente el proceso apoptótico por rotura y activación de los efectores caspasa-3, -6 y -7, o por activación de la vía mitocondrial, por rotura de la proteína BID.

b) La vía intrínseca ó mitocondrial se puede activar a través de diversos fenómenos de estrés celular, que permiten que el citocromo C de la cadena respiratoria se libere de la mitocondria al citoplasma, para generar un complejo binario junto con la proteína APAF1. El cambio conformacional de este complejo forma el apoptosoma, donde se une y activa a caspasa-9, iniciando el proceso de apoptosis por rotura y posterior activación de las caspasas efectoras. Los agentes antitumorales cuya diana principal es el DNA activan principalmente esta ruta.

Una vez activadas las caspasas, se proteolizan diferentes sustratos dianas, como son las enzimas **poli (ADP-ribosa) polimerasas (PARP)**. Estas enzimas tienen la habilidad de catalizar la transferencia de ADP-ribosa a otras proteínas, proceso denominado poli ADP ribosilación¹⁶. Las isoformas PARP-1 y PARP-2 son las más conocidas por su papel en la reparación del ADN, además de estar involucradas en proliferación y muerte celular¹⁶. La muerte celular mediada por caspasas se logra a través de la ruptura de varias proteínas clave para el funcionamiento y la supervivencia celular¹⁷, entre las que se encuentra PARP-1. Su rotura por las caspasas -3 y -7 es una de las señas de identidad de la apoptosis¹⁸, y conduce a la formación de dos fragmentos específicos, de 89 y 24 KDa, produciéndose su inhibición¹⁹.

3.1.2.3 Proteína supresora de tumores p53

p53 es una proteína supresora de tumores involucrada en diversas funciones, entre otras, la parada del ciclo celular, senescencia ó apoptosis. A través de estas vías, p53 facilita la reparación y supervivencia de células dañadas, ó induce apoptosis²⁰. La activación de la vía de señalización de p53 se inicia por un amplio rango de factores de estrés, que pueden ser intrínsecos o extrínsecos a la célula. La activación de p53 se produce por estabilización de la proteína debido a la degradación de Mdm2, lo que permite la formación de un complejo formado por cuatro subunidades de p53, que actúa como factor de transcripción, activando la expresión de genes implicados en reparación o apoptosis²¹. El segundo mecanismo descrito de activación de p53 se produce por modificaciones post-traduccionales, entre ellas la fosforilación, que puede ser llevada a cabo por diversas kinasas²⁰ (como ATM, ATR, Chk1, Chk2, ó p38).

p53 se encuentra mutada en el 50% de tumores sólidos humanos y la sensibilidad a cisplatino se correlaciona positivamente, en muchos casos, con la presencia de p53 wild-type²². Así, células tumorales deficientes en p53 son más resistentes a cisplatino que aquellas que expresan normalmente esta proteína, aunque existen diversos estudios que muestran que en algunos tipos

de cáncer, la deficiencia en los niveles de esta proteína no está directamente relacionada con la sensibilidad a este fármaco²³⁻²⁵.

3.2 ResultadosObjetivos

Basándonos en la reactividad de los complejos con ligandos yoduro frente al ADN, discutida en el capítulo anterior, nos propusimos ensayar su actividad citotóxica *in vitro* en la línea celular MKN45 de cáncer gástrico, su acción en las diferentes etapas del ciclo celular, y la evaluación de su impacto sobre la apoptosis: caspasa-3, PARP y p-53. Además, usando un modelo de ADN, como la 9-EtG, confirmamos los resultados por difracción de rayos X.

3.2.2 Síntesis

Los complejos con enlace Pt-Cl (Figura 3.3, complejos **CI-1** a **CI-3**,) habían sido sintetizados previamente por el grupo de investigación, siguiendo los procedimientos descritos en la bibliografía^{26,27}, y fueron caracterizados por las técnicas usuales. Los complejos con enlace Pt-I seleccionados (Figura 3.3, complejos **I-4** a **I-6**) han sido objeto de estudio en el capítulo 2.

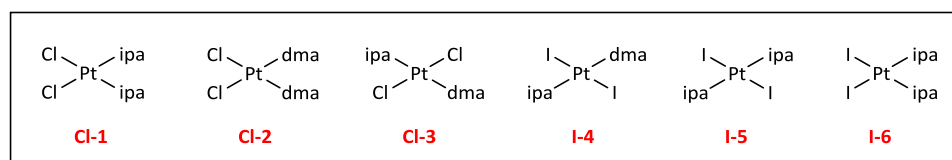


Figura 3.3. Complejos *cis/trans* de Pt^{II} con ligandos cloruro/yoduro y aminas alifáticas.

La elección de estos complejos fue realizada en base a su distinta reactividad frente a moléculas biológicas, además de por sus buenos valores de actividad citotóxica *in vitro*. Como ya se ha descrito en los capítulos 1 y 2 de esta tesis doctoral, los complejos *cis* de Pt^{II}-I, presentaron una reactividad inesperada frente a proteínas²⁸, con retención de los ligandos yoduro y pérdida de las aminas. Todos estos complejos frente al ADN muestran una reactividad clásica, similar a la del cisplatino.

3.2.3 Reactividad del complejo I-5 frente a 9-EtG

Para confirmar este hecho, se forzaron las condiciones de reacción del complejo *trans*-[Pt(ipa)₂I₂] con dos equivalentes de AgNO₃, y se trató con dos equivalentes de 9-EtG. La 9-EtG es un modelo de ADN más pequeño que los oligonucleótidos y el ADN plasmídico, y más soluble en

disoluciones orgánicas que 5'-GMP, lo que le hace idóneo para estudiar su reactividad por RMN y difracción de rayos X. Finalmente, se aisló la especie ***trans*-[Pt(9-EtG)₂(ipa)₂](NO₃)₂**, que se logró cristalizar en acetona-agua. La resolución por difracción de rayos X (Figura 3.4), apoya la reactividad clásica de los complejos *trans* de Pt^{II}-I frente a modelos de ADN.

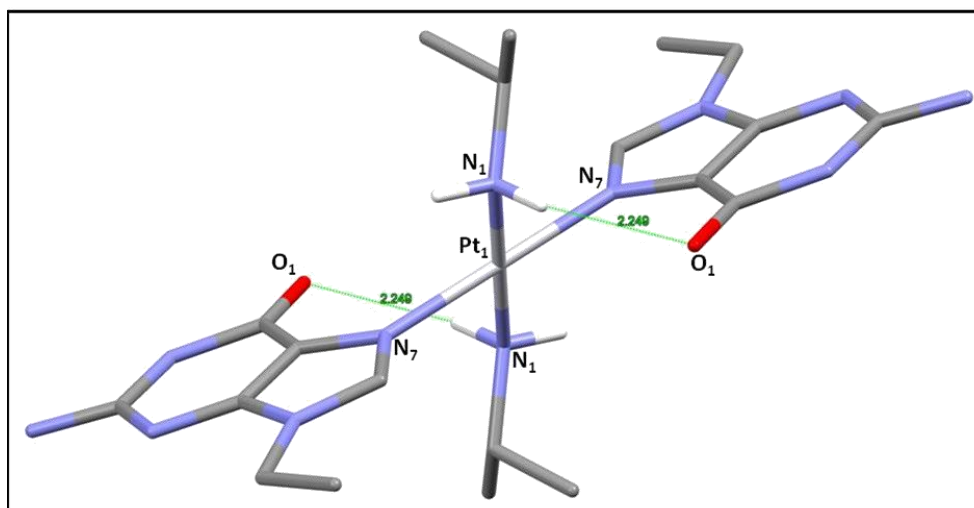


Figura 3.4. Estructura cristalina de la especie ***trans*-[Pt(9-EtG)₂(ipa)₂]²⁺**.

La estructura (Figura 3.4) muestra un entorno casi plano-cuadrado alrededor del átomo de Pt, ya que los valores de ángulos de enlace N₁-Pt₁-N₁, N₇-Pt₁-N₇ y N₇-Pt₁-N₁ son de 180.0°, 180.0(2)° y 91.05°, respectivamente (Tabla 3.3, sección experimental). El Pt^{II} se encuentra formando un bisaducto con las dos moléculas de 9-EtG en posición *trans*, a través del N₇. Las distancias de enlace Pt₁-N₁ (ipa) y Pt₁-N₇ (9-EtG) se encuentran comprendidas entre los rangos de distancias esperadas para estos enlaces, y son de 2.061(4) Å y 2.019(4) Å, respectivamente²⁹⁻³¹ (Tabla 3.3, sección experimental). Las dos moléculas de 9-EtG son coplanares, mientras que los ligandos ipa se encuentran girados 180° uno respecto del otro, adoptando la conformación más estable. Además, existe una interacción de tipo enlace de hidrógeno entre el O₁ del grupo carbonilo de la 9-EtG y el hidrógeno del grupo -NH₂ de la ipa, como ya ha sido descrito anteriormente en algunos complejos de Pt con ligandos amina y 9-EtG^{30,32,33}. La distancia de dicho enlace es de 2.249 Å, indicando una fuerte interacción intramolecular, y que concuerda con el rango de distancias publicadas³⁴. Esta interacción puede hacer que los anillos aromáticos de la 9-EtG no puedan rotar libremente a través del enlace Pt₁-N₂, lo que podría tener una consecuencia directa en la estabilidad de la doble hélice cuando se produce la coordinación del complejo de Pt^{II}.

3.2.4 Evaluación de la actividad citotóxica de los complejos de Pt-Cl con aminas alifáticas

Inicialmente procedimos a analizar la actividad citotóxica de los tres complejos seleccionados de Pt^{II} con ligandos cloruro, en la línea celular de adenocarcinoma gástrico, MKN45, en un ensayo de dosis respuesta (0-50 μ M). Como control utilizamos cisplatino, para el que están bien establecidas las condiciones en esta línea celular. Las células se trataron con los complejos y se incubaron a 37 °C durante 48 h, como se describe en la sección experimental. La gráfica que recoge las curvas dosis-respuesta, en la que se ha representado el % de viabilidad celular frente a la concentración, se muestra en la Figura 3.5:

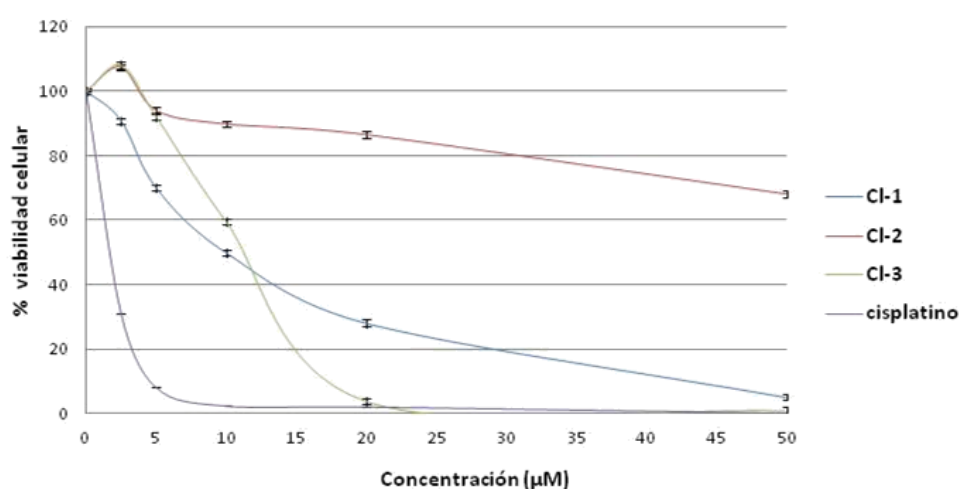


Figura 3.5. Curvas dosis-respuesta del tratamiento de células MKN45 con los complejos CI-1, CI-2, CI-3 y CDDP, tras 48 h.

El complejo más activo es el cisplatino, con un IC₅₀ de 2.5 μ M, seguido de los complejos *cis* CI-1 y *trans* CI-3, con valores de IC₅₀ de 10 y 13 μ M, respectivamente. El complejo *cis* CI-2, no mostró actividad citotóxica en esta línea celular, por lo que fue descartado para futuros experimentos. El cisplatino, además, a una concentración de 10 μ M, ha producido el 100 % de la muerte celular, mientras que el complejo CI-1 necesita una dosis mucho más alta (50 μ M). El complejo CI-3, por su parte, a una concentración de 20 μ M, produce el 100% de la muerte celular, por lo que este complejo tiene un comportamiento más parecido al del cisplatino. Cabe destacar que se observa un ligero crecimiento celular en las curvas dosis-respuesta cuando las células son tratadas con los complejos CI-2 y CI-3. Esto es debido a que, a bajas dosis, se activan mecanismos de supervivencia en las células, para acondicionarse a la dosis.

Con este ensayo de viabilidad, se pone de manifiesto la mayor actividad citotóxica del complejo *trans* CI-3 sobre el complejo *cis* CI-1 en la línea celular tumoral MKN45.

3.2.5 Evaluación de la actividad citotóxica de los complejos de Pt-II con aminas alifáticas

Una vez analizada la actividad de los complejos con enlace Pt-Cl, procedimos a realizar el experimento con los complejos de Pt^{II} con ligandos yoduro, en el mismo rango de concentraciones.

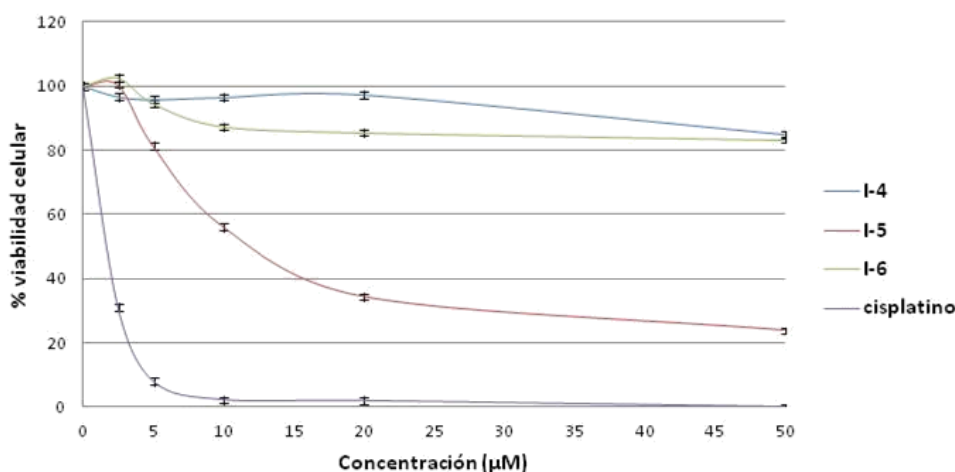


Figura 3.6. Curvas dosis-respuesta del tratamiento de células MKN45 con los complejos I-4, I-5, I-6 y CDDP, tras 48 h.

La gráfica de viabilidad de la Figura 3.6 muestra cómo el complejo *trans* I-5 es el más citotóxico ($IC_{50} = 13 \mu M$) después del cisplatino, mientras que las especie asimétrica *trans* I-4 y el isómero *cis* I-6 no presentan actividad en la línea MKN45. Ninguno de los complejos, a la máxima concentración ensayada, llega a producir toda la muerte celular, por lo que estos complejos son claramente menos activos que los complejos con enlace Pt-Cl. Esto pone de manifiesto que las diferencias estructurales entre los complejos de Pt^{II} con ligandos cloruro ó yoduro, pueden producir grandes diferencias en su actividad antiproliferativa.

3.2.6 Análisis del ciclo celular

El análisis del efecto de los complejos en las distintas etapas del ciclo celular se estudió utilizando citometría de flujo. Para estos experimentos se descartaron los complejos **Cl-2** e **I-4**, al no haber mostrado actividad antiproliferativa en esta línea. El complejo *trans* **Cl-3** ya había mostrado previamente una gran inducción de apoptosis en células de cáncer de ovario resistentes a cisplatino³⁵. Las células se trataron con el resto de complejos a una concentración de 7.5 µg/mL, durante 24 h y 48 h, y se procedió a realizar los experimentos de ciclo celular, tal y como se detalla en la sección experimental. Los resultados del % de apoptosis inducida por los complejos tras 24 y 48 h se muestran en la Tabla 3.1:

Tabla 3.1. % de células apoptóticas después de tratar las células MKN45 con los complejos Cl-1, Cl-3, I-5, I-6 y CDDP a 24 y 48 h.

% apoptosis		
Complejo	24 h	48 h
Control	1.65	1.82
Cisplatino	3.7	19.3
Cl-1	6.5	22.6
Cl-3	7.7	24.5
I-5	4.0	5.5
I-6	2.9	5.8

Como se puede observar en la Tabla 3.1, los complejos con enlace Pt-Cl inducen una mayor activación de apoptosis que los complejos con enlace Pt-I, lo que concuerda con los datos de actividad citotóxica. Además, los complejos *cis* Cl-1 y *trans* Cl-3 generan una activación de la ruta apoptótica similar a la del cisplatino. Cabe destacar que estos complejos con ligandos cloruro ejercen su acción después de 24 h, cuando se produce un considerable aumento de las células que han iniciado el proceso apoptótico. Los complejos con ligandos yoduro, *trans* I-5 y *cis* I-6, inducen una pobre activación de apoptosis, no superando el 6% tras 48 h.

Por otra parte, los resultados del % de células que han quedado retenidas en las fases G1, S y G2/M se muestran en la Tabla 3.2:

Tabla 3.2.% de células en fase G1, S y G2/M después de tratar las células MKN45 con los complejos Cl-1, Cl-3, I-5, I-6 y CDDP a 24 y 48 h.

Complejo	G1		S		G2/M	
	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h
Control	42.09	81.68	28.66	5.23	24.6	10.98
CDDP	36.2	29.0	34.2	29.1	23.2	20.7
Cl-1	31.0	32.6	11.2	14.2	48.6	27.4
Cl-3	40.1	28.0	24.7	26.6	25.8	17.7
I-5	67.6	79.6	5.7	6.1	21.7	8.3
I-6	57.1	77.3	4.5	5.6	34.6	10.3

Los valores recogidos en la Tabla 3.2 muestran que el complejo *trans* con **CI-3**, es el que presenta un comportamiento más parecido al del cisplatino, y tras 48 h de tratamiento se produce una bajada considerable del pico de G1, lo que indica que las células podrían entrar en apoptosis desde esta fase. Uno de los efectos inmediatos de la platinación del ADN es una reducción en su síntesis, lo que genera la activación del punto de control intra-S y un aumento en el % de células en esta fase. Sin embargo ninguno de los compuestos está provocando activación de este punto de control en las células MKN45. El complejo *cis* **CI-1** activa fuertemente el punto de control en G2/M después de 24 h, y nuestros resultados indican que el % de células en esta fase es el doble de la producida por los complejos cisplatino y **CI-3**.

Los complejos con enlace Pt-I, **I-5** e **I-6**, son menos citotóxicos que **CI-1** y **CI-3**, y además, tienen un comportamiento diferente. Ambos complejos inducen una mayor parada en la fase G1 (casi un 80% tras 48 h), lo que indica una fuerte activación del punto de control en esta fase. Nuevamente, se pone de manifiesto el distinto comportamiento de los complejos de las especies con enlace Pt-Cl frente a las del enlace Pt-I.

3.2.7 Activación de la ruta apoptótica por los complejos

A continuación, procedimos a analizar la activación de apoptosis a nivel molecular en la línea celular tumoral MKN45, mediante la técnica de Western-Blot (WB). Como ya se comentó en la introducción de este capítulo, la activación de caspasas es un claro indicador de muerte celular por inducción de la vía apoptótica. Realizamos un análisis de la activación de caspasa-3, PARP-1 y p53, después de tratar las células con los complejos **CI-1**, **CI-3**, **I-5**, **I-6** y cisplatino, a una concentración de 7.5 µg/mL, durante 0, 24 y 48 h. En las imágenes de la Figura 3.7 se muestran los resultados obtenidos para caspasa-3 (A) y PARP-1 (B). Se observa como el cisplatino induce la proteólisis de caspasa-3 tras 24 h, aumentando considerablemente a las 48 h, indicativo de su activación. Además, en la Figura B vemos cómo este complejo produce la completa proteólisis de PARP-1 antes de 24 h, lo que confirma la activación de la ruta apoptótica por cisplatino. La proteólisis de PARP-1 genera el fragmento de 89 kDa, inhibiendo su función. El complejo *cis* **CI-1** requiere 48 h de exposición para activar caspasa-3 y provocar la proteólisis de PARP-1. Por su parte, la especie *trans* **CI-3**, aunque tiene un comportamiento parecido al del cisplatino, genera una proteólisis de caspasa-3 más débil que éste a las 24 h, siendo más intensa a las 48 h. La proteólisis que este complejo induce sobre PARP-1 es similar a la del cisplatino, ya que las 24 h, este sustrato ya se ha proteolizado completamente. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en los ensayos de

ciclo celular, en los que el % de células que habían entrado en apoptosis en presencia de estos tres complejos aumentaba considerablemente a las 48 h.

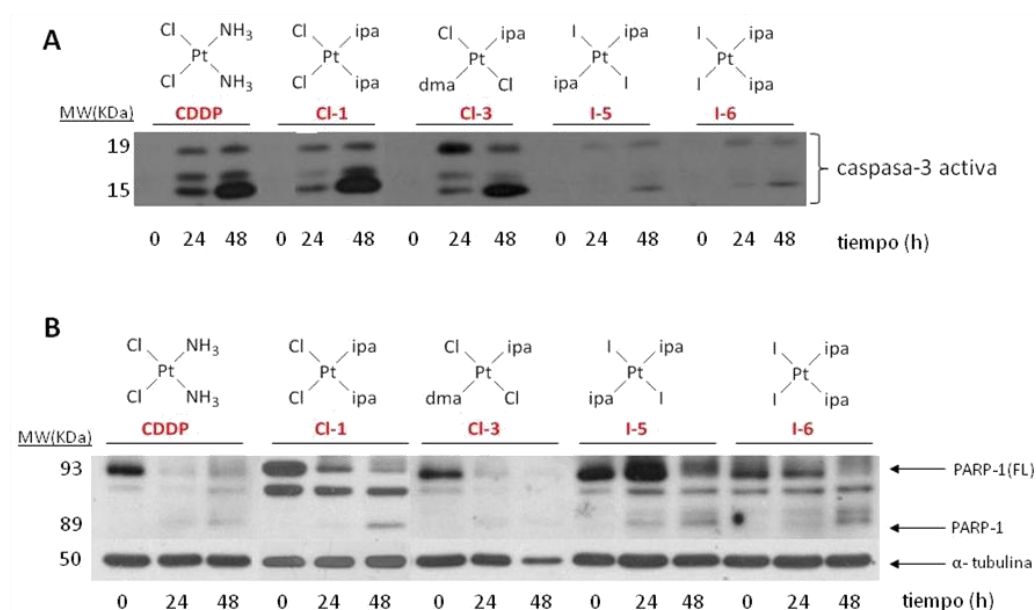


Figura 3.7. Activación de la apoptosis distintos tiempos con los complejos CDDP, CI-1, CI-3, I-5 e I-6, utilizando anticuerpos específicos frente a A) caspasa-3 y B) PARP-1.

Los isómeros con enlace Pt-I, *trans* I-5 y *cis* I-6, inducen una proteólisis más débil de caspasa-3, por lo que estos complejos generan una baja activación de la ruta apoptótica, como ya observamos en la Tabla 3.1. De la misma manera, la proteólisis de PARP-1 en presencia de estos complejos también es pequeña, con la aparición de una banda poco intensa correspondiente al fragmento de 89 KDa después de 48 h. Con esto se pone de manifiesto la baja activación de la ruta apoptótica mostrada por estos complejos de Pt-I en la línea MKN45.

El análisis de la activación de p53 (Figura 3.8) indica que únicamente el cisplatino es capaz de inducir su estabilización tras 24 y 48 h de exposición. Sorprendentemente, ninguno de los complejos ensayados generó una estabilización de p53, ya que los niveles de esta proteína tras 24 h 48 h se corresponden con los niveles basales a tiempo cero.

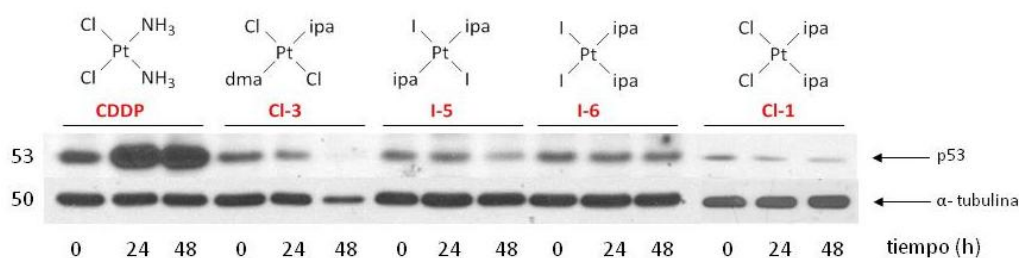


Figura 3.8. Experimentos de WB a tiempo 24 y 48 h con los complejos CDDP, CI-3, I-5, I-6 y CI-1, utilizando un anticuerpo específico frente a p53.

Esto podría indicar una inducción de la vía apoptótica de los complejos **CI-1**, **CI-3**, **I-5** e **I-6** independiente de p53 en células de cáncer gástrico, con un mecanismo de acción distinto al del cisplatino. Puesto que el gen que codifica para esta proteína se encuentra mutado en más del 50% de los tumores, estos complejos podrían ser candidatos en terapia antitumoral para aquellos tipos de cáncer que muestren una deficiencia en p53.

3.3 Parte experimental

3.3.1 Cultivos celulares y fármacos

Se utilizó una línea celular derivada de adenocarcinoma gástrico, MKN45 (adenocarcinoma poco diferenciado, DSMZ: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH). Cisplatino fue suministrado por Ferrer Farma, y los complejos de Pt^{II} fueron sintetizados previamente por nuestro grupo de investigación. La 9-EtG se obtuvo de VWR, los anticuerpos caspasa-3 y p53 fueron suministrados por Cell Signaling Technologies, y PARP-1 por Santa Cruz Technologie. El anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de caballo de mar se obtuvo de Biorad (España).

3.3.2 Reactividad del complejo I-5 frente a 9-EtG

Sobre una disolución del complejo **I-5** (100 mg, 18 mmol) en acetona se adicionó otra disolución concentrada de AgNO₃ (126 mg, 0.38 mmol), agitando a temperatura ambiente durante 2 h en oscuridad. La mezcla de reacción se filtró con celita sobre una disolución de 9-EtG (63 mg, 0.35 mmol), agitando 24 h a temperatura ambiente. El sólido blanco obtenido se filtró, se lavó con acetona y se secó a vacío. Este complejo se logró cristalizar en una mezcla acetona-agua.

3.3.3 Estructura de rayos X

Tabla 3.3. Longitudes y ángulos de enlace seleccionados para la especie *trans*-[Pt(9-EtG)₂(ipa)₂]²⁺.

Longitudes de enlace seleccionadas (Å)	
Pt ₁ - N ₇	2.019(4)
Pt ₁ - N ₁	2.061(4)
Ángulos de enlace seleccionados (°)	
N ₁ - Pt ₁ - N ₁	180.0
N ₇ - Pt ₁ - N ₇	180.0(2)
N ₇ - Pt ₁ - N ₁	91.05

Tabla 3.4. Datos cristalográficos de la especie *trans*-[Pt(9-EtG)₂(ipa)₂]²⁺.

Fórmula química	C ₂₀ H ₃₆ N ₁₄ O ₁₀ Pt
Peso molecular	827.71
Temperatura	100(2) K
Longitud de onda	0.71073 Å
Tamaño del cristal	0.08 x 0.10 x 0.18 mm
Apariencia del cristal	Incoloro prismático
Sistema cristalino	Triclínico
Grupo espacial	P-1
Dimensiones de la celda unidad	a = 7.9762(12) Å α = 104.586(7) b = 9.7305(14) Å β = 92.179(7) c = 10.3506(13) Å γ = 96.643(7)
Volumen	770.34(19) Å ³
Z	1
Densidad calculada	1.784 mg/cm ³
Coefficiente de absorción	4.628 mm ⁻¹
F(000)	412

3.3.4 Ensayos de citotoxicidad de los complejos y cisplatino en la línea celular tumoral MKN45

Las células de la línea tumoral MKN45 fueron crecidas en medio RPMI 1640 (Invitrogen) suplementado con 20% de FBS y 2 mM de L-glutamina, a 37 °C en atmósfera de 95% de aire y 5% de CO₂.

Los ensayos de actividad citotóxica de los complejos **CI-1** a **I-6** y cisplatino en esta línea celular fue evaluado usando el método colorimétrico del cristal violeta. Las células se siembran en placas de 24 pocillos (5×10^4 células/pocillo) y 24 h después se tratan con los complejos a concentraciones de 0, 2.5, 5, 10, 20 y 50 μM , realizando cada tratamiento por cuatuplicado. Las disoluciones stock de los complejos **CI-1** a **I-6** (5 mM) se prepararon en DMSO, y se fueron diluyendo en medio RPMI hasta la concentración final, añadiendo a cada pocillo 500 μL . Tras incubar las células con los complejos a 37 °C durante 48 h, se retira el medio y se lava cada pocillo con PBS 1x. Las células se fijan con 1 % de glutaraldehído durante 15 min, se lavan con PBS 1x y se tiñen 30 min con 0.1% de disolución de cristal violeta (1 mL/pocillo). Después de retirar los restos de cristal violeta, se lava cada pocillo con PBS 1x y se añade una disolución de ácido acético (10 %), agitando cada placa 20 min. El número de células en cada pocillo se estimó midiendo la absorbancia a 595 nm.

3.3.5 Ensayos de ciclo celular

Estos experimentos se realizaron tratando las células con los complejos **CI-1**, **CI-3**, **I-5**, **I-6** y cisplatino (7.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), de manera análoga a la descrita en los ensayos de citotoxicidad, incubando a 0, 24 y 48 h. Previamente, las células MKN45 se sembraron en placas p60 (300000 células/pocillo). Transcurrido el tiempo de incubación, se recogieron las células adheridas y no adheridas y se fijaron toda la noche en una disolución al 70% de etanol en PBS. Para la realización del análisis del contenido de ADN, las células se centrifugaron y se resuspendieron en una disolución de PBS que contiene 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de RNasa (Qiagen Ltd, Crawley, UK) y 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de yoduro de propidio, incubando a temperatura ambiente durante 30 min. Finalmente, se analizaron en un Citómetro de Flujo Becton-Dickinson (Cowley, UK). Los datos se trataron con un software Cell Quest, con 10000 eventos analizados por muestra.

3.3.6 Ensayos de Western Blot con caspasa-3, PARP-1 y p53

Para la realización de estos experimentos, las células se trataron con los complejos **CI-1**, **CI-3**, **I-5**, **I-6** y cisplatino (7.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), de manera análoga a la descrita anteriormente, durante 24 y 48 h. Las células se lisaron con una disolución que contenía: aprotinina, 0.0125 mg/mL; leupeptina, 0.0125 mg/mL; peptatina, 0.0125 mg/mL; ABSF, 6.25 mM; y DTT, 0.0125 M. El lisado se clarificó centrifugando 15 min a 13000 rpm. Se recogió el sobrenadante de cada eppendorf y se cuantificaron las proteínas mediante la técnica del BCA, utilizando una recta de calibrado con seroalbúmina bovina (stock de 1.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Se midió la absorbancia a 650 nm.

Tras cuantificar los extractos proteicos, se separaron 20 µg de extracto total en SDS-PAGE, de acuerdo al peso molecular de la proteína en estudio (15% caspasa-3, 10% p-P53, 8% PARP-1). La electroforesis se realizó a 100 V durante 90 min. Finalizada la electroforesis, se procedió a transferir las proteínas a una membrana de nitrocelulosa, usando para ello disolución de transferencia (10% Tris-glicina y 20% de MeOH). La transferencia se realizó a 100 V durante 2 h, en frío.

El bloqueo se realizó en una disolución (5% de leche desnatada y 0.05% TTBS), agitando durante 45 min. La incubación con el anticuerpo primario: p53 (1:1000), PARP-1 (1:1000) ó caspasa-3 (1:5000 en 5 % de leche desnatada y 0.1 % TTBS) se mantuvo durante toda la noche a 4 °C.

Terminada la incubación, se retiró la disolución del anticuerpo primario y se lavó cada membrana con 0.1 % de TTBS (3 x 10 min). Se adicionó a cada membrana la disolución que contenía al anticuerpo secundario (anticuerpo de conejo conjugado con peroxidasa, 1:5000 en 0.1% de TTBS), y se incubó a temperatura ambiente 45 min. Se retiró la disolución del anticuerpo secundario, se lavó cada membrana con 0.1 % de TTBS (3 x 10 min) y se reveló cada una usando un sistema de detección por quimioluminiscencia (ECL Santa Cruz Biotechnology, EEUU).

3.4 Bibliografía

- (1) Blanpain, C. *Nat. Cell Biol.*, **2013**, *15*, 126.
- (2) Perez-Soler, R.; Chachoua, A.; Hammond, L. A.; Rowinsky, E. K.; Huberman, M.; Karp, D.; Rigas, J.; Clark, G. M.; Santabarbara, P.; Bonomi, P. *J. Clin. Oncol.*, **2004**, *22*, 3238.
- (3) Hanahan, D.; Weinberg, R. A. *Cell*, **2011**, *144*, 646.
- (4) Urruticoechea, A.; Alemany, R.; Balart, J.; Villanueva, A.; Vinals, F.; Capella, G. *Curr. Pharm. Des.*, **2010**, *16*, 3.
- (5) Varetti, G.; Musacchio, A. *Curr. Biol.*, **2008**, *18*, R591.
- (6) Williams, G. H.; Stoeber, K. *J. Pathol.*, **2012**, *226*, 352.
- (7) Singhal, S.; Vachani, A.; Antin-Ozerkis, D.; Kaiser, L. R.; Albelda, S. M. *Clin. Cancer Res.*, **2005**, *11*, 3974.
- (8) Johnstone, T. C.; Park, G. Y.; Lippard, S. J. *AntiCancer Res.*, **2014**, *34*, 471.
- (9) Siddik, Z. H. *Oncogene*, **2003**, *22*, 7265.
- (10) Kerr, J. F.; Wyllie, A. H.; Currie, A. R. *Br. J. Cancer*, **1972**, *26*, 239.
- (11) Norbury, C. J.; Hickson, I. D. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **2001**, *41*, 367.
- (12) Conti, A. C.; Raghupathi, R.; Trojanowski, J. Q.; McIntosh, T. K. *J. Neurosci.*, **1998**, *18*, 5663.
- (13) Miura, M. *Cold. Spring. Harb. Perspect. Biol.*, **2012**, *4*, a008664.
- (14) Olsson, M.; Zhivotovsky, B. *Cell Death Differ.*, **2011**, *18*, 1441.
- (15) McIlwain, D. R.; Berger, T.; Mak, T. W. *Cold. Spring. Harb. Perspect. Biol.*, **2013**, *5*, a008656.
- (16) Ame, J. C.; Spenlehauer, C.; de Murcia, G. *Bioessays*, **2004**, *26*, 882.
- (17) Fischer, U.; Janicke, R. U.; Schulze-Osthoff, K. *Cell Death Differ.*, **2003**, *10*, 76.
- (18) Kaufmann, S. H.; Desnoyers, S.; Ottaviano, Y.; Davidson, N. E.; Poirier, G. G. *Cancer Res.*, **1993**, *53*, 3976.
- (19) Chaitanya, G. V.; Alexander, J. S.; Babu, P. P. *J. Cell Commun. Signal*, **2010**, *8*, 31.
- (20) Amaral, J. D.; Xavier, J. M.; Steer, C. J.; Rodrigues, C. M. *Discov Med.*, **2010**, *9*, 145.
- (21) Shi, D.; Gu, W. *Genes Cancer*, **2012**, *3*, 240.
- (22) Vekris, A.; Meynard, D.; Haaz, M. C.; Bayssas, M.; Bonnet, J.; Robert, J. *Cancer Res.*, **2004**, *64*, 356.
- (23) Pestell, K. E.; Hobbs, S. M.; Titley, J. C.; Kelland, L. R.; Walton, M. I. *Mol. Pharmacol.*, **2000**, *57*, 503.
- (24) Fan, J.; Bertino, J. R. *Mol. Pharmacol.*, **1999**, *56*, 966.
- (25) Zamble, D. B.; Jacks, T.; Lippard, S. J. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **1998**, *95*, 6163.
- (26) Alvarez-Valdes, A.; Perez, J. M.; Lopez-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.
- (27) Montero, E. I.; Diaz, S.; Gonzalez-Vadillo, A. M.; Perez, J. M.; Alonso, C.; Navarro-Ranninger, C. *J. Med. Chem.*, **1999**, *42*, 4264.
- (28) Messori, L.; Cubo, L.; Gabbiani, C.; Álvarez-Valdés, A.; Michelucci, E.; Pieraccini, G.; Ríos-Luci, C.; León, L. G.; Padrón, J. M.; Navarro-Ranninger, C.; Casini, A.; Quiroga, A. G. *Inorg. Chem.*, **2012**, *51*, 1717.
- (29) 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.
- (30) Pesch, F. J.; Wienken, M.; Preut, H.; Tenten, A.; Lippert, B. *Inorg. Chim. Acta*, **1992**, *197*, 243.
- (31) Shamsuddin, S.; Ali, M. S.; Whitmire, K. H.; Khokhar, A. R. *Polyhedron*, **2007**, *26*, 637.

(32) Gregory, M. T.; Park, G. Y.; Johnstone, T. C.; Lee, Y. S.; Yang, W.; Lippard, S. J. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **2014**, *111*, 9133.

(33) Riddell, I. A.; Johnstone, T. C.; Park, G. Y.; Lippard, S. J. *Chemistry*, **2016**, *22*, 7574.

(34) Perlstein, J. J. *Am. Chem. Soc.*, **2001**, *123*, 191.

(35) 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.

Capítulo 4. Complejos de Pt^{IV} con ligandos naftalimida

En este capítulo se describe la síntesis y caracterización de una serie de complejos *trans* de Pt^{IV} con ligandos intercalantes naftalimida, estudiando si una posible combinación sinérgica del Pt en su mayor estado de oxidación y de estos ligandos, puede aumentar la capacidad antitumoral de los precursores de Pt^{II}. Se han realizado sus estudios de estabilidad en distintos medios, de su actividad antiproliferativa, así como de su mecanismo de acción frente al ADN en presencia de agentes reductores biológicos.

4.1 Introducción

4.1.1 Antecedentes

En el capítulo 1 de esta tesis doctoral se introducen las ventajas e inconvenientes del cisplatino, y se pone de manifiesto cómo la síntesis de complejos de Pt que puedan superar sus limitaciones sigue siendo un campo emergente¹.

Una de las aproximaciones más utilizadas y prometedoras en el desarrollo de nuevos metalofármacos con potencial antitumoral es la oxidación² de complejos de Pt^{II} a complejos de Pt^{IV}. Rosenberg y colaboradores ya mencionaron que ciertos complejos de Pt^{IV} presentaban interesantes propiedades anticancerígenas^{3,4}. A diferencia de los complejos de Pt^{II}, de geometría plano-cuadrada, los de Pt^{IV} adoptan una geometría octaédrica, lo que supone la incorporación de dos sitios adicionales de coordinación en torno al centro metálico. Esto hace que dichos complejos sean cinéticamente más inertes, ya que la esfera de coordinación es más resistente a las reacciones de sustitución de ligandos. Así, se minimizan las reacciones secundarias con biomoléculas antes de llegar a la diana principal, el ADN¹.

Dado que estos complejos tienen una baja velocidad de intercambio de sus ligandos, la cuestión que se planteó fue la determinación de su mecanismo de acción, y de cómo podían ser activados *in vivo* para poder así ejercer su actividad antitumoral⁵. Se considera a los complejos de Pt^{IV} como profármacos que se pueden administrar oralmente¹, y se activan por reducción a sus análogos de Pt^{II}, tal y como se muestra en la Figura 4.1.

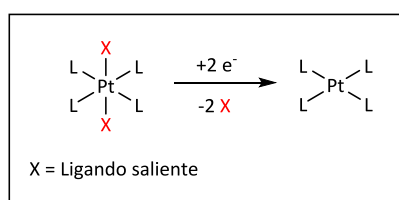


Figura 4.1. Reducción de un complejo de Pt^{IV} a uno de Pt^{II}.

4.1.2 Complejos de Pt^{IV} en terapia antitumoral

El creciente interés por desarrollar fármacos activos de Pt que puedan ser administrados oralmente y que mejoren la calidad de vida del paciente, ha estimulado la investigación y desarrollo de metalofármacos de Pt^{IV}. La actividad anticancerígena del complejo *cis*-[PtCl₄(NH₃)₂] se conoce ya desde el descubrimiento serendípico del cisplatino^{3,4} y, aunque desde hace décadas se han sintetizado y testado multitud de complejos de Pt^{IV}, tan sólo unos pocos han logrado entrar en fases clínicas. El iproplatino (CHIP, JM9, *cis,trans,cis*-(dicloro-dihidroxo-diisopropilamina)platino(IV)) (Figura 4.2) fue seleccionado de entre un amplio rango de complejos de Pt^{IV} por Tobe y colaboradores por su gran solubilidad⁶, y alcanzó ensayos clínicos de las fases II y III por presentar buena tolerancia y absorción en el organismo⁷. Sin embargo, no se extendió a un uso clínico general⁸, ya que presentaba menor actividad que el cisplatino. El tetraplatino (ormaplatino, [PtCl₄(DACH)]) (Figura 4.2) mostró inicialmente resultados prometedores en estudios preclínicos, aunque fue posteriormente descartado en fase I al provocar neurotoxicidad severa en los pacientes⁹. El oxoplatino (*cis,cis,trans*-(diamino-dicloro-dihidroxo)platino(IV)) (Figura 4.2) presentó gran actividad antitumoral en diferentes líneas celulares, siendo más activo que el propio cisplatino en varias de ellas, aunque su estudio fue abandonado al comprobar que generaba necrosis severa en los túbulos distales de los riñones¹⁰. El satraplatino (JM216, (*trans,cis,cis*-bis(acetato)aminodicloro(ciclohexilamina)platino(IV)) (Figura 4.2) ha mostrado actividad frente a varias líneas celulares tumorales humanas resistentes a cisplatino y frente al cáncer de próstata refractario, por lo que ha llegado a la fase III, lográndose grandes avances^{11,12} hasta los últimos datos publicados del 2013¹³.

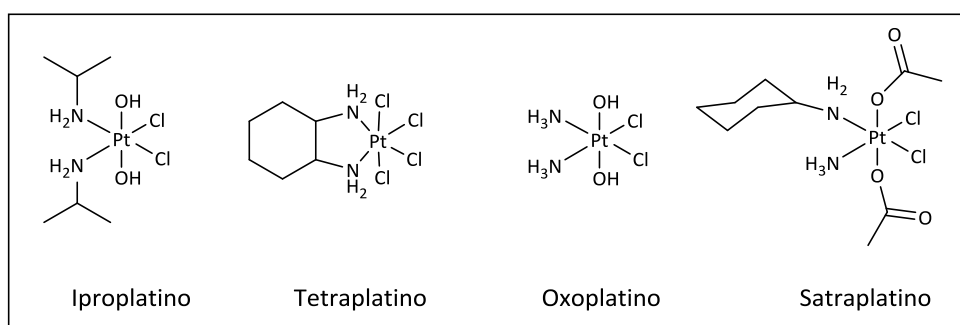


Figura 4.2. Complejos antitumorales de Pt^{IV} que han entrado en fases clínicas.

Otro complejo de Pt^{IV} que ha mostrado actividad antitumoral es LA-12, en cuya estructura hay un ligando 1-adamantilamina¹⁴. Este complejo presenta una gran lipofiliidad y resulta ser muy

activo en diversas líneas celulares tumorales tanto sensibles como resistentes al cisplatino. No presenta resistencia cruzada y sus aductos con el ADN son más complejos de reparar que en el caso del cisplatino¹⁵, aunque no se conocen datos en triadas clínicas.

Hay pocos ejemplos en la bibliografía de complejos de Pt^{IV} no convencionales en clínica, como por ejemplo, los de isomería *trans*. El complejo JM335 ((*trans,trans,trans*-[PtCl₂(OH)₂(C₆H₁₁NH₂)(NH₃)])) fue la primera especie *trans* de Pt^{IV} que mostró actividad antitumoral frente a distintos tipos de tumores humanos de ovario tanto sensibles como resistentes al cisplatino¹⁶. Navarro-Ranninger y colaboradores¹⁷ estudiaron las propiedades antitumorales y farmacológicas de un complejo *trans* de Pt^{IV} con aminas alifáticas en su estructura ((*trans*-[dicloro-dihidroxo-isopropilamina-dimetilamina platino(IV)])), obteniendo resultados muy satisfactorios tanto *in vivo* como *in vitro*.

4.1.3 Mecanismo de acción y reducción de los complejos de Pt^{IV}

Los complejos de Pt^{IV} alteran sus propiedades farmacocinéticas con respecto a las especies de Pt^{II}, como son la lipofilia, estabilidad redox, internalización celular y resistencia a las condiciones químicas existentes en el estómago¹⁸, por lo que pueden ser administrados oralmente.

La reactividad de los complejos de Pt^{IV} frente al ADN y otras biomoléculas depende esencialmente de la velocidad de sustitución de sus ligandos y de su potencial de reducción. Aunque los complejos de Pt^{IV} pueden metalar al ADN, la formación de lesiones citotóxicas por sustitución de ligandos dura semanas¹⁹. Así, el estudio de la interacción directa entre estos complejos y biomoléculas no presenta relevancia en clínica. Por tanto, la reducción del Pt^{IV} a Pt^{II}, con pérdida de dos ligandos del complejo, parece esencial para la actividad antitumoral de estos agentes. El mecanismo canónico de reducción involucra la pérdida de los dos ligandos en posición axial, tal y como se mostraba en la Figura 4.1. La forma divalente resultante es la que se une al ADN, inhibe los procesos de replicación y transcripción, e induce la muerte celular por apoptosis¹.

El proceso de reducción depende de la estructura del complejo de Pt^{IV}, así como de la naturaleza del agente biológico reductor presente en el medio.

1) Los primeros estudios de estructura-actividad mostraron que la naturaleza de los ligandos axiales tiene una influencia mayor en los radios de reducción que los ligandos ecuatoriales²⁰. En complejos de fórmula *cis*-[Pt(en)Cl₂X₂] (en = etilendiamina), donde X es un ligando axial aniónico, las especies cloruro eran más susceptibles a la reducción que los derivados carboxilato ó hidroxilo. Variaciones sistemáticas de ligandos amina ecuatoriales en complejos de fórmula general *cis*-

[PtCl₄(NHR₂)₂], donde R = alquilo ó grupos aromáticos hidrocarbonados, no tuvieron un efecto considerable en las velocidades de reducción¹.

2) La reducción de complejos de Pt^{IV} por moléculas pequeñas como ácido ascórbico (ASA) o glutatión (GSH) pueden ocurrir por mecanismos de transferencia electrónica de esfera interna ó externa^{21,22}. Como la transferencia electrónica de esfera interna requiere la formación de un puente entre las especies participantes (complejo y agente reductor), los complejos de Pt^{IV} con ligandos cloruro ó hidroxilo en posición *trans* a un buen grupo saliente son adecuados para ser reducidos por este mecanismo²³. Los procesos bimoleculares de transferencia electrónica de esfera externa son generalmente menos frecuentes que los de esfera interna, pero pueden generar un proceso de reducción viable en complejos de Pt^{IV} con ligandos capaces de formar puentes con agentes reductores en posición *trans* a los mismos²³.

Recientemente, experimentos de reducción de un complejo de Pt^{IV} (*cis*-[PtCl₂(CH₃CO₂)₂(NH₃)(Am)]) demostraron la formación de otras especies de Pt^{II} en el medio, además de la esperada por pérdida de los dos ligandos axiales acetato²⁴, como se muestra en la Figura 4.3:

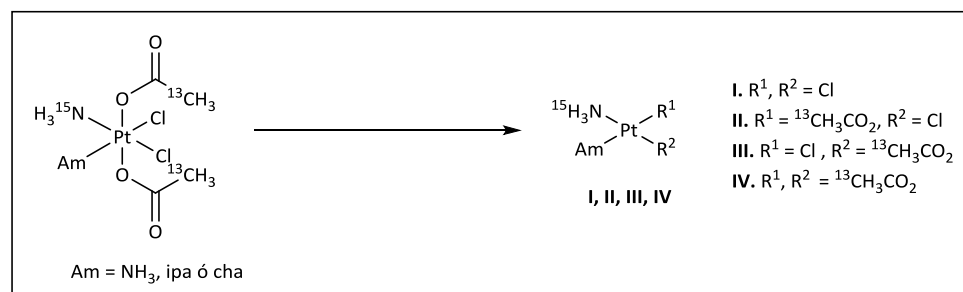


Figura 4.3. Productos de reducción del complejo *cis*-[PtCl₂(CH₃CO₂)₂(NH₃)(Am)]²⁴.

La reducción de este complejo procedía por varias vías: vía con pérdida de los dos ligandos axiales, pérdida de uno axial (acetato) y otro ecuatorial (cloruro), y con pérdida de los dos ligandos ecuatoriales, originando las especies I-IV.

Este experimento indica que la reducción de profármacos de Pt^{IV} con ligandos acetato axiales puede generar diversos productos²⁴, con lo que se propone la posibilidad de varias especies, además del precursor de Pt^{II}, abriendo un interesante campo de investigación.

4.1.4 Sustancias biológicas reductoras

En 1973, y como ya se mencionó antes, Cleare y Hoeschele²⁵ sugirieron que los complejos de Pt^{IV} podían ser reducidos en el medio biológico. Estudios recientes plantean que la composición del producto de reducción de Pt^{II} depende fuertemente de la naturaleza del agente reductor²⁴. Además, las cinéticas de la reducción intracelular del Pt^{IV} dependen del tipo de célula a la que llega el complejo y de la naturaleza de los ligandos²⁶, que pueden incluso activar las reacciones de acuación²⁷.

El **ácido ascórbico (AsA)** ó vitamina C es una sustancia presente en el citoplasma (50-150 μM) y en el citosol (~ 1mM) y es un agente reductor aceptor de 2 e⁻, capaz de reducir metales como Fe^{III}, Cu^{II} ó Pt^{IV}. Es la primera molécula antioxidante del organismo, está implicado en reciclamiento enzimático y formación de colágeno, y su deficiencia genera escorbuto²⁸. Como agente reductor, el monoanión ascorbato puede sufrir dos etapas de cesión de 1 e⁻ en cada una hasta generar el ácido dehidroascórbico como se muestra en la Figura 4.4A, pasando por un intermedio radicalico que fue observado por EPR a un pH > 4²⁹.

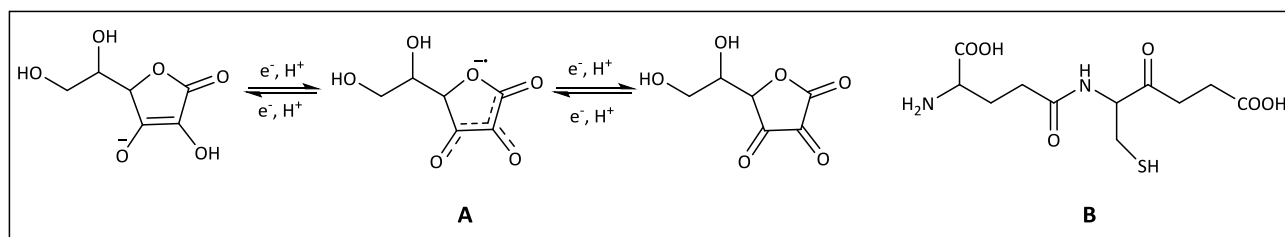
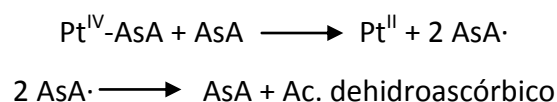


Figura 4.4. A) Reducción en dos etapas de cesión de 1 e⁻ del monoanión ascorbato, dominante a pH fisiológico. B) Estructura molecular del glutatión (GSH).

Se cree que la reducción de los complejos de Pt^{IV} por AsA podría tener lugar en una reacción de transferencia de 1 e⁻ en dos etapas por dos moléculas de AsA. Los radicales ascorbato generados podrían reaccionar después para formar una molécula de ascorbato y otra de ácido dehidroascórbico²⁸, como se muestra en los equilibrios siguientes:



El **glutatión** ó γ-glutamylcisteinilglycine (**GSH**) (Figura 4.4B) es un tripéptido que se encuentra a una concentración de 2 mM en el citosol y 850 μM en el plasma sanguíneo²⁸. Es una de las primeras

defensas frente a toxinas y agentes oxidantes presentes en la célula y puede desactivar drogas electrofílicas, incluidos los agentes antitumorales como el cisplatino. Este complejo se coordina al GSH, inactivándose, disminuyendo el número de especies activas que pueden llegar a coordinarse al ADN³⁰. El glutatión contiene un residuo tiol de cisteína y es un potente agente reductor capaz de aceptar 1 e⁻. Este grupo sulfhidrilo del GSH en presencia de un complejo de Pt^{IV} se oxida fácilmente y el valor que ha sido descrito del E° es de -240 mV a pH = 7.0, que está en el rango del potencial de oxidación de los complejos de Pt^{IV}, por encima de -1000 mV³¹.



4.1.5 Métodos de síntesis de complejos de Pt^{IV} en la actualidad

Uno de los mayores inconvenientes en la síntesis de complejos de Pt^{IV} es su baja reactividad, debido a la poca tendencia de los ligandos coordinados al centro metálico a sufrir reacciones de sustitución¹⁸. Por esta razón, en la mayoría de los casos, estos complejos de Pt^{IV} se obtienen por oxidación directa de la especie de Pt^{II}, por incorporación de dos ligandos en posición axial. En el esquema de la Figura 4.5 se muestran rutas de síntesis encontradas en la bibliografía y que resultaron fundamentales para el desarrollo de los complejos de Pt^{IV} como profármacos antitumorales.

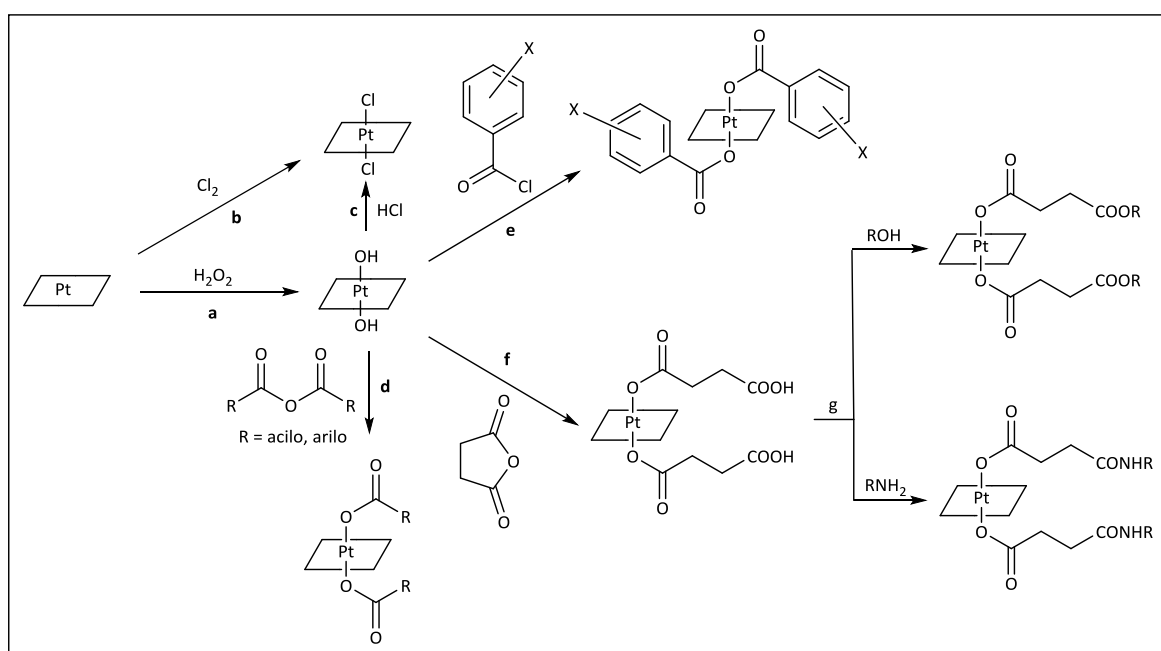


Figura 4.5. Representación esquemática de síntesis de complejos de Pt^{IV} por incorporación de ligandos axiales encontradas en la bibliografía: a³², b³³, c³¹, d³⁴, e³⁵, f³⁶.

Los complejos de Pt^{IV} con ligandos hidroxilo son generados tras oxidar la especie de Pt^{II} con H₂O₂ (Figura 4.5a), mientras que los de ligandos cloruro se incorporan a la esfera de coordinación del complejo por oxidación con Cl₂ ó por desplazamiento de los ligandos hidroxilo en HCl concentrado¹⁸ (Figura 4.5b y c, respectivamente). La carboxilación de los ligandos hidroxilo en posición axial usando anhídridos o cloruros de acilo (Figura 4.5d) fue iniciada por Kelland y Giandomenico³⁷ y abrió la posibilidad de transformar los ligandos en posición axial sin necesidad de proceder a su intercambio.

El grupo de la Prof. Navarro-Ranninger y colaboradores usó esta vía para incorporar anhídridos cíclicos abiertos en los ligandos hidroxilo³⁸, con grupos acetato terminales que permitían una reactividad posterior. Estudios posteriores han usado esta vía para introducir moléculas bioactivas en estos ligandos y estudiar si de esta manera se pueden aumentar sus propiedades farmacológicas¹.

4.1.6 Complejos de Pt^{IV} con actividad biológica

En todos los ejemplos descritos en el apartado 4.1.2, el complejo de Pt^{IV} sufre una reducción intracelular para generar la especie activa de Pt^{II}, liberando además dos ligandos que carecen de propiedades biológicas. Sin embargo, pronto surgió la idea de generar complejos de Pt^{IV} que incluyeran uno e incluso dos ligandos farmacológicamente activos en su estructura, originando así complejos con doble actividad biológica, y con el objetivo de minimizar la resistencia cruzada con la especie de Pt^{II} activa generada tras la reducción¹.

Lippard y colaboradores introdujeron moléculas de estrógeno a través de los grupos carboxilato situados en las posiciones axiales de un complejo de Pt^{IV} con un núcleo ecuatorial de cisplatino (Figura 4.7), para que este pudiera ser reconocido por el receptor positivo de estrógeno [ER(+)] de células de cáncer de mama. El complejo, tras sufrir reducción intracelular, libera cisplatino y dos moléculas de estradiol 3-benzoato, que generan una sobrerregulación de la proteína HMGB1, involucrada en el sistema de reparación NER³⁹. Dyson y colaboradores sintetizaron el etacraplatino (Figura 4.7), un complejo que también consta de un núcleo ecuatorial de cisplatino, coordinado a dos moléculas de ácido etacrínico en las posiciones axiales a través de los grupos carboxilato⁴⁰. El ácido etacrínico y su aducto con GSH son potentes inhibidores de la glutatión-S-transferasa (GST), una enzima que participa en la detoxificación de fármacos de Pt, catalizando su conjugación con GSH.

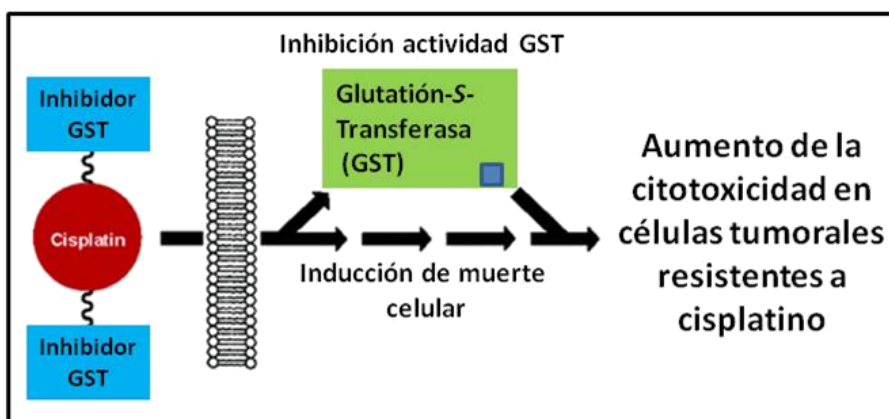


Figura 4.6. Mecanismo de inhibición de GST e inducción de muerte celular provocada por el etacraplatino⁴⁰.

Este complejo, al ser reducido en el medio intracelular, genera cisplatino y dos moléculas de ácido etacrínico, que inhiben a la GST y eliminan la resistencia al Pt, tal y como se muestra en el esquema de la Figura 4.6. El etacraplatino mostró una actividad antiproliferativa *in vitro* superior a la del cisplatino por sí solo, al inhibir a la GST y eliminar de esta manera la resistencia al cisplatino⁴⁰.

En un esfuerzo de promover la actividad de p53 y aumentar la eficacia del cisplatino, se generó chalcoplatino (Figura 4.7), formado por un núcleo ecuatorial de cisplatino y dos moléculas de chalcona en las posiciones axiales. La chalcona es una molécula que inhibe la interacción entre p53 y la proteína Mdm2, que es un inhibidor negativo de p53. Se comprobó que este complejo aumentaba significativamente la activación de p53, con el consecuente incremento de la apoptosis por la acción del cisplatino generado tras la reducción. El chalcoplatino induce una parada del ciclo celular distinta a la producida por el cisplatino y similar a la de la chalcona¹.

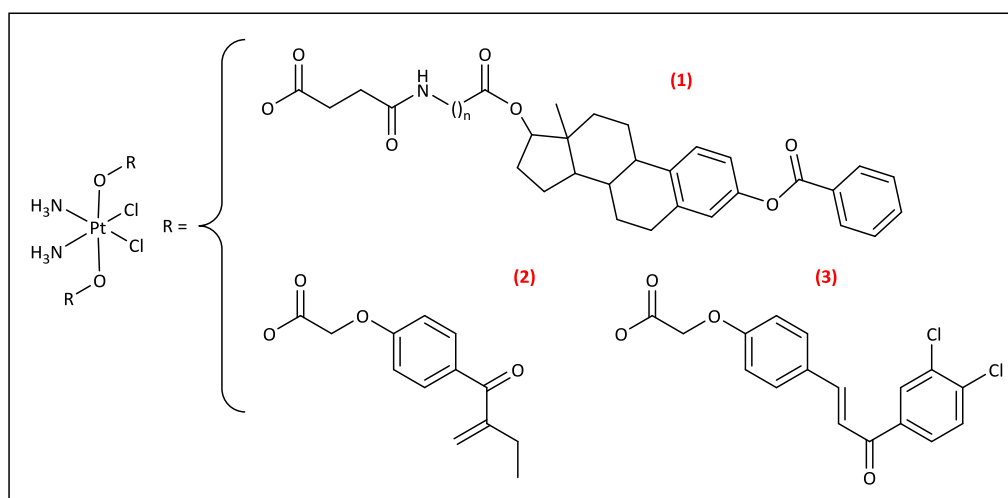


Figura 4.7. Estructura molecular de (1) complejo de Pt^{IV} con ligandos estrógeno, (2) etacraplatino, y (3) chalcoplatino.

Con estos ejemplos, se ponen de manifiesto los buenos resultados obtenidos en complejos de Pt^{IV} con ligandos biológicamente activos.

4.1.6.1 Ligandos naftalimida. Síntesis y mecanismo de acción.

Las naftalimidias son moléculas orgánicas capaces de unirse al ADN, presentando además, propiedades antitumorales, fluorescentes y antivirales⁴¹. Centrándonos en sus propiedades antitumorales, las 1,8-naftalimidias (benzo[de]isoquinolin-1,3-dionas), desarrolladas en la década de los 80, presentaron gran actividad anticancerígena frente a células tumorales humanas y de ratón⁴². Estas moléculas provienen de la reacción entre el correspondiente anhídrido 1,8-naftálico y una amina, como se muestra en la Figura 4.8. Esta reacción permite la obtención de una gran familia de derivados, entre los que se incluyen bis-naftalimidias, poliaminas y derivados de aminoácidos.

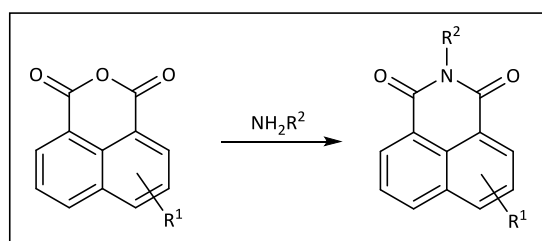


Figura 4.8. Esquema general de síntesis de 1,8-naftalimidias.

En el sistema aromático de la naftalimida pueden introducirse sustituyentes, lo que tiene impacto directo en sus propiedades biológicas, químicas, fotoquímicas y espectroscópicas. Por ejemplo, la introducción de un grupo amino en la posición 3 y de un grupo nitro en la posición 4 del sistema aromático genera los compuestos amonafida (3-amino-1,8-naftalimida) y mitonafida (3-nitro-1,8-naftalimida), respectivamente. Estos dos compuestos lograron entrar en ensayos clínicos de fase II por su gran potencial antitumoral en células tumorales HeLa^{42,43}. Además, la sal dihidrocloruro de amonafida desarrollada por *ChemGenexPharmaceuticals* también entró en ensayos de fase II bajo el nombre comercial de Quinamed®, para combatir el cáncer de próstata⁴¹.

Al estudiar la manera que tienen estos compuestos de unirse al ADN, se comprobó que eran capaces de estabilizar la doble hélice tras ser sometido a desnaturalización⁴³. Estas moléculas se unen al ADN por intercalación⁴¹, inhibiendo la actividad de la enzima Topoisomerasa II.

4.2 Resultados

4.2.1 Objetivos

El objetivo de este capítulo es la obtención de complejos de Pt^{IV} que mejoren la solubilidad, lipofilicidad y especificidad de los complejos *trans*-[PtCl₂(amina)(natalimida)], previamente publicados por nuestro grupo de investigación⁴⁴. Para ello nos propusimos primero su síntesis, usando Cl₂ y H₂O₂ como agentes oxidantes, para después proceder al estudio de la estabilidad de estos nuevos profármacos en distintos medios que mimeticen el medio biológico. Para demostrar sus mejoras farmacológicas, se procedió al estudio de su interacción con ADN plasmídico en ausencia y presencia de agentes reductores biológicos, mediante electroforesis en gel de agarosa, HPLC y RMN, además de la determinación de su actividad citotóxica.

4.2.2 Síntesis de ligandos, complejos *cis*-[PtCl₂(amina)₂] y complejos *trans*-[PtCl₂(amina)(L)] (L = abid, dibibi)

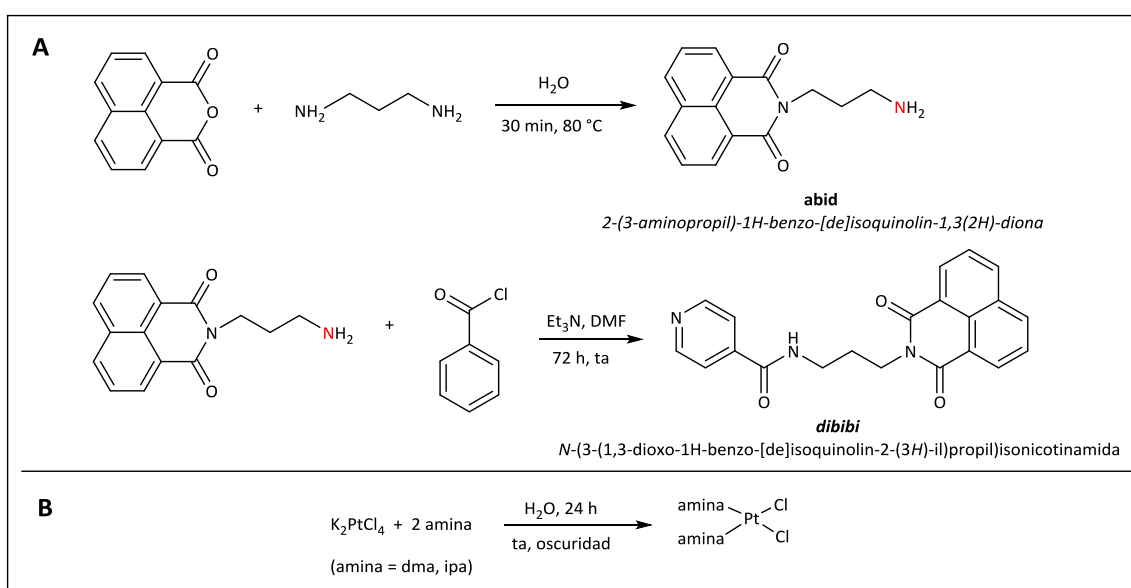


Figura 4.9. Esquema de la síntesis de: A) los ligandos y B) complejos *cis* de Pt^{II} precursores.

Para llevar a cabo la síntesis de los complejos *trans* de Pt^{IV} , fue necesario previamente la generación de los ligandos portadores de una naftalimida y un grupo ó átomo coordinante (N), unidos mediante un conector flexible (cadena alquílica, abid) o más rígido (anillo aromático, dibibi) (Figura 4.9A), así como de los complejos precursores *cis* de Pt^{II} de fórmula *cis*-[PtCl₂(amina)₂] (Figura 4.9B). Tanto los ligandos como los complejos de partida fueron caracterizados por las técnicas usuales.

A continuación, se sintetizaron los complejos *trans* de Pt^{II}, siguiendo el protocolo publicado por nuestro grupo de investigación⁴⁴, y que se muestra en la Figura 4.10:

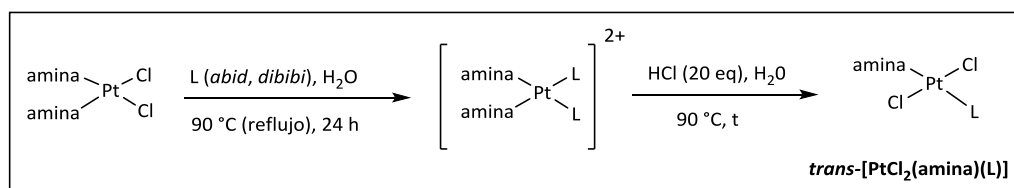


Figura 4.10. Síntesis de los complejos *trans*-[PtCl₂(amina)(L)] (amina = dma, ipa) (L = abid, dibibi).

Los cuatro complejos *trans* de Pt^{II} fueron caracterizados por las técnicas usuales. En los espectros de ¹H RMN, en general, las señales se desapantallan, siendo siempre las más afectadas las de los grupos más cercanos al lugar de coordinación. En todos los casos se realizaron experimentos bidimensional HMQC y ¹³C-RMN para su total caracterización, siendo de gran utilidad en los complejos con el ligando *abid*, ya que el H₃ (protón alifático del ligando *abid*) se ve solapado por la señal del disolvente deuterado (2.50 ppm).

4.2.3 Síntesis de los complejos *trans* de Pt^{IV}

Para obtener los complejos de Pt^{IV}, se procedió a la oxidación de los complejos *trans* de Pt^{II}. Una desventaja en la síntesis de complejos de Pt^{IV} no es la dificultad del procedimiento, sino como conseguirlos en la pureza necesaria. Para obtener complejos de Pt^{IV}, la estrategia química más usada es la oxidación de las correspondientes especies de Pt^{II} usando Cl₂ y H₂O₂,²⁴ que son los agentes oxidantes que utilizamos en este capítulo (Figura 4.11).

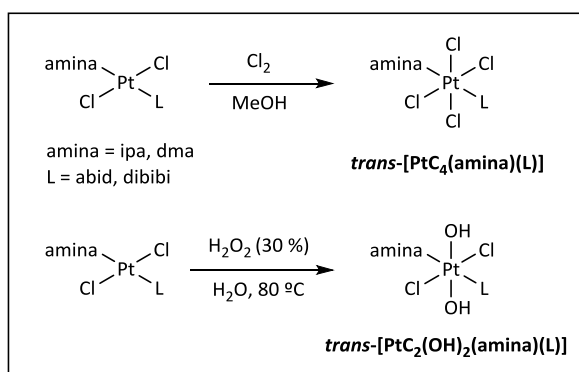


Figura 4.11. Condiciones de reacción para la obtención de los complejos *trans* de Pt^{IV}.

Esperábamos que la introducción de dos ligandos adicionales cloruro ó hidroxilo en la estructura facilitase la entrada de los complejos en la célula cancerosa, permitiendo así su acumulación en la misma y aumentando su capacidad citotóxica.

4.2.3.1 Oxidación con Cl₂

Para lograr la oxidación de estos complejos con Cl₂ (g) se realizó un estudio sistemático de las condiciones de reacción, ya que en algunos casos la oxidación resulta demasiado lenta, generando una especiación tal que el proceso de purificación es muy tedioso y en la mayoría de los casos, inviable. Tras probar la oxidación con Cl₂ en distintos disolventes, encontramos que el metanol es el que permitía la oxidación más favorecida de estos complejos, frente a otros como disolventes como agua o cloroformo. En todos los casos, la disolución pasa de un color amarillo pálido a una coloración amarilla intensa. Aunque el cambio de coloración es prácticamente inmediato tras la adición de la corriente de Cl₂, se hizo necesario prolongar la reacción entre 3 y 5 h (dependiendo del complejo) para poder aislar el complejo final. El tiempo de reacción es de gran importancia, puesto que tiempos de reacción excesivamente largos dan lugar a la formación de diversos subproductos que complican el proceso de purificación.

De esta manera, se lograron obtener los complejos *trans*-[PtCl₄(abid)(ipa)] (**Pt^{IV}-1a**), *trans*-[PtCl₄(abid)(dma)] (**Pt^{IV}-1b**), *trans*-[PtCl₄(dibibi)(ipa)] (**Pt^{IV}-2a**) y *trans*-[PtCl₄(dibibi)(dma)] (**Pt^{IV}-2b**), con rendimientos que van del 38 al 67%. Todos se caracterizaron por análisis químico elemental, espectroscopía ¹H RMN, ¹³C RMN, ¹⁹⁵Pt RMN y las técnicas espectroscópicas bidimensionales HMQC y HMBC. Las variaciones observadas por ¹H RMN y ¹⁹⁵Pt RMN entre las especies de Pt^{IV} y los análogos de Pt^{II} se muestran en la Tabla 4.1. Fijándonos en la variación de las señales de los protones alifáticos más próximos al centro metálico, se aprecia cómo el cambio en el estado de oxidación del mismo genera un desapantallamiento de estas señales en todos los complejos de Pt^{IV}.

Tabla 4.1. Comparación de los desplazamientos químicos en ^1H RMN y ^{195}Pt RMN de los complejos de Pt^{IV} y Pt^{II} .

Complejos	^1H RMN		^{195}Pt RMN
	ipa	dma	
	-CH/-(CH ₃) ₂	-(CH ₃) ₂	
<i>trans</i> -[PtCl ₄ (abid)(ipa)] (Pt^{IV}-1a)	3.21-3.14 / 1.24		-211.7
<i>trans</i> -[PtCl ₄ (abid)(dma)] (Pt^{IV}-1b)		2.75	-302.2
<i>trans</i> -[PtCl ₄ (dibibi)(ipa)] (Pt^{IV}-2a)	3.36 / 1.33		-155.7
<i>trans</i> -[PtCl ₄ (dibibi)(dma)] (Pt^{IV}-2b)		2.53	-162.7
<i>trans</i> -[PtCl ₂ (abid)(ipa)] (Pt^{II}-1a)	3.08-2.95 / 1.16		-2194
<i>trans</i> -[PtCl ₂ (abid)(dma)] (Pt^{II}-1b)		2.34	-2192
<i>trans</i> -[PtCl ₂ (dibibi)(ipa)] (Pt^{II}-2a)	3.17-3.05 / 1.25		-2065
<i>trans</i> -[PtCl ₂ (dibibi)(dma)] (Pt^{II}-2b)		2.41	-2046

La técnica de ^{195}Pt RMN es de especial importancia en la caracterización, ya que confirma el estado de oxidación del metal (Pt^{IV}) y, además, el entorno químico que rodea al núcleo, en nuestro caso $\text{Pt}^{\text{IV}}\text{N}_2\text{Cl}_4$. En el esquema de la Figura 4.12 se recogen los rangos de δ (^{195}Pt RMN) en ppm publicados⁴⁵ para complejos de Pt^0 , Pt^{II} y Pt^{IV} . Estos rangos incluyen los diferentes δ en los que pueden aparecer dichos estados de oxidación producidos por factores tales como: la naturaleza y efectos estéricos del ligando y los cambios estructurales causados por variaciones en la temperatura⁴⁵. En nuestro caso, mientras que los complejos de $\text{Pt}^{\text{II}}\text{Cl}_2\text{N}_2$ recogidos en la Figura 4.12 presentan señales en el rango de δ entre -2000 y -2200 ppm, los complejos de $\text{Pt}^{\text{IV}}\text{Cl}_4\text{N}_2$ aparecen en un rango entre -150 y -210. Esto supone un cambio en torno a -2000 ppm que nos permite confirmar que el proceso de oxidación ha sido efectivo en todos ellos.

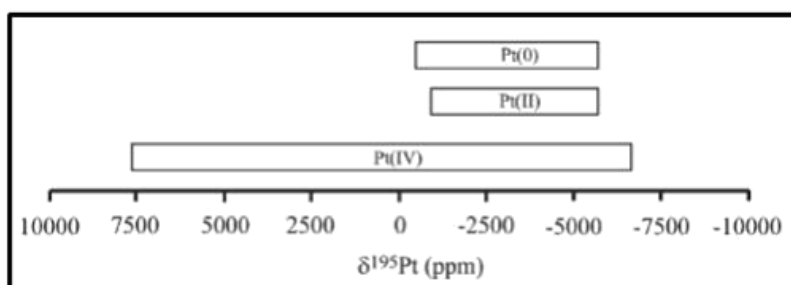


Figura 4.12. Rango general de δ ^{195}Pt RMN para los distintos estados de oxidación del Pt^{45} .

4.2.3.2 Oxidación con H₂O₂

Al intentar oxidar los complejos de Pt^{II} empleando H₂O₂, nos encontramos con que es un proceso bastante lento y tedioso. Ensayamos con diferentes temperaturas y tiempos de reacción para conseguir las condiciones óptimas, sin resultados positivos. Por ejemplo, en el caso del complejo **Pt^{II}-1a**, se llevó a cabo su oxidación en oscuridad durante 4, 6 y 16 h en agua a 80 °C, usando desde 10 a 20 equivalentes de H₂O₂, pero el espectro de ¹H RMN muestra la presencia del complejo de Pt^{II} de partida y un nuevo compuesto, posiblemente de Pt^{IV}, indicando que en ambos casos coexisten las dos especies en disolución. Esta misma dificultad se experimentó en la oxidación del complejo **Pt^{II}-2b**, que aunque la oxidación con Cl₂ es la más sencilla, con H₂O₂ dio la misma mezcla de dos especies prácticamente inseparables, ya que tenían una solubilidad tan parecida que no pudieron ser separadas, por lo que se decidió abandonar esta síntesis.

4.2.4 Estudios de la estabilidad de los complejos de Pt^{IV}

Es de gran importancia realizar estudios de la estabilidad de metalofármacos tanto en el disolvente orgánico en el que se preparan las muestras para realizar los ensayos biológicos, como en disoluciones acuosas tamponadas que mimetizan los medios habituales de la administración de fármacos. También se pueden llevar a cabo estudios de estabilidad en medios más complejos que puedan simular un medio extra ó intracelular, con el fin de poder comprobar si realmente son buenos candidatos para entrar en terapia antitumoral. En nuestro caso, la comparación de los datos obtenidos para los complejos de Pt^{IV} frente a sus análogos de Pt^{II} nos proporcionó una clara evidencia de cuál de ambas especies era más estable en disolución.

Los estudios de estabilidad de los complejos de Pt^{IV} se realizaron mediante la técnica de HPLC (High Performance Liquid Chromatography). Elegimos las disoluciones de DMSO, NaCl y PBS. La estabilidad de un complejo en DMSO se realiza analizando cuánto tiempo tardan las moléculas del complejo de Pt en desaparecer de la disolución. El PBS es una solución acuosa y salina que contiene NaCl, Na₃PO₄, KCl y K₃PO₄ y cuya osmolaridad y concentración de iones es muy semejante a la del líquido extracelular de los mamíferos. Además, es isotónica (la concentración del soluto es igual dentro y fuera de la célula) y no tóxica para las células, con pH = 7.4. Todas estas características le convierten en un buen candidato para simular el medio extracelular y poder estudiar así la estabilidad de un complejo en este medio, por interacción de este con los aniones fosfato del PBS. Por último, el NaCl es la sal principal entre los constituyentes de los líquidos del compartimento extracelular del organismo y se utiliza como diluyente de fármacos para administración parenteral.

Por esta razón, cuanto más estable sea un medicamento en una disolución de NaCl, mejor candidato para que éste pueda ser administrado en el organismo por esta vía.

4.2.4.1 Estabilidad en DMSO

La estabilidad de los complejos de Pt^{IV} en DMSO se registró a 0, 2, 4, 24 h y hasta 1 semana, comparándose con la de sus análogos de Pt^{II} ⁴⁴, y los datos se muestran en la gráfica de la Figura 4.13. Cada valor de estabilidad se expresa como la cantidad de complejo que permanece inalterado con el tiempo, considerando la cantidad inicial de complejo inalterado (t = 0 h) del 100%.

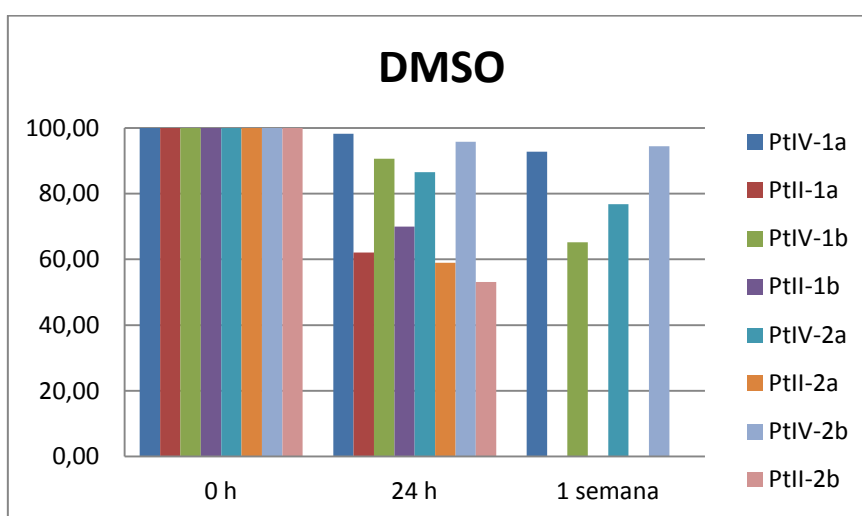


Figura 4.13. Valores de estabilidad de los complejos de Pt^{IV} y Pt^{II} 1a-2b en DMSO.

La estabilidad de las especies de Pt^{IV} en DMSO es muy alta, con valores comprendidos entre el 65% (Pt^{IV}-1b) y 94% (Pt^{IV}-2b) tras una semana. Todos los valores son superiores a los de los complejos de Pt^{II} tras 24 h, lo que confirmó la hipótesis de la gran estabilidad de estos profármacos, más inertes químicamente que sus análogos de Pt^{II}. Cabe destacar la gran estabilidad de los complejos Pt^{IV}-1a y 2b, con valores superiores al 90% de complejo inalterado después una semana en DMSO.

4.2.4.2 Estabilidad en PBS y NaCl

Los valores de estabilidad de los complejos de Pt^{IV}-1a-2b en PBS (pH 7.4) Y NaCl (0.9%) de 0 a 24 h se muestran en la Figura 4.14. Los complejos son estables en los dos medios, aunque los valores de estabilidad presentan algunas diferencias. En PBS, los cuatro complejos de Pt^{IV} son estables hasta las 5 h, siendo el patrón de estabilidad similar. Únicamente, después de 24 h, la

cantidad de complejo intacto disminuye hasta valores entre 44% (**Pt^{IV}-1a**) y 55% (**Pt^{IV}-2b**). El complejo **Pt^{IV}-2b** el que muestra la estabilidad más alta, como ya ocurría en DMSO. En disolución acuosa con NaCl, los cuatro complejos tienen mayor estabilidad, aunque más variable, ya que tras 24 h, los valores oscilan desde un 28% (**Pt^{IV}-1b**) hasta un 67% (**Pt^{IV}-2a**).

Con estos datos, confirmamos la gran estabilidad de los complejos de Pt^{IV} en disolución acuosa, con la única excepción del complejo **Pt^{IV}-1b** en NaCl tras 24 h. No obstante, muestran una estabilidad superior a la de sus análogos de Pt^{II} en estas dos disoluciones⁴⁴.

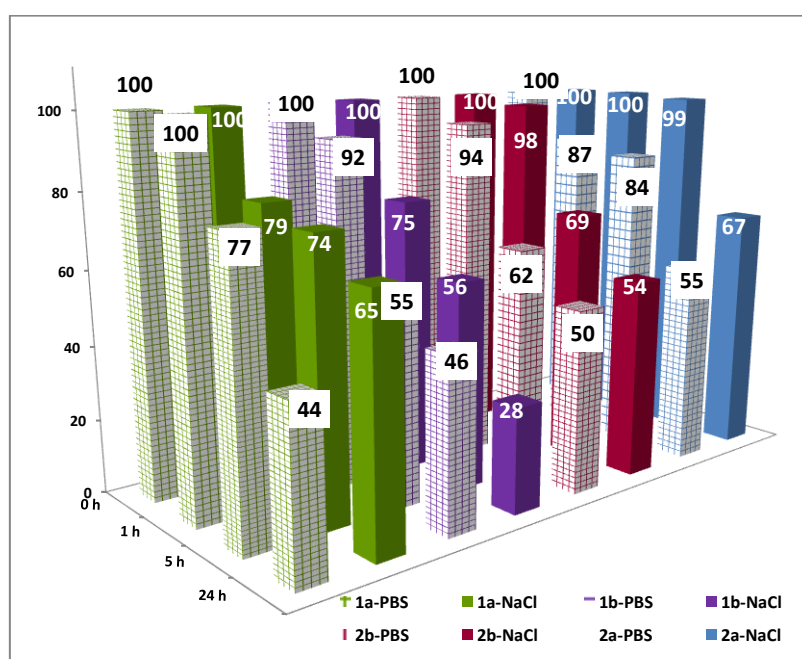


Figura 4.14. Valores de estabilidad de los complejos de Pt^{IV} 1a-2b en PBS y NaCl.

Podemos considerar que los cuatro complejos de Pt^{IV} mejoran su estabilidad farmacológica frente a sus análogos de Pt^{II}. También hay que destacar que en ninguno de los cromatogramas obtenidos se detectó el pico correspondiente a la especie de Pt^{II}, por lo que los complejos no sufren el proceso de reducción en ninguno de los medios ensayados.

4.2.5 Interacción de los complejos de Pt^{IV} frente al ADN del plásmido pBR322 y reactividad en presencia de reductores biológicos

Para realizar la evaluación de la interacción de los complejos de Pt^{IV} frente al ADN, usamos como modelo el plásmido pBR322. En un trabajo anterior⁴⁴, nuestro grupo de investigación comprobó que los análogos de Pt^{II} interaccionaban formando aductos con el ADN del plásmido

ϕ X174 y, además, demostraron su capacidad intercalante en un ensayo de competición con cloroquina.

La reducción de complejos de Pt^{IV} origina generalmente la especie análoga de Pt^{II} . Sin embargo, se ha demostrado en estudios recientes la presencia de otras especies en el medio que interactúan con el ADN plasmídico de forma diferente^{5,46}. Por esta razón y con el objetivo de identificar si nuestros complejos de Pt^{IV} se reducían a sus análogos de Pt^{II} , se estudió su interacción frente al ADN plasmídico en ausencia y presencia de los agentes reductores biológicos AsA (1:1) y GSH (1:2 complejo:GSH).

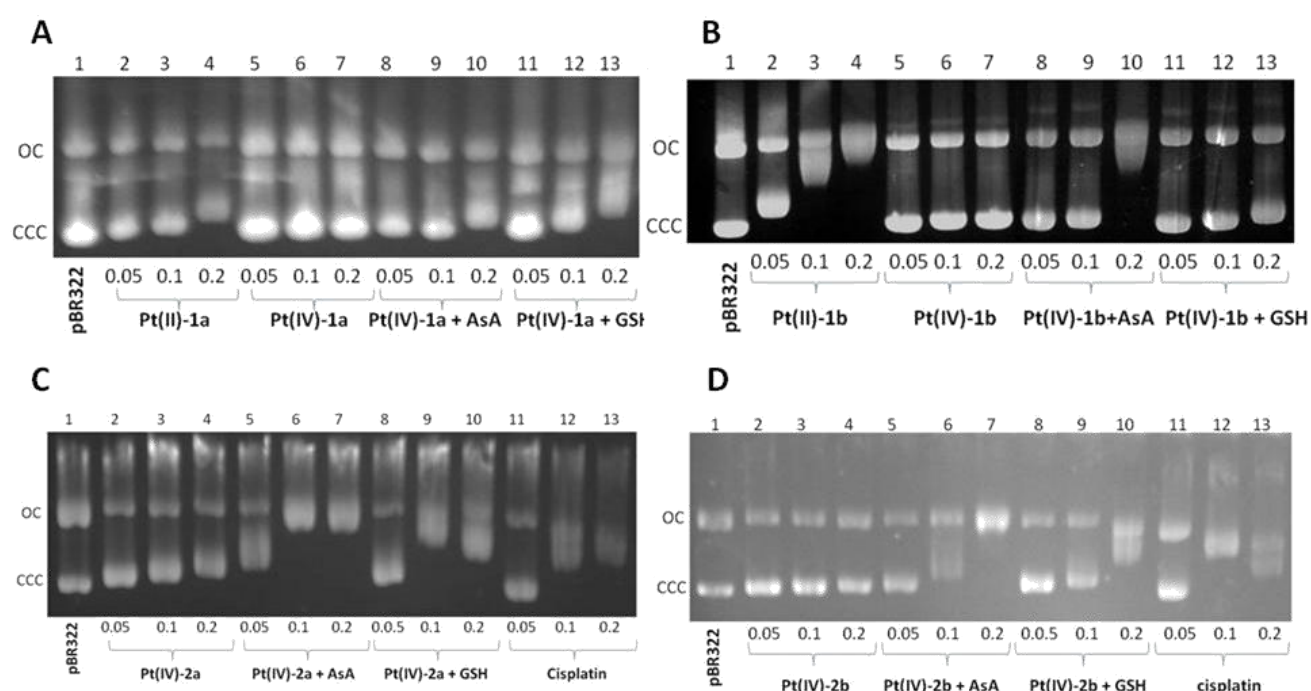


Figura 4.15. Electroforesis en geles de agarosa del ADN plasmídico pBR322 incubado a $r_i = 0.05, 0.1$ y 0.2 con los complejos Pt^{II} -1a y Pt^{II} -1b (líneas 2-4, geles A y B, respectivamente); Pt^{IV} -1a y Pt^{IV} -1b (líneas 5-7, geles A y B respectivamente); Pt^{IV} -1a y Pt^{IV} -1b con AsA (1:1) (líneas 8-10, geles A y B, respectivamente) y con GSH (1:2) (líneas 11-13, geles A y B, respectivamente); Pt^{IV} -2a y Pt^{IV} -2b (líneas 2-4, geles C y D, respectivamente); Pt^{IV} -2a y Pt^{IV} -2b con AsA (1:1) (líneas 5-7, geles C y D, respectivamente) y con GSH (1:2) (líneas 8-10, geles C y D, respectivamente); y cisplatino (líneas 11-13, geles C y D, respectivamente). línea 1 geles A, B, C y D: plásmido sin modificar.

Tras 24 horas de incubación, ninguno de los complejos de Pt^{IV} presentó interacción con el plásmido a las concentraciones ensayadas ($r_i = 0.05, 0.1$ y 0.2) (Figura 4.15, líneas 5-7 geles A y B, líneas 2-4 geles C y D), lo que resulta lógico, puesto que no se han descrito interacciones entre complejos de Pt^{IV} y ADN plasmídico^{5,47}. Únicamente el complejo Pt^{IV} -2a mostró una débil interacción con la forma CCC a $r_i = 0.2$. Se observa que la incubación de los cuatro complejos de Pt^{IV} en presencia de AsA y GSH provocó alteraciones en la movilidad de las dos isoformas, como resultado de su reducción a las especies de Pt^{II} .

Las variaciones en la movilidad electroforética son más pronunciadas cuando el ADN se incubaba con los complejos **Pt^{IV}-1b**, **Pt^{IV}-2a** y **Pt^{IV}-2b** (Figura 4.15, geles B, C y D, respectivamente), porque las especies análogas de Pt^{II} tienen una interacción más fuerte con el plásmido, similar al perfil de interacción del cisplatino (Figura 4.16, geles A y B para los complejos **Pt^{II}-2a** y **Pt^{II}-2b**, respectivamente). El complejo **Pt^{IV}-1a** (gel A, Figura 4.15) mostró una variación más débil en la movilidad de la forma CCC en presencia de los dos reductores. Sin embargo, es probable que haya reducción, porque este fenómeno concuerda con la pequeña interacción que el complejo **Pt^{II}-1a** (Figura 4.15, gel A, líneas 2-4) tiene con el ADN. Comparando la incubación del complejo **Pt^{IV}-1a** con AsA (Figura 4.15, gel A, líneas 8-10) y GSH (Figura 4.15, gel A, líneas 11-13), comprobamos que interacciona más intensamente con la forma CCC en presencia de GSH, al contrario que los otros tres complejos de Pt^{IV}, cuya reducción parece ser más rápida en presencia de AsA.

Los cambios producidos en la movilidad del ADN tras incubarlo con las especies **Pt^{IV}-1b**, **Pt^{IV}-2a** y **Pt^{IV}-2b** con los dos reductores (Figura 4.15, geles B, C y D, respectivamente) es claramente más fuerte. A $r_i = 0.2$ (líneas 10 y 13 gel B y líneas 7 y 10 en los geles C y D, Figura 4.15), los geles mostraron un retardo en la movilidad de la forma CCC, hasta llegar a la altura de la forma OC. Este efecto es típico en los análogos de Pt^{II} (geles A y B, Figura 4.16). El perfil de interacción de los complejos de Pt^{II} es algo diferente al del cisplatino, que altera la movilidad de las dos isoformas hasta llegar a la comigración⁴⁸.

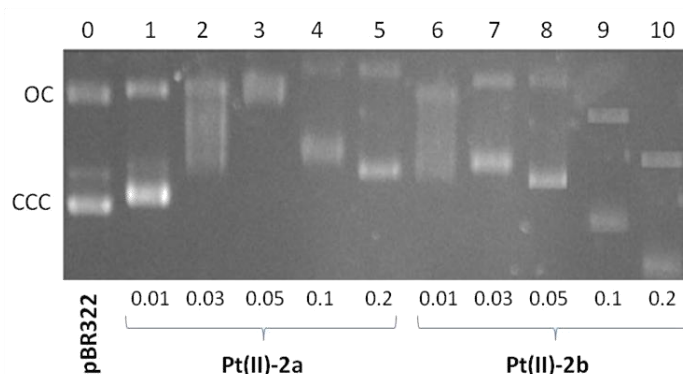


Figura 4.16. Electroforesis en geles de agarosa del ADN plasmídico pBR322 incubado a $r_i = 0.01, 0.03, 0.05, 0.1$ y 0.2 con los complejos **Pt^{II}-2a** (líneas 2-6, respectivamente) y **Pt^{II}-2b** (líneas 7-11, respectivamente). Línea 1: plásmido control.

Estos ensayos de interacción indicaron que la incubación de los complejos de Pt^{IV} con los agentes reductores biológicos AsA y GSH, produce los correspondientes análogos de Pt^{II}. Cuando se comparan todos los experimentos, hay claras diferencias. Por ejemplo, el complejo **Pt^{IV}-1a** tiene

más tendencia a ser reducido por AsA, produciendo cambios en la movilidad electroforética a $r_i = 0.1$, mientras que los otros complejos de Pt^{IV} necesitan la mayor concentración ensayada para generar esa variación. Los complejos Pt^{IV} -**2a** y **2b** son más sensibles a ser reducidos por GSH, puesto que a bajas concentraciones ya inducen cambios en la movilidad de la isoforma CCC (Figura 4.15, líneas 8-10, geles C y D, respectivamente), posiblemente producidos por las especies de Pt^{II} originadas.

4.2.6 Estudios por ^{195}Pt RMN de reducción de los complejos de Pt^{IV} con de reductores biológicos

Con el objetivo de estudiar las diferencias observadas por electroforesis de la acción de los reductores biológicos sobre los complejos de Pt^{IV} , decidimos estudiar la reactividad de las especies Pt^{IV} -**1a** y **2b** frente a AsA y GSH a distintos tiempos, monitorizando la reacción por ^{195}Pt -RMN (Figura 4.17). Esta técnica permite la fácil diferenciación de los dos estados de oxidación del Pt, ya que sus respectivos rangos de δ están situados en áreas muy diferentes⁴⁵.

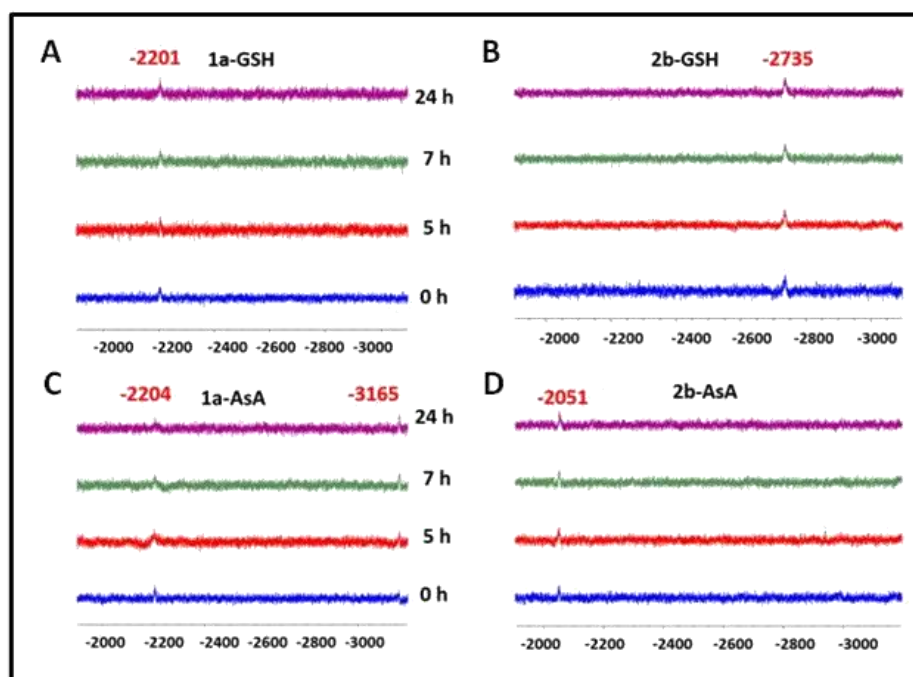


Figura 4.17. Monitorización por ^{195}Pt RMN de la reacción (2 a 24 h) de los complejos Pt^{IV} -**1a** y **2b** con AsA y GSH.

El espectro A muestra cómo el complejo Pt^{IV} -**1a** en presencia de GSH se reduce a la especie de Pt^{II} original (δ (^{195}Pt -RMN) = -2201 ppm, como se muestra en la sección experimental). Sin embargo, frente a AsA (espectro C), no solamente se produce la reducción al complejo de Pt^{II} análogo, sino

que, tras 5 h se observa la aparición de otra nueva especie de Pt^{II} a -3165 ppm. Esta diferencia posiblemente sea debida a un tipo de reducción diferente por parte del AsA.

El complejo Pt^{IV}-2b frente a AsA (espectro D) genera la especie análoga de Pt^{II} (δ (¹⁹⁵Pt-RMN) = -2051 ppm). En presencia de GSH (Espectro B), este complejo también se reduce a su especie análoga de Pt^{II}, aunque posteriormente, esta especie se coordina a GSH. En el espectro B de la Figura 4.17 hay una señal a -2735 ppm, valor típico generado por la molécula PtN₂SX⁴⁹.

4.2.7 Estudios por HPLC de reducción de los complejos Pt^{IV} con reductores biológicos

Tras esta inesperada reactividad observada por ¹⁹⁵Pt RMN de los complejos Pt^{IV}-1a y 2b en presencia los dos reductores, decidimos analizar este comportamiento por HPLC, ya que esta técnica permite evaluar la pureza y estabilidad de sustancias, además de la detección de la especiación. En este experimento, se realizó un estudio comparativo de las especies generadas con el tiempo en el medio de reacción frente a las especies originales detectadas en las disoluciones de los complejos de Pt^{II}, previamente publicadas por el grupo de investigación⁴⁴. Se determinó la cantidad de complejo de Pt^{IV} que permanece intacto en disolución con el tiempo y en presencia de los agentes reductores, considerando la cantidad de complejo a t₀ (antes de la adición del reductor) como el 100%. Los resultados obtenidos se recogen en la Tabla 4.2.

Tabla 4.2. Cantidad de complejo Pt^{IV}-1a y Pt^{IV}-2b intacto en presencia de GSH y AsA a 0, 2, 5 y 24 h, detectadas por HPLC.

tiempo (h)	Pt ^{IV} -1a (%)		Pt ^{IV} -2b (%)	
	GSH	AsA	GSH	AsA
0	100	100	100	100
2	50	50	18	20
5	3	0.4	1.3	15
24	0.6	0.1	1	11

Como era de esperar, la reducción del complejo Pt^{IV}-1a en presencia de los dos reductores es muy rápida. Con AsA, la cantidad de Pt^{IV} detectada es sólo del 0.4% tras 5 h, y de un 3% con GSH, algo que no pudimos detectar en ¹⁹⁵Pt RMN. Después de 24 h, la cantidad de complejo de Pt^{IV} es mínima (0.6% con GSH y 0.1% con AsA). En los cromatogramas se detectó una especiación muy superior que en los espectros de ¹⁹⁵Pt RMN, aunque se identificó un pico al mismo tiempo de

retención que el de la especie **Pt^{II}-1a**, lo que concuerda con la señal mayoritaria registrada en los espectros de ¹⁹⁵Pt RMN.

En el cromatograma a t₀ del complejo **Pt^{IV}-1a** con AsA también se observó la presencia de la especie **Pt^{II}-1a**, en proporción 1:1. Usando la misma muestra del espectro C de la Figura 4.17, no pudimos detectar por HPLC las dos especies mayoritarias de igual intensidad registradas por RMN a 5, 7 y 24h. Se realizaron varios intentos con el fin de encontrar estas dos especies mayoritarias, probando distintas condiciones publicadas en la bibliografía⁵⁰⁻⁵², pero sin éxito. De hecho, la mayoría de condiciones descritas para el cisplatino y complejos similares utilizan ácido fórmico en la fase móvil, y nosotros comprobamos que este ácido tiene un gran impacto en la integridad de los complejos de Pt^{IV} aquí descritos.

En el caso del complejo **Pt^{IV}-2b**, su reducción en presencia de AsA es más lenta, quedando después de 5 h, un 15% de complejo intacto, llegando al 11% tras 24 h. En estos cromatogramas, el pico mayoritario coincide con un pico al mismo tiempo de retención que el del complejo **Pt^{II}-2b**, que se correlaciona con lo obtenido por ¹⁹⁵Pt RMN (espectro D, Figura 4.17). Nuevamente, el resto de las especies no se detectan con facilidad. En presencia de GSH, la reducción del complejo **Pt^{IV}-2b** es más rápida (Tabla 4.2, 5 h).

4.2.8 Reactividad de los complejos **Pt^{IV}-1a** y **2b** con reductores biológicos por ESI MS

Procedimos a intentar la caracterización de las especies generadas en el medio mediante espectrometría de masas. Para ello, se volvieron a preparar las muestras utilizadas en la monitorización por RMN y se analizaron por la técnica ESI.

La Figura 4.18A muestra el espectro de masas ESI del complejo **Pt^{IV}-2b** en presencia de AsA, y se ajusta a lo observado por ¹⁹⁵Pt RMN (espectro D, Figura 4.17), ya que el ion molecular corresponde a la especie análoga de Pt^{II}. En el espectro B, perteneciente a la reducción del complejo **Pt^{IV}-2b** con GSH, hay un pico a 945.22 uma, perteneciente a una nueva especie cuyo peso molecular y distribución isotópica se ajustan a la especie [Pt(dibibi)(dma)(GSH)]⁺. Es evidente que el reductor se ha enlazado al átomo de Pt, generando un aducto con GSH que coincide con la señal del espectro de ¹⁹⁵Pt RMN (espectro B, Figura 4.17).

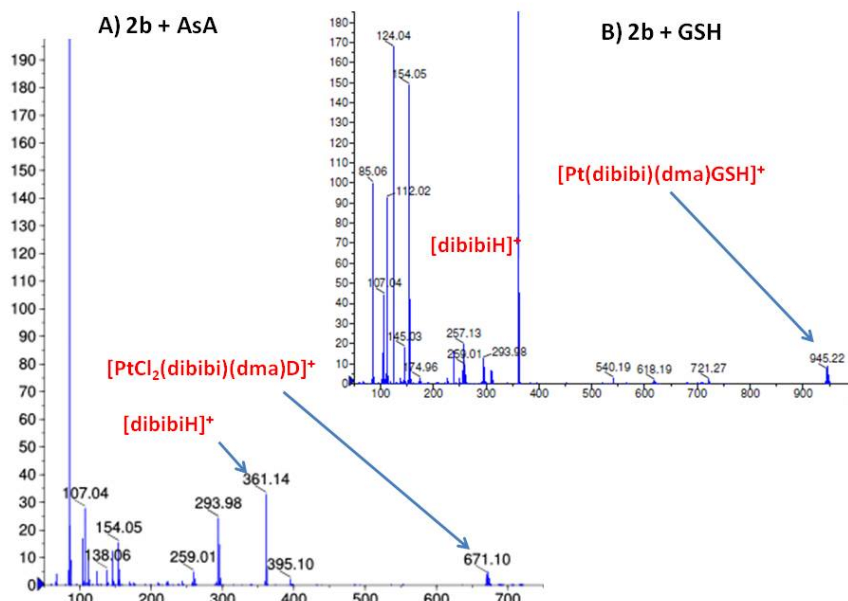


Figura 4.18. Espectros de masas ESI del complejo Pt^{IV}-2b en disolución en presencia de A) AsA y B) GSH, cuya muestra es la de la Figura 4.17A y B.

El espectro de ESI del complejo Pt^{IV}-1a con AsA (Figura 4.19) muestra claramente dos picos moleculares que se corresponden con las especies detectadas por ¹⁹⁵Pt RMN (espectro C, Figura 4.17): el complejo Pt^{II}-1a (que también se detectó por HPLC), y la especie a -3160 ppm, correspondiente al complejo de Pt^{II} coordinado a DMSO-d₆.

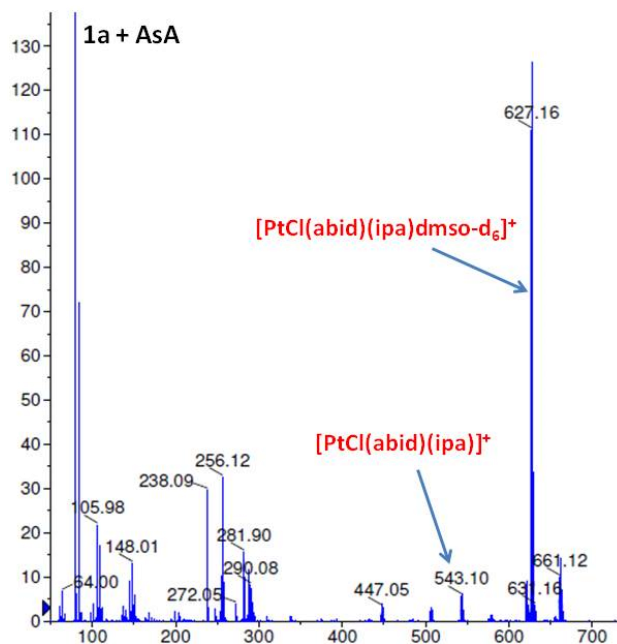


Figura 4.19. Espectro de masas ESI del complejo Pt^{IV}-1a en disolución en presencia de AsA, cuya muestra es la de la Figura 4.17C.

El experimento de ESI para la muestra del complejo Pt^{IV}-1a con GSH fue mucho más clarificador. Cabe señalar que ya en la muestra utilizada en ¹⁹⁵Pt RMN, iba apareciendo un sólido muy fino con el tiempo (12 h), que se separó por centrifugación. Tanto el líquido de reacción como el sólido se caracterizaron por ESI, y los espectros se muestran en la Figura 4.20. En el espectro A, correspondiente al sólido, el ion molecular pertenece a la especie [PtCl(abid)(ipa)(dmsó-d₆)]⁺. Esto se ve apoyado por el hecho de que en el espectro del complejo en disolución (espectro B), tampoco se detectó coordinación de la especie de Pt^{II} con GSH, ni aún después de producirse la reducción.

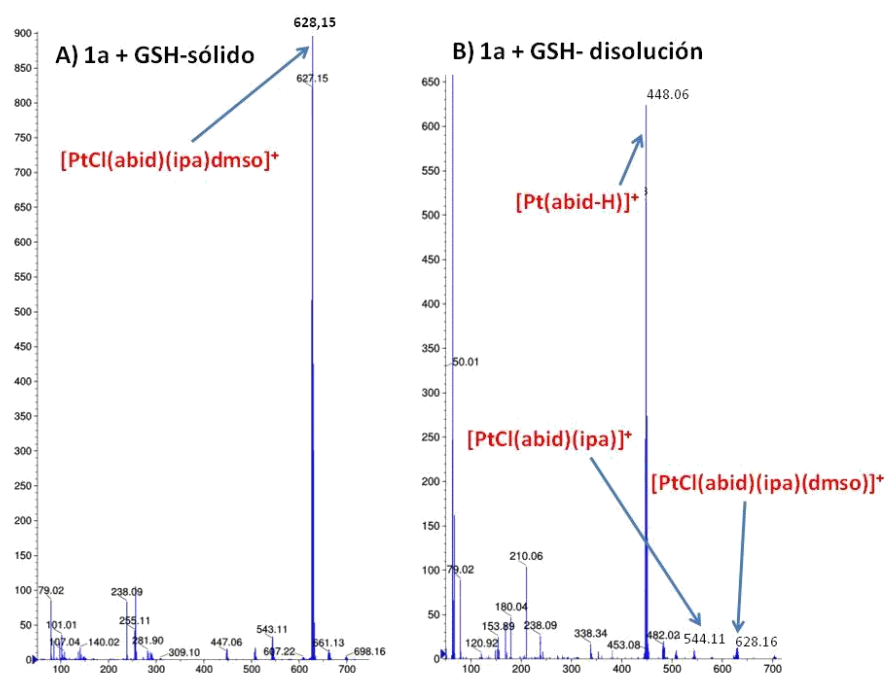


Figura 4.20. Espectros de masas ESI del A) sólido y B) disolución, del complejo Pt^{IV}-1a en presencia de GSH, cuya muestra es la de la Figura 4.17D.

4.2.9 Evaluación de la actividad citotóxica de los complejos de Pt^{II} y Pt^{IV}

El estudio de la actividad citotóxica de los complejos de Pt^{IV} en diversas líneas celulares tumorales se realizó como se detalla en la sección experimental. La actividad antiproliferativa de estos complejos, junto con los valores de las especies de Pt^{II}⁴⁴, se muestra en la Tabla 4.3. Todos los complejos de Pt^{IV} son más activos en las tres líneas que los de Pt^{II}, siendo el complejo Pt^{IV}-1a el más citotóxico de la serie, como ya lo era su análogo de Pt^{II}. Además, este complejo junto con Pt^{IV}-1b, son más activos que el cisplatino. El complejo Pt^{IV}-2b, que termina generando la especie coordinada con GSH, mostró una menor actividad en la línea celular resistente a cisplatino (en la cual, uno de los mecanismos de resistencia es la sobreexpresión de GSH) que en la línea sensible.

Los complejos **Pt^{IV}-2a** y **Pt^{IV}-2b**, aunque presentan valores satisfactorios de IC₅₀, son menos activos que el cisplatino en las líneas A2780 y HEK.

Tabla 4.3. Valores de IC₅₀ (μM) de los complejos Pt^{IV}-1a-2b y Pt^{II}-1a-2b, ligandos abid y dibibi, y cisplatino en tres líneas celulares tumorales.

Complejo	IC ₅₀ (μM)		
	A2780	A2780cisR	HEK
Pt^{IV}-1a	0.06 ± 0.04	0.4 ± 0.1	0.19 ± 0.2
Pt^{IV}-1b	0.06 ± 0.05	0.5 ± 0.2	0.68 ± 0.3
Pt^{IV}-2a	1.7 ± 1.0	2.6 ± 1.0	2.80 ± 0.1
Pt^{IV}-2b	2.5 ± 1.2	3.9 ± 1.4	4.44 ± 1.4
Pt^{II}-1a	0.26 ± 0.5	0.84 ± 0.5	0.65 ± 0.2
Pt^{II}-1b	0.67 ± 0.3	0.95 ± 0.5	2.9 ± 1.2
Pt^{II}-2a	3.6 ± 1.2	7.18 ± 1.5	3.03 ± 1.0
Pt^{II}-2b	13.6 ± 4.9	39 ± 1.2	30 ± 1.6
abid	29 ± 0.1	28 ± 1.3	79 ± 1.5
dibibi	25 ± 1.2	24.6 ± 1.1	117 ± 2.4
cisplatino	0.88 ± 0.2	17.9 ± 1.2	2.91 ± 1.5

Es importante destacar que los complejos **Pt^{IV}-1a** y **1b**, portadores del ligando abid, son más activos en las tres líneas que los complejos con el ligando dibibi (**Pt^{IV}-2a** y **2b**), lo que puede indicar que abid confiere mayor citotoxicidad a los complejos. Este fenómeno también se observaba en los análogos de Pt^{II}. Los ligandos libres no presentan actividad citotóxica, y es la coordinación del Pt a ambos la que genera un gran incremento de la misma.

4.2.10 Determinación de la lipofilidad de los complejos de Pt^{IV} y Pt^{II}

La biodistribución y acceso a la diana terapéutica son aspectos muy importantes en el diseño de metalofármacos. Antes de poder realizar su acción farmacológica, la droga debe atravesar una serie de barreras biológicas, las membranas celulares, que son lipófilas. La habilidad de un fármaco para atravesar estas barreras determina su poder terapéutico⁵³. Así, los fármacos hidrofóbicos atraviesan las bicapas lipídicas celulares, mientras que los fármacos hidrofílicos se localizan preferencialmente en compartimentos hidrofílicos, como la sangre.

Durante décadas, el coeficiente de partición n-octanol-agua ($\text{Log } P$) ha sido utilizado para medir el balance lipofilicidad/hidrofiliicidad⁵⁴. Este parámetro químico-físico permite conocer el grado de lipofilia de una molécula, permitiendo analizar su comportamiento en el entorno de los fluidos biológicos y como será su paso a través de membranas. Por tanto, $\text{Log } P$ se define como la relación entre la concentración de un compuesto en octanol y su concentración en agua. Cuando ambas fases están en equilibrio, este coeficiente es una medida de la diferencia de solubilidad del compuesto entre estos dos disolventes, y se define como:

$$\text{Log } P = [\text{Log (compuesto)}_{\text{oct}} / \text{Log (compuesto)}_{\text{aq}}]$$

La gran actividad citotóxica mostrada por los complejos de Pt^{IV} podría estar relacionada con su mejor lipofilicidad, permitiendo una mayor internalización celular en comparación con las especies de Pt^{II} . La lipofilicidad se determinó mediante UV-Vis, y el cálculo del coeficiente de partición $\text{Log } P$ se determinó como se explica en la sección experimental. Los valores se recogen en la Tabla 4.4:

Tabla 4.4. Valores de $\text{Log } P$ calculados para los complejos 1-8.

Complejo	$\text{Log } P$	
	Pt^{IV}	Pt^{II}
1a	1.90	0.89
1b	1.81	0.95
2a	1.71	0.40
2b	1.00	0.32

Todos los complejos de Pt^{IV} presentan valores de $\text{Log } P$ superiores a los de sus análogos de Pt^{II} , con valores comprendidos entre 1.90 y 1.00, por lo que la fracción en octanol es la que contiene más cantidad de complejo. Esta alta lipofilia de los complejos de Pt^{IV} se ajusta a su buena actividad antitumoral y su mayor internalización. De hecho, el complejo más lipófilo, $\text{Pt}^{\text{IV}}\text{-1a}$, es el más citotóxico de la serie, mientras que el menos lipófilo, $\text{Pt}^{\text{IV}}\text{-2b}$, es también el menos activo. Cabe destacar, que esta relación entre lipofilia y actividad citotóxica se repite con las especies de Pt^{II} , ya que el complejo más lipófilo de los cuatro, $\text{Pt}^{\text{II}}\text{-1b}$, es también el más activo.

4.3 Parte experimental

4.3.1 Síntesis de compuestos de partida

4.3.1.1 Complejos *cis* de partida

La síntesis de los compuestos precursores se ha realizado siguiendo el procedimiento publicado por nuestro grupo de investigación³⁸, y la caracterización es la siguiente:

- ***cis*-[PtCl₂(*ipa*)₂]**: rendimiento: 82%. ¹H-RMN (DMSO-d₆, 300 MHz): δ 4.74 (sa, 2H, NH₂), 3.09 (sept., J=6.3Hz, 1H, CH); 1.20 (d, J=6.5Hz, 6H, CH₃). ¹³C-RMN (125 MHz): δ 47.6, 23.5. Análisis elemental encontrado PtC₆H₁₈N₂Cl₂: C, 18.10%; H, 4.56%; N, 7.30%. Calculado: C, 18.75%; H, 4.72%; N, 7.29%.

- ***cis*-[PtCl₂(*dma*)₂]**: rendimiento: 60%. ¹H-RMN (DMSO-d₆, 300 MHz): δ 5.69 (sa, 1H, NH), 2.52 (s, 6H, CH₃). ¹³C-RMN (DMSO-d₆, 125 MHz): δ 43.6. Análisis elemental encontrado PtC₄H₁₄N₂Cl₂: C, 13.66%, H, 3.93%, N, 7.90%. Calculado: C, 13.48%; H, 3.96%; N, 7.86%.

4.3.1.2 Ligandos

La síntesis de los ligandos precursores se ha realizado siguiendo el procedimiento publicado en la bibliografía⁵⁵, y su caracterización se muestra a continuación:

- ***abid*** (2-(3-Aminopropil)-1*H*-benzo[*de*]isoquinolina-1,3(2*H*)-diona): rendimiento: 88%. ¹H-RMN (CD₃OD, 300 MHz): δ 8.54 (dd, J = 7.5, 1.0 Hz, 2H), 8.34 (dd, J = 8.4, 1.0 Hz, 2H), 7.81 (t, J = 6.9 Hz, 2H), 4.25 (t, J = 6.8 Hz, 2H), 2.73 (t, J = 6.8 Hz, 2H), 1.93 (quint, J = 6.8 Hz, 2H).

- ***dibibi*** (N-(3-(1,3-dioxo-1*H*-benzo[*de*]isoquinolin-2-(3*H*)-il)propil)isonicotinamida): rendimiento: 72%. ¹H-RMN (CD₃OD, 300 MHz): δ 8.50 (d, J = 7.3 Hz, 2H), 8.37 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.81 (m, 4H), 4.25 (t, J = 6.8 Hz, 2H), 3.49 (t, J = 6.8 Hz, 2H), 2.06 (quint, J = 6.9 Hz, 2H).

4.3.1.3 Complejos *trans*-[PtCl₂(amina)(L)] (L = *abid*, *dibibi*)

Los compuestos *trans* de Pt(II) se sintetizaron siguiendo el protocolo publicado por el grupo de investigación⁴⁴, y la caracterización se incluye a continuación.

- ***trans*-[PtCl₂(*abid*)(*ipa*)]**: rendimiento: 43%. ¹H-RMN (DMSO-d₆, 300 MHz): δ (ppm) 8.52 – 8.40 (m, 4H), 7.86 (t, J = 7.7 Hz, 2H), 4.48 (s, 2H), 4.24 – 4.08 (m, 4H), 3.08 – 2.95 (m, 1H), 2.21 – 2.06 (m,

2H), 1.16 (d, $J = 6.4$ Hz, 6H). ^{13}C -RMN (DMSO- d_6 , 75 MHz) δ 163.7, 134.4, 131.3, 130.8, 127.4, 127.2, 122.0, 42.0, 42.7, 36.9, 28.6, 23.08. ^{195}Pt -RMN (DMSO- d_6 , 64 MHz): δ - 2194. MS (MALDI) m/z : 580 $[\text{M}]^+$, 544 $[\text{M}-\text{Cl}]^+$. Análisis elemental encontrado: C, 39.29%; H, 3.95%; N, 7.62%. Calculado para $\text{PtC}_{18}\text{H}_{23}\text{Cl}_2\text{N}_3\text{O}_2$: C, 39.68%; H, 4.07%; N, 7.71%.

- ***trans*-[PtCl₂(*abid*)(*dma*)]**: rendimiento: 31%. ^1H -RMN (DMSO- d_6 , 300 MHz): δ (ppm) 8.52 – 8.42 (m, 4H), 7.87 (t, $J = 7.8$ Hz, 2H), 5.10 – 4.98 (m, 1H), 4.47 – 4.35 (m, 2H), 4.10 (t, $J = 6.3$ Hz, 2H), 2.58 – 2.42 (m, 2H), 2.34 (d, $J = 5.7$ Hz, 6H), 2.15 – 2.03 (m, 2H). ^{13}C -RMN (DMSO- d_6 , 75 MHz): δ 163.7, 134.3, 131.2, 130.8, 127.4, 127.2, 122.0, 42.9, 42.8, 37.0, 28.6. ^{195}Pt -RMN (DMSO- d_6 , 64 MHz): δ - 2192. MS (MALDI) m/z : 530 $[\text{M}-\text{Cl}]^+$. Análisis elemental encontrado: C, 36.14%; H, 3.84%; N, 7.31%. Calculado para $\text{PtC}_{17}\text{H}_{21}\text{Cl}_2\text{N}_3\text{O}_2$: C, 36.12%; H, 3.74%; N, 7.43%.

- ***trans*-[PtCl₂(*dibibi*)(*ipa*)]**: rendimiento: 48%. ^1H -RMN (DMSO- d_6 , 300 MHz): δ (ppm) 8.97 (t, $J = 5.5$ Hz, 1H), 8.86 (d, $J = 5.5$ Hz, 1H), 8.49 (t, $J = 7.5$ Hz, 4H), 7.87 (t, $J = 7.8$ Hz, 2H), 7.76 (d, $J = 6.6$ Hz, 2H), 4.72 – 4.70 (m, 2H), 4.13 (t, $J = 7.1$ Hz, 2H), 3.40 – 3.32 (m, 2H), 3.17 – 3.05 (m, 1H), 2.04 - 1.86 (m, 2H), 1.25 (d, $J = 6.5$ Hz, 6H). ^{13}C -RMN (DMSO- d_6 , 75 MHz): δ 163.4, 163.2, 153.4, 143.0, 134.3, 131.3, 130.7, 127.4, 127.2, 123.0, 122.1, 47.7, 37.7, 37.5, 27.4, 23.0. ^{195}Pt NMR (DMSO- d_6 , 64 MHz): δ - 2065. MS (MALDI) m/z : 685 $[\text{M}]^+$; 649 $[\text{M}-\text{Cl}]^+$. Análisis elemental encontrado: C, 40.99%; H, 4.05%; N, 7.76%. Calculado para $\text{PtC}_{24}\text{H}_{26}\text{Cl}_2\text{N}_4\text{O}_3$: C, 41.25%; H, 3.98%; N, 8.02%. MS (MALDI) m/z : 685 $[\text{M}]^+$, 649 $[\text{M}-\text{Cl}]^+$.

- ***trans*-[PtCl₂(*dibibi*)(*dma*)]**: rendimiento: 32%. ^1H -RMN (DMSO- d_6 , 300 MHz): δ (ppm) 8.98 (d, $J = 5.3$ Hz, 2H), 8.87 (d, $J = 7.3$ Hz, 2H), 8.47 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H), 7.89 – 7.83 (m, 4H), 4.11 (t, $J = 6.0$ Hz, 2H), 2.85 (m, 2H), 2.41 (d, $J = 6.0$ Hz, 6H), 1.98 – 1.94 (m, 2H). ^{13}C -RMN (DMSO- d_6 , 75 MHz): δ 165.1, 164.1, 154.8, 140.4, 134.8, 131.7, 131.1, 127.9, 125.2, 125.0, 122.5, 43.7, 37.5, 36.5, 27.6. ^{195}Pt -RMN (CDCl_3 , 64 MHz): δ - 2046. MS (ES) m/z : 670 $[\text{M}]^+$; 635 $[\text{M}-\text{Cl}]^+$. Análisis elemental encontrado: C, 41.62%; H, 3.71%; N, 8.30%. Calculado para $\text{C}_{23}\text{H}_{24}\text{Cl}_2\text{N}_4\text{O}_3\text{Pt}$: C, 41.20%; H, 3.61%; N, 8.36%.

4.3.2 Complejos *trans*-[PtCl₄(amina)(L)] (L = abid, dibibi)

La oxidación de los compuestos *trans* de Pt^{II} se realizó usando Cl₂ como agente oxidante (para lo que se utiliza un paso de gases que consta de un generador de Cl₂), y se procedió como se indica a continuación:

En un matraz de reacción se introdujeron 30 mg del complejo *trans* de Pt^{II} en metanol y se inició el paso de Cl₂. Para ello, sobre 5 g de KMnO₄ se adicionaron muy lentamente 25 mL de HCl concentrado (36%). El Cl₂ formado burbujea sobre la suspensión muy lentamente y en continua agitación, observándose la formación de una disolución amarilla. El paso de gas se mantuvo desde 3 a 5 h dependiendo del complejo. Tras ese tiempo, se eliminó el disolvente hasta sequedad. El crudo se trituró con acetona, se filtró y el sólido amarillo obtenido se secó a vacío. Durante todo el proceso, el Cl₂ en exceso dismuta con una disolución de NaOH en agua.

- ***trans*-[PtCl₄(abid)(ipa)] (Pt^{IV}-1a)**: rendimiento: 62%. ¹H-RMN (DMSO-d₆, 300 MHz): δ (ppm) 8.50 – 8.43 (m, 4H), 7.86 (t, *J* = 7.7 Hz, 2H), 4.08 – 4.04 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H), 3.21 – 3.14 (m, 1H), 2.78–2.72 (m, 2H), 2.18 – 2.13 (m, 2H), 1.24 (d, *J* = 6.4 Hz, 6H). ¹³C-RMN (DMSO-d₆, 75 MHz) δ 164.0, 134.8, 131.7, 131.4, 127.8, 127.7, 122.5, 49.4, 44.8, 37.5, 27.3, 22.8. ¹⁹⁵Pt-RMN (DMSO-d₆, 64 MHz): δ – 211.7. Análisis elemental encontrado: C, 32.87%; H, 3.40%; N, 5.99%. Calculado para PtC₁₈H₂₃Cl₄N₃O₂: C, 33.25%; H, 3.56%; N, 6.46%.

- ***trans*-[PtCl₄(abid)(dma)] (Pt^{IV}-1b)**: rendimiento: 38%. ¹H-RMN (Acetona-d₆, 300 MHz): δ 8.61 – 8.46 (m, 4H), 7.92 (t, *J* = 7.8 Hz, 2H), 4.37 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H), 3.20 – 3.14 (m, 2H), 2.75 (d, *J* = 5.7 Hz, 6H), 2.44 – 2.35 (m, 2H). ¹³C-RMN (Acetona-d₆, 75 MHz): δ 165.7, 135.9, 133.5, 132.7, 129.7, 128.7, 124.3, 46.4, 38.4, 29.2. ¹⁹⁵Pt-RMN (acetona-d₆, 64 MHz): δ - 302.2 MS (MALDI) *m/z*: 600.1 [M-Cl]⁺, 565.1 [M-2Cl]⁺. Análisis elemental encontrado: C, 33.00%; H, 3.29%; N, 6.47%. Calculado para PtC₁₇H₂₁Cl₄N₃O₂: C, 33.12%; H, 3.59%; N, 6.47%.

- ***trans*-[PtCl₄(dibibi)(ipa)] (Pt^{IV}-2a)**: rendimiento: 67%. ¹H-RMN (DMSO-d₆, 300 MHz): δ (ppm) 9.10 (s, 1H) 9.08 (d, *J* = 6.6 Hz, 2H), 8.46 (m, 4H), 8.01 (d, *J* = 6.6 Hz, 2H), 7.86 (t, *J* = 7.8 Hz, 2H), 6.68 (m, 2H), 4.15 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H), 3.36 (m, 2H), 3.30 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H), 1.97 (m, 2H), 1.33 (d, *J* = 6.5 Hz, 6H). ¹³C-RMN (DMSO-d₆, 75 MHz): δ 163.4, 162.9, 152.6, 146.3, 134.3, 131.2, 130.6, 127.5, 127.1, 123.6, 122.0, 50.6, 37.7, 37.5, 27.3, 22.1. ¹⁹⁵Pt NMR (DMSO-d₆, 64 MHz): δ - 155.7. Análisis

elemental encontrado: C, 38.07%; H, 3.73%; N, 7.10%. Calculado para $\text{PtC}_{24}\text{H}_{26}\text{Cl}_4\text{N}_4\text{O}_3$: C, 38.16%; H, 3.47%; N, 7.42%.

- ***trans*-[PtCl₄(*dibibi*)(*dma*)] (Pt^{IV}-2b)**: rendimiento: 53%. ¹H-RMN (DMSO-d₆, 300 MHz): δ 9.0 (d, J = 5.3 Hz, 2H), 8.46 (m, 4H), 7.98 (d, J = 6.6 Hz, 2H), 7.84 (t, J = 7.8 Hz, 2H) 4.13 (t, J = 7.1 Hz, 2H), 3.37 (t, J = 7.1 Hz, 2H), 2.53 (d, J = 6.0 Hz, 6H), 1.95 (m, 2H). ¹³C-RMN (DMSO-d₆, 75 MHz): δ 163.4, 162.9, 153.2, 141.7, 134.8, 130.7, 127.4, 127.2, 123.6, 122.0, 46.4, 37.6, 35.1, 27.3. ¹⁹⁵Pt-RMN (DMSO-d₆, 64 MHz): δ - 162.7. Análisis elemental encontrado $\text{PtC}_{23}\text{H}_{24}\text{Cl}_4\text{N}_4\text{O}_3$: C, 36.61%; H, 3.23%; N, 7.24%. Calculado para $\text{PtC}_{23}\text{H}_{24}\text{Cl}_4\text{N}_4\text{O}_3 \cdot 0.5\text{H}_2\text{O}$: C, 36.82%; H, 3.36%; N, 7.47%.

4.3.3 Ensayos de estabilidad de los complejos por HPLC

El estudio de la estabilidad de los complejos *trans* de Pt^{IV} en DMSO, NaCl y PBS se realizó preparando inicialmente una disolución stock 5 mM de cada complejo en DMSO. Posteriormente se preparó una dilución 100 μM , tomando 20 μL del stock y se enrasó hasta un volumen final de 1 mL con DMSO, NaCl ó PBS, según el estudio. Una vez preparada la dilución 100 μM , se tomaron 20 μL de la misma y se analizaron por HPLC, registrando la evolución del complejo a tiempo 0, 1, 2, 5 y 24 horas en PBS y NaCl, y hasta una semana en el caso del DMSO, realizándose dos medidas por cada tiempo de inyección.

El análisis por HPLC se realizó con un Agilent Technologies 1200 Infinity Series utilizando una columna de fase reversa C18 Zorbax. Fase móvil: A (agua mQ). B: CH₃CN. En todos los casos se utilizó un gradiente de 30% B a 100% B en 10 minutos y el flujo fue de 1 ml/min. Detección: detector Photodiode Array (PDA).

4.3.4 Interacción de los complejos *trans* de Pt^{IV} frente al ADN -pBR322

La interacción de los complejos *trans* de Pt^{IV} con el ADN del plásmido pBR322 a $r_i = 0.2, 0.1$ y 0.05 (r_i se define como el radio molar Pt/nucleótido) se analizó mediante la técnica de electroforesis en gel de agarosa (1,2 % p/v).

La disolución stock del plásmido pBR322 tenía concentración de 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ en buffer fosfato 50 mM (pH = 7.4) y fue proporcionada por Gencust. La concentración final del plásmido en el ensayo fue de 0.0625 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ en un volumen de 20 μL . Inicialmente se prepararon disoluciones stock 5 mM de los complejos de Pt^{II} en DMSO y se fueron haciendo diluciones hasta llegar a la concentración final requerida según el r_i correspondiente. Las muestras se incubaron con el

plásmido a 37 °C durante 24 h. Posteriormente, se adicionaron a cada muestra 2 µL de buffer de carga (50% de glicerol, 0.25% de azul de bromofenol y 0.25% de xileno cianol) y se cargaron en el gel de agarosa en buffer TAE 1x (Tris-acetato/EDTA). La electroforesis se realizó a 70 V durante 150 min (25 °C) y posteriormente el gel se reveló 30 min en una disolución de bromuro de etidio (0.5 µg/mL) en buffer TAE 1x. Finalmente, las bandas se analizaron con un escaneador de gel UVITEC Cambridge equipado con un equipo UVIDOC HD2.

4.3.5 Estudio de la reactividad de los complejos *trans* de Pt^{IV} con agentes reductores por resonancia de ¹⁹⁵Pt RMN

Se pesaron 8 mg de los complejos Pt^{IV}-**1a** y **2b** y se disolvieron en 50 µL de DMSO-d₆. La disolución se adicionó a una mezcla de 300 µL de DMSO-d₆:D₂O (1:1) a 37 °C en un termoagitador. A esta mezcla se añadió, muy lentamente y a 37 °C, una disolución del agente reductor correspondiente, en 150 µL de D₂O [GSH (1:2) ó AsA (1:1)]. Cada muestra se monitorizó por ¹⁹⁵Pt RMN y ESI MS desde t = 0 hasta 24 h. Cada ensayo se realizó por duplicado, chequeándose por ¹⁹⁵Pt RMN e inyectándose después al equipo de ESI.

4.3.6 Ensayos de citotoxicidad

Las líneas celulares tumorales **A2780** y **A2780cisR** (resistente a cisplatino) (ECACC, Inglaterra) se crecieron en medio RPMI 1640 (Invitrogen) suplementado con 10% de FBS a 37°C en atmósfera de 95% de aire y 5% de CO₂, mientras que la línea celular no tumoral **HEK 293** se creció en medio DMEM (Invitrogen) suplementado con 10% FBS en condiciones similares. La actividad citotóxica de los complejos de Pt^{IV} en estas líneas se evaluó utilizando el método colorimétrico basado en la sal de tetrazolio MTT (bromuro de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio]), que es reducida por las células viables formando cristales púrpuras de formazán. Las células se sembraron en una placa de 96 pocillos a densidades de 1x10⁴ a 1.5x10⁵ células por pocillo, en 200 µL de medio, y se incubaron toda la noche para lograr una adherencia óptima. Posteriormente se retiró el medio cuidadosamente y se añadieron 200 µL de una serie de diluciones de los complejos (las disoluciones stock habían sido previamente preparadas en DMSO) en medio de cultivo, incubando las células a 37 °C (5% CO₂) durante 72 h. El % de DMSO presente en el medio no excedió del 0.5%. Después del periodo de incubación, se retiraron los complejos y se incubaron las células con 200 µL de disolución de MTT (500 µg/mL). Tras 4 h a 37°C (5% CO₂), se retiró nuevamente el medio y los cristales púrpuras se disolvieron en 200 µL de DMSO con agitación. La viabilidad celular se evaluó

por medición de la absorbancia a 570 nm en una placa espectrofotométrica (Power Wave Xs, Bio-Tek). Posteriormente, la viabilidad se calculó dividiendo la absorbancia de cada pocillo entre la absorbancia del pocillo control. Cada punto se determinó por cuatuplicado en dos ensayos independientes.

4.3.7 Determinación de la lipofilicidad de los complejos de Pt^{IV} y Pt^{II}

El coeficiente de partición octanol-agua para los complejos de Pt^{IV} y Pt^{II} se determinó siguiendo el siguiente procedimiento experimental descrito en la bibliografía⁵⁶. De forma breve se indica a continuación: se mezclaron y agitaron 100 mL de agua Milli-Q y 100 mL de n-octanol durante 96 h para permitir la saturación de ambas fases. Se prepararon disoluciones de los complejos en la fase acuosa saturada y posteriormente se añadió la misma cantidad de n-octanol, también saturado. Se agitaron ambas fases durante 10 min y posteriormente se centrifugaron 5 min a 6000 rpm para conseguir su separación. El máximo de absorción medido por UV-Vis en cada fase nos dio la concentración. A partir de la expresión $\text{Log } P = [\text{Log (compuesto)}_{\text{oct}} / \text{Log (compuesto)}_{\text{aq}}]$, se hallaron los datos de la Tabla 4.4.

4.4 Bibliografía

- (1) Johnstone, T. C.; Suntharalingam, K.; Lippard, S. J. *Chem. Rev.*, **2016**, *116*, 3436.
- (2) Kizu, R.; Nakanishi, T.; Miyazaki, M.; Tashiro, T.; Noji, M.; Matsuzawa, A.; Eriguchi, M.; Takeda, Y.; Akiyama, N.; Kidani, Y. *Anticancer Drugs*, **1996**, *7*, 248.
- (3) Rosenberg, B.; Vancamp, L.; Krigas, T. *Nature*, **1965**, *205*, 698.
- (4) Rosenberg, B.; Vancamp, L.; Trosko, J. E.; Mansour, V. H. *Nature*, **1969**, *222*, 385.
- (5) Shi, Y.; Liu, S.-A.; Kerwood, D. J.; Goodisman, J.; Dabrowiak, J. C. *J. Inorg. Biochem.*, **2012**, *107*, 6.
- (6) Braddock, P. D.; Connors, T. A.; Jones, M.; Khokhar, A. R.; Melzack, D. H.; Tobe, M. L. *Chem. Biol. Interact.*, **1975**, *11*, 145.
- (7) Bramwell, V. H.; Crowther, D.; O'Malley, S.; Swindell, R.; Johnson, R.; Cooper, E. H.; Thatcher, N.; Howell, A. *Cancer Treat. Rep.*, **1985**, *69*, 409.
- (8) Gordon, M.; Hollander, S. *J. Med.*, **1993**, *24*, 209.
- (9) Schilder, R. J.; LaCreta, F. P.; Perez, R. P.; Johnson, S. W.; Brennan, J. M.; Rogatko, A.; Nash, S.; McAleer, C.; Hamilton, T. C.; Roby, D.; et al. *Cancer Res.*, **1994**, *54*, 709.
- (10) Olszewski, U.; Ach, F.; Ulsperger, E.; Baumgartner, G.; Zeillinger, R.; Bednarski, P.; Hamilton, G. *Met. Based Drugs.*, **2009**, *2009*, 348916.
- (11) Choy, H. *Expert Rev. Anticancer Ther.*, **2006**, *6*, 973.
- (12) Figg, W. D.; Chau, C. H.; Madan, R. A.; Gulley, J. L.; Gao, R.; Sissung, T. M.; Spencer, S.; Beatson, M.; Aragon-Ching, J.; Steinberg, S. M.; Dahut, W. L. *Clin. Genitourinary Cancer*, **2013**, *11*, 229.
- (13) Marques, M. P. M. *ISRN Spectroscopy*, **2013**, *2013*, 29.
- (14) Žák, F.; Turánek, J.; Kroutil, A.; Sova, P.; Mistr, A.; Poulová, A.; Mikolin, P.; Žák, Z.; Kašná, A.; Záluská, D.; Neča, J.; Šindlerová, L.; Kozubík, A. *J. Med. Chem.*, **2004**, *47*, 761.
- (15) Kozubik, A.; Horvath, V.; Svihalkova-Sindlerova, L.; Soucek, K.; Hofmanova, J.; Sova, P.; Kroutil, A.; Zak, F.; Mistr, A.; Turanek, J. *Biochem. Pharmacol.*, **2005**, *69*, 373.
- (16) Kelland, L. R.; Barnard, C. F.; Mellish, K. J.; Jones, M.; Goddard, P. M.; Valenti, M.; Bryant, A.; Murrer, B. A.; Harrap, K. R. *Cancer Res.*, **1994**, *54*, 5618.
- (17) 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.
- (18) Hall, M. D.; Mellor, H. R.; Callaghan, R.; Hambley, T. W. *J. Med. Chem.*, **2007**, *50*, 3403.
- (19) Davies, M. S.; Hall, M. D.; Berners-Price, S. J.; Hambley, T. W. *Inorg. Chem.*, **2008**, *47*, 7673.
- (20) Hambley, T. W.; Battle, A. R.; Deacon, G. B.; Lawrenz, E. T.; Fallon, G. D.; Gatehouse, B. M.; Webster, L. K.; Rainone, S. *J. inorg. Biochem.*, **1999**, *77*, 3.
- (21) Lemma, K.; Shi, T.; Elding, L. I. *Inorg. Chem.*, **2000**, *39*, 1728.
- (22) Lemma, K.; House, D. A.; Retta, N.; Elding, L. I. *Inorg. Chim. Acta.*, **2002**, *331*, 98.
- (23) Lemma, K.; Sargeson, A. M.; Elding, L. I. *Dalton Trans.*, **2000**, 1167.
- (24) Nemirovski, A.; Vinograd, I.; Takrouri, K.; Mijovilovich, A.; Rompel, A.; Gibson, D. *Chem. Commun.*, **2010**, *46*, 1842.
- (25) Cleare, M. J.; Hoeschele, J. D. *BioInorg. Chem.*, **1973**, *2*, 187.
- (26) Hall, M. D.; Mellor, H. R.; Callaghan, R.; Hambley, T. W. *J. Med. Chem.*, **2007**, *50*, 3403.
- (27) Wexselblatt, E.; Yavin, E.; Gibson, D. *Angew. Chem.*, **2013**, *125*, 6175.
- (28) Hall, M. D.; Hambley, T. W. *Coord. Chem. Rev.*, **2002**, *232*, 49.
- (29) N. Bose, R.; L. Weaver, E. *Dalton Trans.*, **1997**, 1797.

- (30) Perez, R. P. *Eur. J. Cancer*, **1998**, *34*, 1535.
- (31) Ellis, L.; Er, H.; Hambley, T. *Aust. J. Chem.*, **1995**, *48*, 793.
- (32) Vollano, J. F.; Al-Baker, S.; Dabrowiak, J. C.; Schurig, J. E. *J. Med. Chem.*, **1987**, *30*, 716.
- (33) Kauffman, G. B.; Cowan, D. O. *Inorg. Synth.*, **1967**, *7*, 236.
- (34) Giandomenico, C. M.; Abrams, M. J.; Murrer, B. A.; Vollano, J. F.; Rheinheimer, M. I.; Wyer, S. B.; Bossard, G. E.; Higgins, J. D. *Inorg. Chem.*, **1995**, *34*, 1015.
- (35) Ang, W. H.; Pilet, S.; Scopelliti, R.; Bussy, F.; Juillerat-Jeanneret, L.; Dyson, P. J. *J. Med. Chem.*, **2005**, *48*, 8060.
- (36) Reithofer, M.; Galanski, M.; Roller, A.; Keppler, B. K. *Eur. J. Inorg. Chem.*, **2006**, *2006*, 2612.
- (37) Kelland, L. R.; Murrer, B. A.; Abel, G.; Giandomenico, C. M.; Mistry, P.; Harrap, K. R. *Cancer Res.*, **1992**, *52*, 822.
- (38) Alvarez-Valdes, A.; Perez, J. M.; Lopez-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.
- (39) Barnes, K. R.; Kutikov, A.; Lippard, S. J. *Chem. Biol.*, **2004**, *11*, 557.
- (40) Ang, W. H.; Khalaila, I.; Allardyce, C. S.; Juillerat-Jeanneret, L.; Dyson, P. J. *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, *127*, 1382.
- (41) Banerjee, S.; Veale, E. B.; Phelan, C. M.; Murphy, S. A.; Tocci, G. M.; Gillespie, L. J.; Frimannsson, D. O.; Kelly, J. M.; Gunnlaugsson, T. *Chem. Soc. Rev.*, **2013**, *42*, 1601.
- (42) Brana, M. F.; Ramos, A. *Curr. Med. Chem. Anticancer Agents*, **2001**, *1*, 237.
- (43) Braña, M. F.; Castellano, J. M.; Roldán, C. M.; Santos, A.; Vázquez, D.; Jiménez, A. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **1980**, *4*, 61.
- (44) Herrera, J. M.; Mendes, F.; Gama, S.; Santos, I.; Navarro Ranninger, C.; Cabrera, S.; Quiroga, A. n. G. *Inorg. Chem.*, **2014**, *53*, 12627.
- (45) Still, B. M.; Kumar, P. G.; Aldrich-Wright, J. R.; Price, W. S. *Chem. Soc. Rev.*, **2007**, *36*, 665.
- (46) Nemirovski, A.; Vinograd, I.; Takroui, K.; Mijovilovich, A.; Rompel, A.; Gibson, D. *Chem. Commun.*, **2012**, *46*, 1842.
- (47) Mukhopadhyay, S.; Barnés, C. M.; Haskel, A.; Short, S. M.; Barnes, K. R.; Lippard, S. J. *Bioconjugate Chem.*, **2008**, *19*, 39.
- (48) Cohen, G. L.; Bauer, W. R.; Barton, J. K.; Lippard, S. J. *Science*, **1979**, *203*, 1014.
- (49) Chen, Y.; Guo, Z.; Sadler, P. J. In *Cisplatin*; *Helv. Chim. Acta*, **2006**, p 293.
- (50) El-khateeb, M.; Appleton, T. G.; Charles, B. G.; Gahan, L. R. *J. Pharm. Sci.*, **1999**, *88*, 319.
- (51) Riley, C. M.; Sternson, L. A.; Repta, A. J. *J. Pharm. Sci.*, **1983**, *72*, 351.
- (52) Barefoot, R. R. *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl.*, **2001**, *751*, 205.
- (53) Ossipov, K.; Scaffidi-Domianello, Y. Y.; Seregina, I. F.; Galanski, M.; Keppler, B. K.; Timerbaev, A. R.; Bolshov, M. A. *J. inorg. Biochem.*, **2014**, *137*, 40.
- (54) Kujawski, J.; Bernard, M. K.; Janusz, A.; Kuźma, W. *J. Chem. Educ.*, **2012**, *89*, 64.
- (55) Licchelli, M.; Biroli, A. O.; Poggi, A.; Sacchi, D.; Sangermani, C.; Zema, M. *Dalton Trans.*, **2003**, 4537.
- (56) Marzo, T.; Pillozzi, S.; Hrabina, O.; Kasparkova, J.; Brabec, V.; Arcangeli, A.; Bartoli, G.; Severi, M.; Lunghi, A.; Totti, F.; Gabbiani, C.; Quiroga, A. G.; Messori, L. *Dalton Trans.*, **2015**, *44*, 14896.

Capítulo 5. Complejos de Pd^{II} y Pt^{II} con ligandos farmacológicamente activos: tiosemicarbazonas

En este capítulo se describe la síntesis y caracterización de cuatro nuevos complejos metálicos de Pd^{II} con dos ligandos tiosemicarbazona (TSCN), N_HNO₂TSCNMe y N_HNO₂TSCN. Además, se ha realizado el estudio de la interacción y mecanismo de acción de diversos complejos con diferente naturaleza y estructura (nuevos ó publicados anteriormente por el grupo de investigación) frente a modelos de proteínas y ADN.

5.1 Introducción

5.1.1 Ligandos tiosemicarbazona

Las TSCN son compuestos de tipo N,S-dador, y representan una clase de bases de Schiff que se obtienen por la condensación de un aldehído ó cetona con una tiosemicarbazida¹ (Figura 5.1A). Esta reacción necesita un medio ligeramente ácido, aunque en ocasiones la naturaleza tautomérica de estos compuestos puede requerir un medio débilmente alcalino². En términos generales, las TSCN pueden ser mono-TSCN (estructura I, Figura 5.1), donde las cadenas R¹-R⁴ pueden ser diferentes; ó bis-TSCN (estructura II, Figura 5.1), en las que los dos brazos están conectados por un anillo ó por un enlace C-C³.

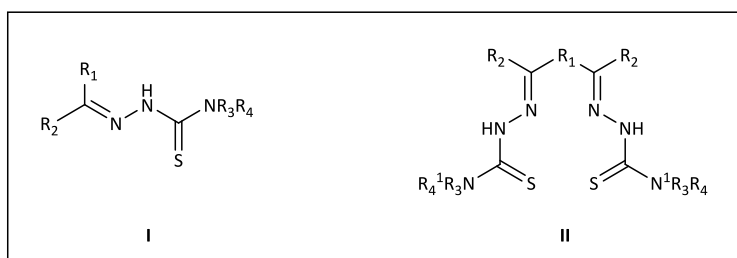


Figura 5.1. A) Formación de una TSCN. B) Estructura general de las mono (I) y bis-TSCN (II).

Estos ligandos presentan más de dos sitios de unión covalentes, cuyo número depende del aldehído o cetona⁴, ó del equilibrio tautomérico de la TSCN presente en la disolución⁵. Las mono-TSCN existen como tautómeros entre las formas tiólica y tiónica, según las condiciones del medio, del pH⁶ e incluso de los reactivos presentes⁷, especialmente metálicos, por lo que pueden coordinarse al metal en su forma neutra (tiónica) o aniónica (Figura 5.2). Esta última se genera a través de la pérdida de un H del grupo -N²H o del -SH.

La forma desprotonada (aniónica) suele estar más favorecida debido a la conjugación con el grupo imínico (C=N=N=C), que le confiere gran estabilidad.

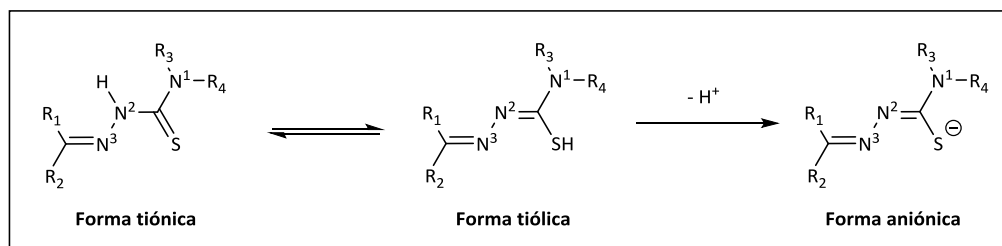


Figura 5.2. Equilibrio tautomérico de una tiosemicarbazona.

5.1.2 Coordinación de los ligandos TSCN

Las TSCN presentan una química muy versátil debido a la variabilidad en sus modos de coordinación. Los metales se coordinan a las TSCN a través del N imínico o del S, pudiendo también enlazarse a través de un tercer heteroátomo dador introducido en el ligando. Así, las TSCN pueden actuar como ligandos:

- a) **Monodentados:** generalmente se enlazan por el átomo de S en su forma protonada (tiónica).
- b) **Bidentados:** se coordinan a través del S y del N imínico, perdiendo, en la mayoría de los casos, el protón del grupo $-N^2H$, y formándose un anillo de cinco miembros.
- c) **Tridentados:** mediante la incorporación de un tercer átomo dador (N, S ó C).

Desde que se publicaron los primeros estudios de complejos TSCN con Ni^{II} , se han desarrollado numerosas especies conteniendo otros cationes metálicos tales como Fe^{III} , Ni^{II} , Cu^{II} , Zn^{II} , Pd^{II} , Pt^{II} , etc⁸⁻¹⁴, como se muestra en los ejemplos de la Figura 5.3:

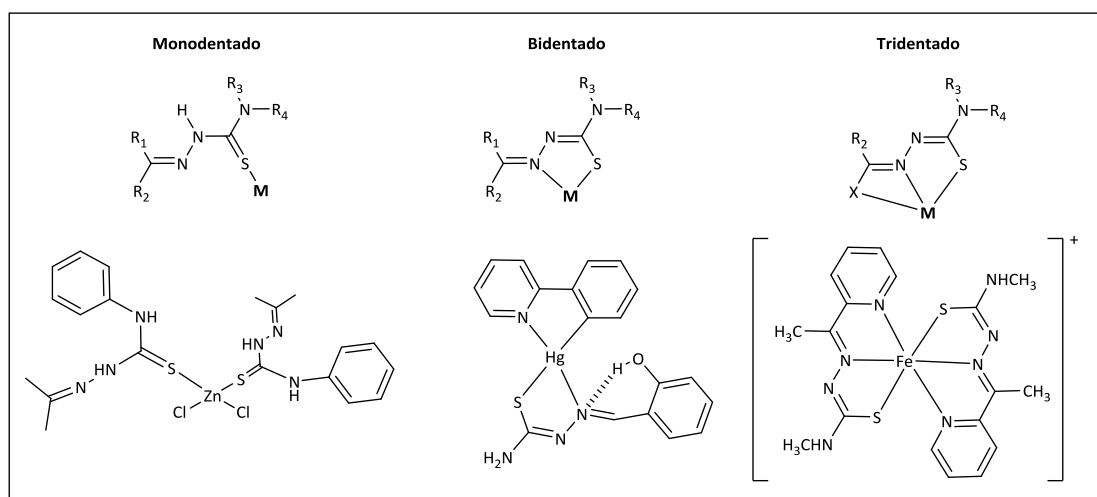


Figura 5.3. Ejemplos de TSCN metálicas en las que la TSCN actúa como monodentado¹⁵, bidentado¹⁶ y tridentado¹⁷.

5.1.3 Propiedades farmacológicas de las TSCN

Como ya se ha mencionado en el capítulo 1, las TSCN son un tipo de ligandos con un amplio espectro de actividad farmacológica¹⁸, mostrando actividad antiparasitaria¹⁹, antibacteriana²⁰, antiviral²¹ y antitumoral^{22,23}.

1) Actividad antiparásita y antifúngica

Las TSCN presentan un amplio rango de actividad antimicrobiana. En 1946, Domagk²⁴ publicó que algunas TSCN de aldehídos cíclicos y cetonas presentaban actividad antituberculosa *in vitro*. En algunos casos mostraron actividad *in vivo* en animales, por lo que estos compuestos fueron usados en el tratamiento del lupus y de la tuberculosis pulmonar. La actividad antibacteriana de una variedad TSCN con 2-acetilpiridina en cultivos clínicos de bacterias *gram* positivas y negativas, mostró que muy activas frente a las primeras²⁵.

El fármaco más utilizado de estos compuestos antimicrobianos es el *p*-acetamidobenzaldehído TSCN, conocido con el nombre comercial de tiacetazona. Este fármaco tiene una gran acción bacteriostática *in vivo*, aunque la rápida adquisición de resistencia por parte de las cepas bacterianas limita seriamente su éxito en clínica²⁶.

2) Actividad antiviral

La actividad antiviral de TSCN fue descrita por primera vez por Hamre y colaboradores, quienes estudiaron que derivados de la benzaldehído TSCN eran activos frente a infecciones neurovirales en ratones²⁷. Posteriormente, se encontró que las isatin-TSCN eran muy activas y, que en particular, la N-metil-isatin- β -TSCN (metisazona) se utilizó en ensayos clínicos contra la viruela en La India²⁸. Otras TSCN han resultado ser efectivas frente a HIV, produciendo la inhibición selectiva de proteínas estructurales de este virus²⁹. En las últimas décadas, los estudios de las propiedades electrónicas y estructurales de TSCN de 2-acetilpiridina, 2-acetilquinolina y 1-acetilisoquinolina han demostrado actividad anti HSV-1³⁰.

3) Actividad antitumoral

En 1956 Brockman y colaboradores publicaron el efecto anti leucémico de la 2-formilpiridina TSCN (PT)³¹, aunque este fármaco resultó ser altamente tóxico, por su alta acumulación en las células. En 1963, French y colaboradores²¹ formularon la hipótesis sobre el modo de acción de TSCN α (N)-heterocíclicas como agentes anticancerígenos: 1) actuaban como ligandos tridentados

(lo cual se consideraba necesario para esta actividad), 2) modificaciones en el sistema de anillo, manteniendo el modelo de ligando, podían suponer un aumento de su actividad y una disminución de la toxicidad, y 3) las densidades electrónicas, sustituyentes y geometría podrían tener un efecto crítico en esta actividad. Con esta hipótesis se testaron gran número de TSCN frente a tumores en roedores. La primera TSCN activa que encontraron fue la pirazina carboxaldehído TSCN, con gran actividad antitumoral en células de cáncer de pulmón de Lewis (LLC)²¹. Desde entonces, se han sintetizado y testado una gran cantidad de ejemplos de complejos TSCN. En esta tesis doctoral nos centraremos en complejos de Pd^{II} y Pt^{II}, especialmente en aquellos con estructura ciclotmetalada.

5.1.4 Metalación de las TSCN: complejos de Pd^{II} y Pt^{II}

En nuestro grupo de investigación se han estudiado y desarrollado una amplia serie de complejos de Pd^{II} y Pt^{II} con ligandos TSCN (cuya estructura general y un ejemplo de cada uno se muestran en la Figura 5.4), presentando diferentes sustituyentes. La mayor reactividad del Pd comparada con el Pt (que es el metal más utilizado en el desarrollo de fármacos antitumorales), puede evitarse usando ligandos quelantes para lograr una mayor estabilización.

Estos complejos se forman al producirse la coordinación del catión metálico al ligando TSCN, a través de los átomos de S y N azometínico, y que pueden ser:

a) **Mononucleares**, que pueden ser de dos tipos:

a.1) M(TSCN-H)Cl₂: complejos de geometría plano-cuadrada (ML₂X₂), similar a la del cisplatino, con dos ligandos salientes cloruro^{32,33}. El ligando actúa como bidentado, enlazándose al metal a través de los átomos de S y N imínico. En estos complejos no se observa ortometalación posterior.

a.2) M(TSCN-H)(TSCN)Cl, con dos ligandos TSCN: uno actúa como bidentado y otro como monodentado³⁴. Este tipo de complejos son muy interesantes, pues son el paso previo a la formación de la estructura tetrámera.

b) **Dinucleares**: el ligando TSCN actúa como bidentado, enlazándose al catión metálico por los átomos de S y N imínico, con los ligandos cloruro puenteando entre los dos cationes metálicos. En estos complejos no se observa ortometalación.

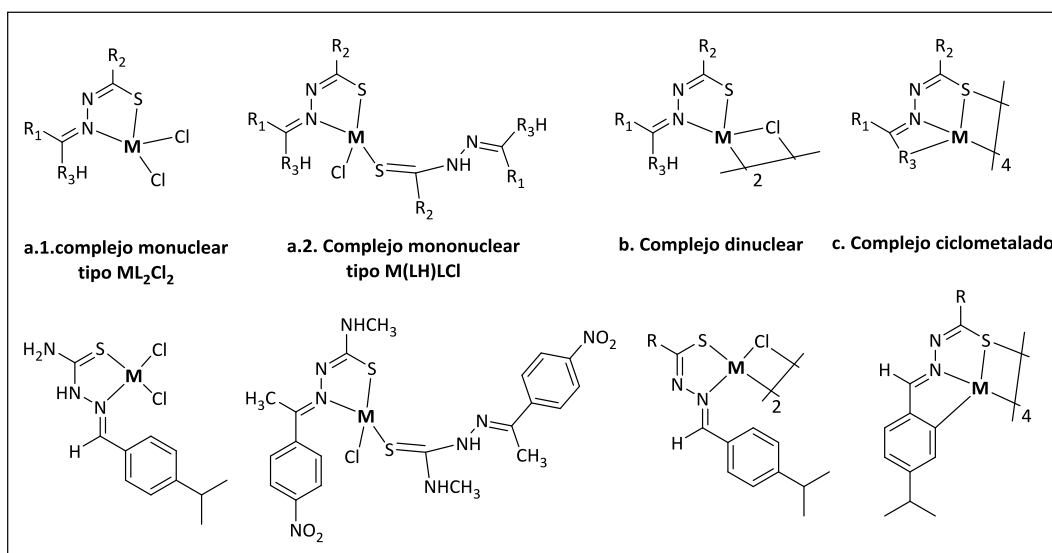


Figura 5.4. Tipos de complejos metálicos con ligandos TSCN desarrollados en el grupo de investigación (M = Pt^{II}, Pd^{II})

5.1.4.1 Complejos ciclometalados. Ortometalación

Las TSCN son ligandos capaces de generar estructuras ciclometaladas. En la mayoría de los casos, la orientación del grupo fenilo y los átomos dadores en estos ligandos aparecen como apropiados para el proceso de ortometalación³⁶.

La reacción de ortometalación tiene lugar entre el precursor metálico con ligandos orgánicos que contienen anillos aromáticos unidos a grupos con átomos dadores (generalmente N, S, P y O)³⁷. La síntesis de estos complejos ortometalados se conoce con detalle desde los años 80 aunque su investigación continúa como demuestra el gran número de monografías y revisiones que se pueden encontrar, incluso actuales³. El proceso de ortometalación se resume en el esquema de la Figura 5.5, e implica la coordinación previa del metal al átomo dador (Y) y posterior ataque electrófilo intramolecular del metal al átomo de C, produciéndose la activación del enlace C-H. Se forma una especie intermedia que contiene al enlace C-H activado interaccionando con el metal, y que evoluciona hacia la formación de un enlace σ (M-C)³⁸. El complejo ciclometalado contiene un anillo de cinco miembros³⁶, más estable que otros sistemas de anillo, como los de cuatro o de seis miembros³⁹.

El éxito de la ciclometalación depende de factores estéricos y electrónicos³⁹, y comprende los siguientes requisitos: i) el precursor metálico debe proporcionar un sitio de coordinación para permitir la unión al heteroátomo; ii) presencia de una base que facilite la eliminación del H unido al C que sufre el ataque del metal; y iii) el disolvente, ya que puede desarrollar un papel importante, promoviendo vacantes en la esfera de coordinación del metal, aumentando así su electrofilia en el proceso de ciclometalación.

2) Actividad antitumoral

La capacidad antitumoral de complejos metálicos con ligandos TSCN ha sido ampliamente estudiada durante décadas. En 1977, Petering y colaboradores estudiaron cómo diversas TSCN heterocíclicas tenían la habilidad de atrapar el Fe presente en ferritina y transferrina por quelación⁴⁹. Estos investigadores testaron la actividad citotóxica de complejos metálicos de Fe y Cu con TSCN de formilpiridina en células tumorales de ascitis de Erlich, en las que resultaron ser muy activos⁵⁰, por lo que surgieron multitud de estudios acerca de las propiedades antitumorales y mecanismo de acción de complejos de Fe y Cu con ligandos TSCN²¹. Estos estudios fueron ampliándose a un sinnúmero de complejos de TSCN con diversos cationes metálicos, tales como Ni^{II}, Zn^{II}, Cd^{II}, Cu^{II}, Ti^{IV}, Pt^{II}, Pd^{II}, etc²¹, mostrando, en la mayoría de los casos mayor actividad que el ligando libre. Además, el grupo del profesor Keppler desarrolló un complejo de Ga^{III} con el ligando N⁴-dimetil 2-acetilpiridina TSCN, que mostró una excelente actividad antiproliferativa en diversas líneas celulares humanas tumorales⁵¹.

Entre todas estas investigaciones, hay que mencionar las realizadas con complejos TSCN de Pd^{II} y Pt^{II}, puesto que siempre han mostrado gran actividad en terapia antitumoral tanto *in vitro* como *in vivo*. Así, complejos de Pd^{II} y Pt^{II} de PT resultaron ser activos *in vivo* frente a células de leucemia P388⁵², mientras que complejos de Pt^{II} de N⁴-alquil-2-acetilpiridina TSCN mostraron actividad inhibitoria *in vitro* en la síntesis de ADN en cultivos celulares tumorales de P388 y L1210. Por otra parte, complejos de Pt^{II} con ligandos N⁴-etil-2-formil y 2-acetilpiridina TSCN presentaron citotoxicidad específica en células resistentes a cisplatino. Nuestro grupo de investigación sintetizó una serie completa de complejos de Pd y Pt mono, di y tetranucleares con fenilacetaldehído³³ y *p*-isopropilbenzaldehído TSCN, los cuales mostraron actividad frente a diversas líneas celulares humanas tumorales sensibles y resistentes (Pam-ras) al cisplatino⁵³.

5.1.6 Complejos ciclotmetalados de Pt^{II} y Pd^{II} sintetizados en el grupo de investigación

5.1.6.1 Síntesis

Como ya se comentó en el apartado 5.1.4.1, nuestro grupo de investigación fue el primero en sintetizar complejos tetranucleares ortometalados con tiosemicarbazonas CNS dadoras⁵⁴ de Pd^{II} y Pt^{II}, cuyas estructuras se muestran en la Figura 5.6A:

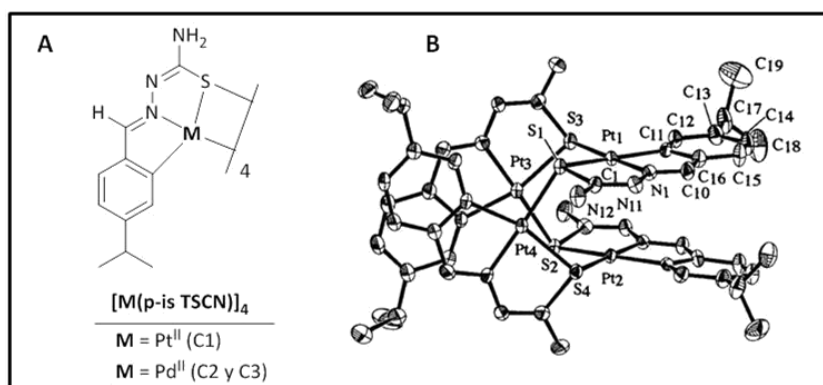


Figura 5.6. Ejemplos de complejos tetranucleares publicados por el grupo de investigación⁴⁴.
A) Fórmula empírica de C1 y B) estructura molecular obtenida por difracción de rayos X.

En los complejos tetranucleares de Pd^{II} y Pt^{II} de la Figura 5.6A, el ligando TSCN actúa como tridentado, enlazándose al metal a través de los átomos de S, N imínico y del C del grupo fenilo en posición orto⁴⁴. El complejo de Pd^{II} sufría interconversión en disolución, generando dos isómeros, mientras que del complejo de Pt^{II} sólo se obtiene uno de los dos isómeros. En la Figura 5.6B se muestra la estructura del complejo tetranuclear de Pt, en la que se observa un núcleo central formado por un anillo de ocho miembros alternando los átomos de Pt y S en una conformación tipo bote⁴⁴.

5.1.6.2 Actividad antitumoral y mecanismo de acción.

Al testar la actividad citotóxica de estos complejos en células tumorales humanas y de ratón tanto sensibles como resistentes a cisplatino, los tres presentaron valores muy satisfactorios de IC₅₀, siendo particularmente activos en células en las que el cisplatino presentaba valores moderados. Además, la alta actividad mostrada por los tres complejos en células resistentes al cisplatino indicó que podrían seguir un mecanismo de acción distinto al de éste. En general, el complejo más activo resultó ser uno de los dos isómeros de Pd^{II} (C2), seguido por el complejo ciclometalado de Pt^{II} (C1).

Adicionalmente, se analizó la interacción de los tres complejos con modelos de ADN (CT y pBR322), como se muestra en la Figura 5.7. La distorsión que estas especies podían generar en el CT ADN se determinó por la técnica de dicroísmo circular (DC) (Figura 5.7A), la cual reveló que los dos isómeros de Pd^{II} (C2 y C3) generan en la estructura secundaria del ADN cambios conformacionales diferentes a los generados por el complejo de Pt^{II} (C1). Además, la presencia de un "efecto de coleo" en las curvas de los tres complejos a 315 nm, sugieren que estos tres forman

entrecruzamientos interhélice en el ADN, a diferencia del cisplatino. Este fenómeno se confirmó al estudiar la interacción de los tres complejos frente al ADN del plásmido pBR322 (Figura 5.7B).

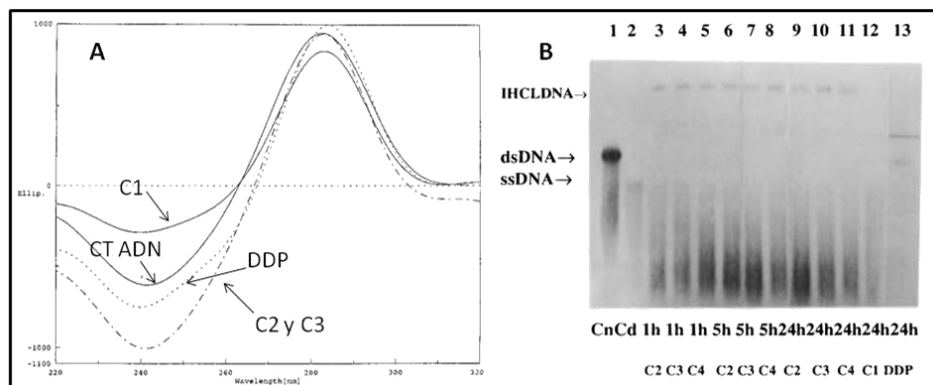


Figura 5.7. A) Espectro de DC de CT ADN y B) Gel de agarosa de cadenas simple y doble de ADN pBR322 incubado con los complejos de Pd (C2 y C3), complejo de Pt (C1) y cisplatino (DDP)⁴⁴.

5.2 Resultados

5.2.1 Objetivos

Los objetivos de este capítulo son: 1) la síntesis de nuevos complejos de coordinación y ortometalados de Pd^{II} con los ligandos N_HNO₂TSCNMe y N_HNO₂TSCN; y 2) su comparación con el estudio de estabilidad en disolución acuosa, determinación de su lipofilicidad y de su afinidad e interacción frente a modelos de proteínas y ADN, utilizando para ello otros complejos de Pd^{II} y Pt^{II} con ligandos TSCN, sintetizados previamente en nuestro grupo de investigación y detallados en la introducción de este capítulo.

5.2.2 Síntesis de complejos TSCN de Pd^{II}

Se han sintetizado cuatro complejos de Pd^{II} con dos ligandos TSCN, N_HNO₂TSCNMe y N_HNO₂TSCN. El procedimiento se detalla en la sección experimental.

5.2.2.1 Ligandos

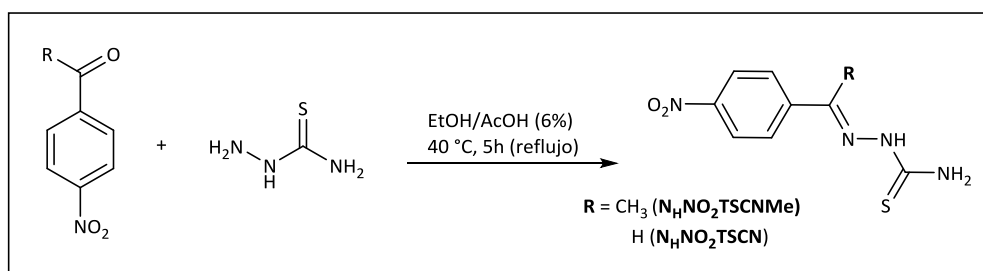


Figura 5.8. Síntesis de los ligandos N_HNO₂TSCNMe y N_HNO₂TSCN.

Los ligandos **N_HNO₂TSCNMe** y **N_HNO₂TSCN** se sintetizaron por la reacción de condensación entre la tiosemicarbazida con 1-(4-nitrofenil)etanona y *p*-nitrobenzaldehído, respectivamente (Figura 5.8). La principal diferencia entre ambos ligandos es la presencia de un metilo en el grupo azo del ligando **N_HNO₂TSCNMe**, que nos permitirá la posterior comparación de complejos cuya única diferencia es un grupo voluminoso próximo al lugar de metalación. La caracterización de los ligandos se ha realizado de acuerdo con los datos publicados, y la comparación es sencilla, ya que el grupo CH₃ se detecta muy diferenciado en el espectro de ¹H-RMN, al ser la parte alifática.

5.2.2.2 Complejos de coordinación

En el esquema de la Figura 5.9 se presenta la síntesis de los complejos de coordinación mononucleares **Pd(N_HNO₂TSCNH)N_HNO₂TSCNCl** y **Pd(N_HNO₂TSCNMeH)N_HNO₂TSCNMeCl**. Estas especies se obtienen por reacción de los ligandos N_HNO₂TSCN ó N_HNO₂TSCNMe con Li₂PdCl₄ (que se prepara *in situ* por reacción entre PdCl₂ y LiCl), ya que la reacción directa de los ligandos TSCN con K₂PdCl₄ es muy lenta y da lugar a muchos subproductos.

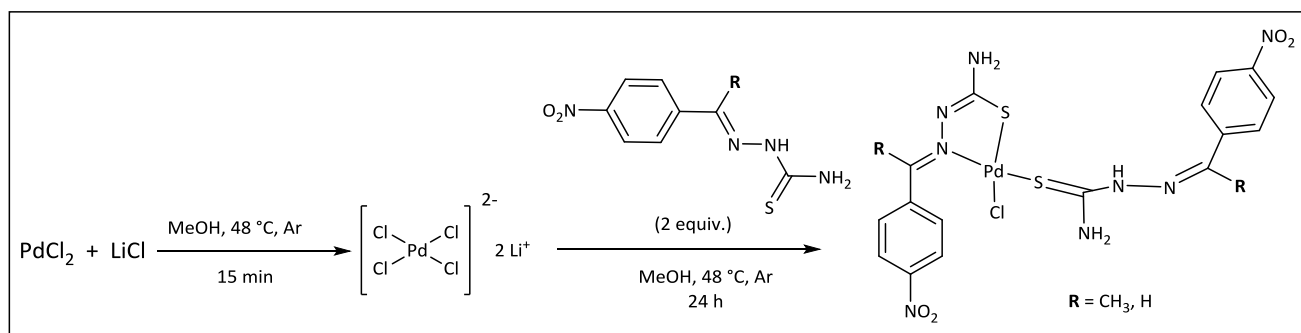


Figura 5.9. Síntesis de los complejos mononucleares de Pd con los ligandos N_HNO₂TSCNMe y N_HNO₂TSCN.

En estos complejos mononucleares, el ligando protonado se enlaza al Pd únicamente por el átomo de S, de tal modo que las señales del anillo aromático apenas se encuentran desplazadas con respecto a las del ligando libre. Por su parte, el ligando sin protonar actúa como bidentado y, al encontrarse más cercano al Pd y al ligando cloruro, estas señales aparecen más desapantalladas con respecto al ligando libre. Esto se observa claramente en el espectro de ¹H RMN de la Figura 5.10, correspondiente al complejo **Pd(N_HNO₂TSCNMeH)N_HNO₂TSCNMeCl**.

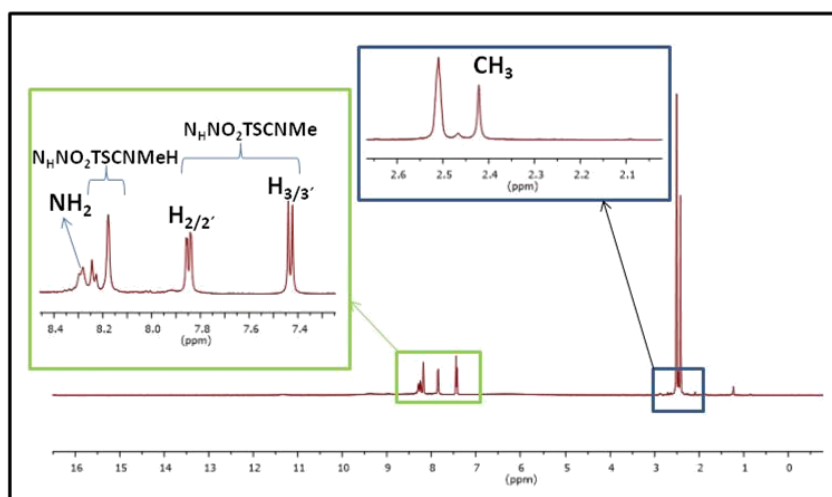


Figura 5.10. Espectro de ^1H RMN del complejo $\text{Pd}(\text{N}_\text{H}\text{NO}_2\text{TSCNMeH})\text{N}_\text{H}\text{NO}_2\text{TSCNMeCl}$.

5.2.2.3 Complejos ciclometalados

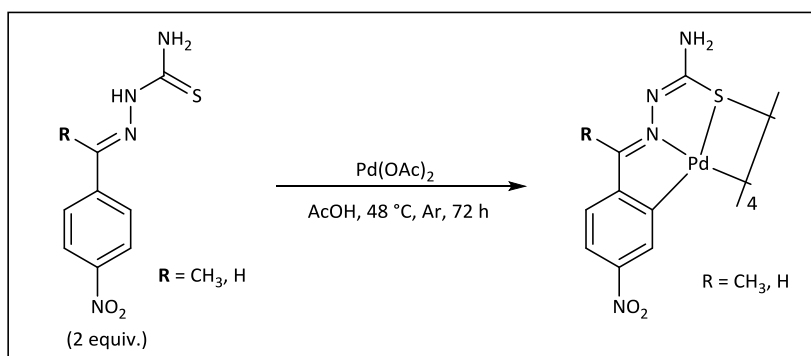


Figura 5.11. Síntesis de complejos ciclometalados.

Se han ensayado, a diferentes estequiometrías, temperaturas y tiempos de reacción, las reacciones de los ligandos $\text{N}_\text{H}\text{NO}_2\text{TSCNMe}$ y $\text{N}_\text{H}\text{NO}_2\text{TSCN}$ con $\text{Pd}(\text{OAc})_2$, que dieron lugar a la formación de las especies tetranucleares $[\text{Pd}(\text{N}_\text{H}\text{NO}_2\text{TSCNMe})]_4$ y $[\text{Pd}(\text{N}_\text{H}\text{NO}_2\text{TSCN})]_4$, respectivamente (Figura 5.11). El espectro de ^1H RMN del complejo $[\text{Pd}(\text{N}_\text{H}\text{NO}_2\text{TSCNMe})]_4$ (Figura 5.12, izquierda) muestra la desaparición de la señal del protón H_3 como consecuencia de la ciclometalación. Esto provoca un cambio en la multiplicidad de la señal del H_2 , que aparece ahora como un singlete, ya que la ciclometalación rompe la simetría del sistema $\text{AA}'\text{BB}'$. En estos complejos tetranucleares, el ligando actúa como tridentado, enlazándose al metal a través de los átomos de S, N imínico y C en del grupo fenilo posición orto. Por ello, en el espectro de ^1H RMN desaparece la señal del grupo NH al producirse su desprotonación.

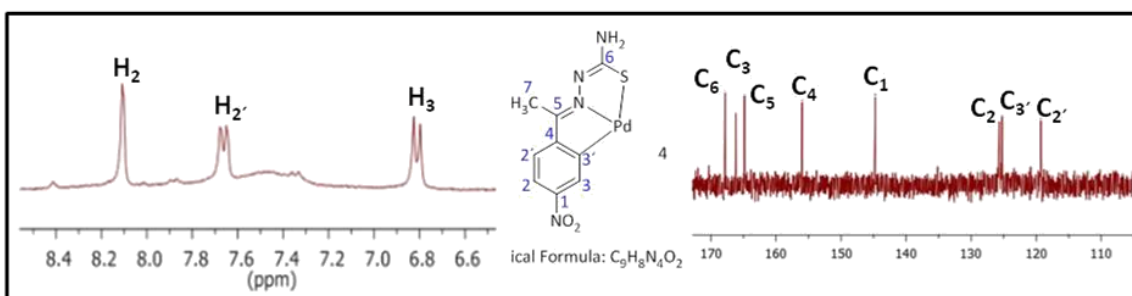


Figura 5.12. Espectros de ^1H RMN (izquierda) y de ^{13}C RMN (derecha) del complejo $[\text{Pd}(\text{N}_\text{H}\text{NO}_2\text{TSCNMe})]_4$.

Los protones aromáticos se encuentran típicamente apantallados respecto del ligando libre como consecuencia de la retrodonación metal-ligando, puesto que el Pd^{II} (d^8) es una especie rica en electrones⁵⁵. Las señales más afectadas son las que corresponden a los protones H_3 y H_2 (posiciones *meta* y *para*, respectivamente). En el espectro de ^{13}C RMN de este complejo (Figura 5.12, derecha), la señal del C_3 sufre un claro desapantallamiento con respecto a la de ligando libre ($\Delta\delta = -38.6$ ppm), causado por la paladación en esa posición⁵⁶.

En la caracterización del complejo $[\text{Pd}(\text{N}_\text{H}\text{NO}_2\text{TSCN})]_4$, el espectro de ^1H RMN (Figura 5.13) presenta, además del sistema de tres protones del anillo aromático, el singlete correspondiente al H_7 a 7.05 ppm, muy apantallado con respecto al del ligando libre, consecuencia de la paladación.

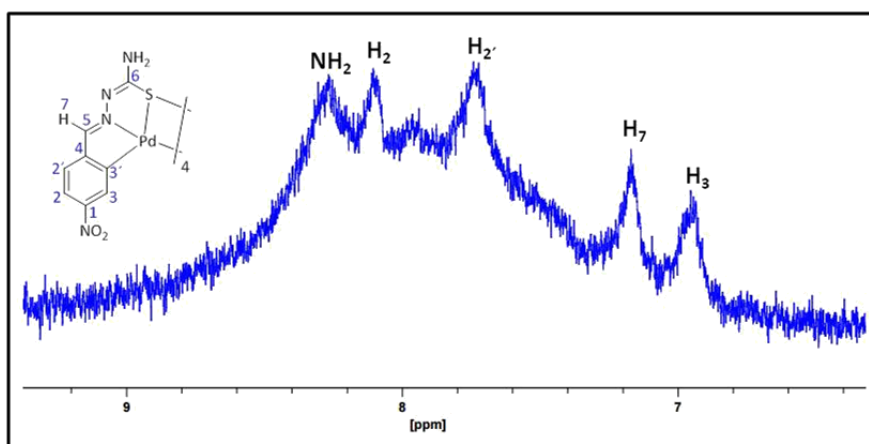


Figura 5.13. Espectro de ^1H RMN del complejo $[\text{Pd}(\text{N}_\text{H}\text{NO}_2\text{TSCN})]_4$.

La estructura del complejo $[\text{Pd}(\text{N}_\text{H}\text{NO}_2\text{TSCNMe})]_4$ fue confirmada por difracción de rayos X, como se muestra en la Figura 5.14:

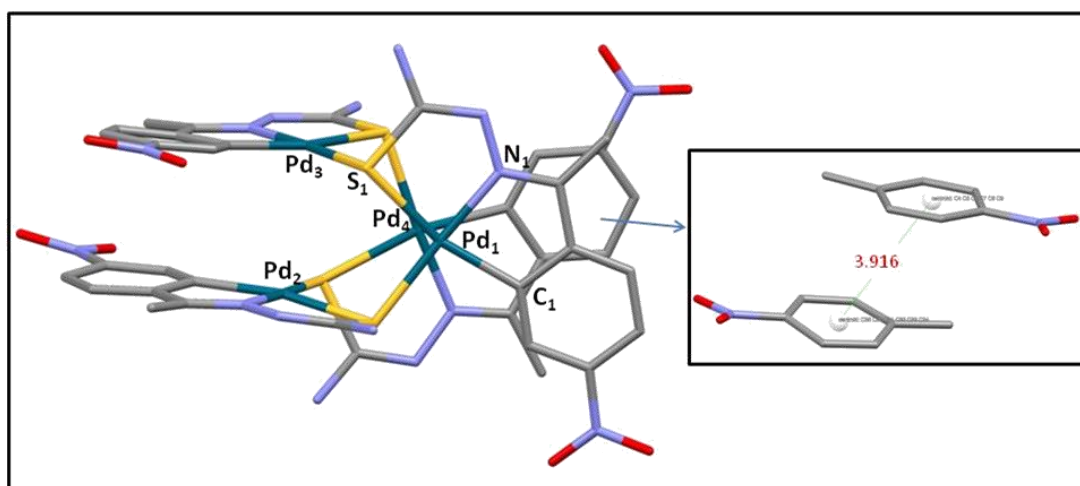


Figura 5.14. Estructura cristalina del complejo $[\text{Pd}(\text{N}_\text{H}\text{NO}_2\text{TSCNMe})]_4$ y ampliación de la región de los anillos aromáticos, con la distancia entre centroides.

Se observa claramente que la estructura es una unidad tetramérica. La geometría en torno a los cuatro centros de Pd^{II} cristalográficamente independientes, es casi plano-cuadrada, y se aprecia como los ligandos TSCN actúan como tridentados, enlazándose al metal a través de los átomos de S, N imínico y C del grupo fenilo. El núcleo de cada unidad monomérica (que hemos definido por números del Pd₁ al Pd₄) consiste en un anillo de ocho miembros, en el que se alternan los átomos de Pd y de S. Los dos sitios de coordinación restantes de cada esfera de coordinación plano-cuadrada están ocupados por el N imínico y el C *orto* del grupo fenilo. Los dos anillos quelato de cinco miembros que envuelven al catión metálico también son coplanares. Podemos realizar un estudio comparativo entre esta estructura y la del complejo tetranuclear de Pd (Figura 5.6, complejo C2), sintetizado previamente por el grupo de investigación⁴⁴.

Tabla 5.1. Longitudes y ángulos de enlace seleccionados para las especies $[\text{Pd}(\text{N}_\text{H}\text{NO}_2\text{TSCNMe})]_4$ y C2.

Longitudes de enlace seleccionadas (Å)			
$[\text{Pd}(\text{NHNO}_2\text{TSCNMe})]_4$		C2	
Pd-S _n	2.354(4) - 2.369 (4)	Pd-S _n	2.364(4) - 2.364(4)
Pd-S _m	2.314(4) - 2.389(4)	Pd-S _m	2.306(6) - 2.316(5)
Pd-N	1.989(12) - 2.009(12)	Pd-N	1.98(2) - 1.99(2)
Pd-C	2.000(15) - 2.016 (14)	Pd-C	1.99(2) - 2.02(2)
Ángulos de enlace seleccionados (°)			
$[\text{Pd}(\text{NHNO}_2\text{TSCNMe})]_4$		C2	
S-Pd-S	98.45(14) - 100.24(14)	S-Pd-S	99.4(2) - 102.5(2)
Pd-S-Pd	105.61(15) - 109.62(15)	Pd-S-Pd	106.4(3) - 109.9(2)

Las distancias de enlace Pd-N en el anillo de cinco miembros del complejo $[\text{Pd}(\text{N}_\text{H}\text{NO}_2\text{TSCNMe})]_4$ son superiores a las distancias Pd-N del complejo C2; las distancias Pd-C en ambas especies se encuentran en el rango de otros complejos descritos³ (Tabla 5.1). La influencia *trans* del C ortometalado se refleja en el alargamiento del enlace Pd-S en ambas estructuras en posición *trans* al átomo de C.

Aunque tienen similitudes, ambas estructuras presentan importantes diferencias:

1) Aunque la orientación espacial que adquieren los anillos aromáticos es casi coplanar de dos en dos (unidad 1 con 4 y unidad 2 con 3), la distancia entre el centroide de cada anillo en el complejo $[\text{Pd}(\text{N}_\text{H}\text{NO}_2\text{TSCNMe})]_4$ (Figura 5.14) es inferior a la de C2, y sugieren la existencia de una posible interacción entre ellos no covalente de tipo π - π ⁵⁷.

2) Con respecto al anillo de ocho miembros (Figura 5.15), encontramos diferencias en los ángulos S-Pd-S y Pd-S-Pd, que son menores en el complejo $[\text{Pd}(\text{N}_\text{H}\text{NO}_2\text{TSCNMe})]_4$, al igual que las distancias de enlace Pd-Pd, haciendo que este complejo presente una estructura tipo bote mucho más cerrada. Estas diferencias en los ángulos y distancias de enlace también pueden estar directamente relacionadas con la accesibilidad del centro metálico a la diana biológica de los complejos, siendo C2 más accesible, lo que podría concordar con sus buenos datos de actividad citotóxica⁴⁴.

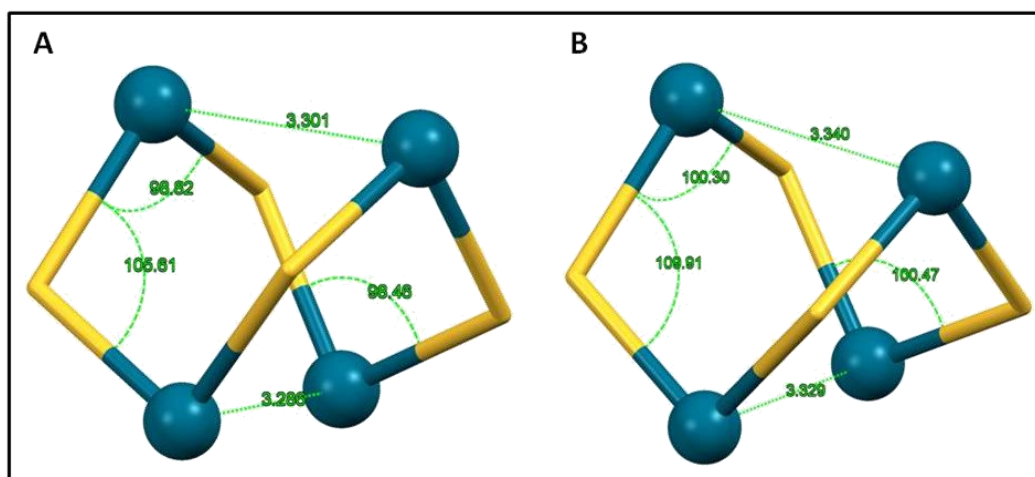


Figura 5.15. Anillo de 8 miembros de: A) complejo $[\text{Pd}(\text{N}_\text{H}\text{NO}_2\text{TSCNMe})]_4$ y B) complejo C2 (Figura 5.6).

Por otra parte, estas dos estructuras son parecidas a la del complejo tetranuclear de Pt con el ligando *p*-isopropilbenzaldehído TSCN (complejo C1, Figura 5.6B), publicada previamente por nuestro grupo de investigación⁴⁴. El anillo de ocho miembros en este complejo tiene distancias y ángulos de enlace inferiores a las del complejo C2, pero mayores que las del complejo

$[\text{Pd}(\text{N}_\text{H}\text{NO}_2\text{TSCNMe})]_4$, por lo que presenta una conformación tipo bote más parecida a la C2, lo que también puede estar relacionado con su buena actividad antiproliferativa. El hecho de que las distancias y ángulos de enlace en el complejo C1 sean inferiores a las de C2, resulta lógico por el mayor tamaño del átomo de Pt.

5.2.3 Estudio del comportamiento en disolución y lipofilidad de complejos metálicos con ligandos TSCN

Hemos utilizado los cuatro complejos de Pd^{II} descritos anteriormente para analizar su interacción frente a biomoléculas. Además, hemos escogido otros complejos: uno tetranuclear de Pd^{II} y tres complejos de Pt^{II} (dos tetranucleares y uno mononuclear) sintetizados previamente en el grupo de investigación, para realizar un estudio comparativo de la reactividad con un metal típicamente antitumoral. Todos ellos se muestran en la Figura 5.16:

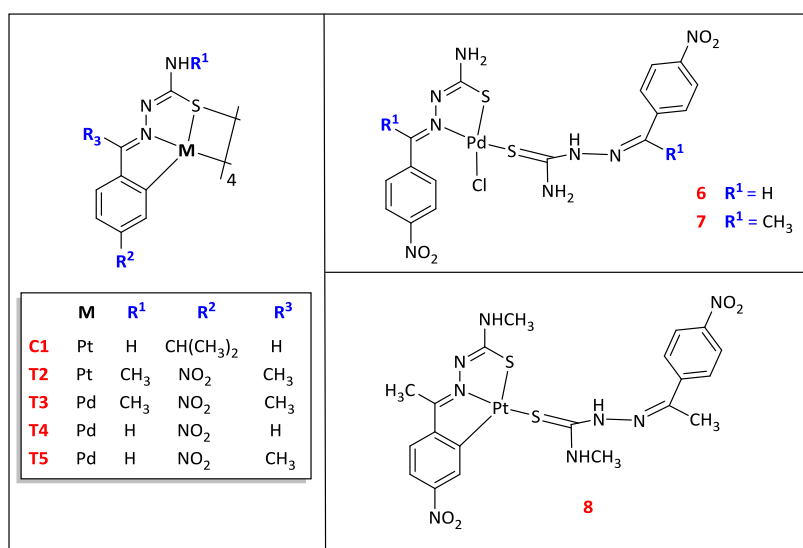


Figura 5.16. Complejos seleccionados para el estudio de interacción con moléculas biológicas.

5.2.3.1 Determinación de la estabilidad en disolución de los complejos.

La estabilidad de estos complejos se ha evaluado tanto por RMN a 0 y 24 h, como por espectroscopía UV-Vis, con el objetivo de encontrar las condiciones óptimas de solubilidad en un medio capaz de simular el entorno biológico. Los ensayos por espectroscopía UV-Vis se realizaron registrando los espectros a distintos tiempos (0, 0.5, 1, 2, 4, 6 y 24 h) y aplicando un barrido de λ de 800 a 200 nm. Se utilizó una disolución tampón fosfato (50 mM, pH = 7.4), que mimetiza las condiciones del medio celular, aunque fue necesario utilizar una cantidad de DMSO superior que la

usada en ensayos de citotoxicidad para conseguir solubilizar la cantidad necesaria de complejo para estos ensayos (ver sección experimental).

Como el tampón fosfato no es el más apropiado para la técnica ESI MS (fundamental en estudios de caracterización con proteínas), los ensayos de estabilidad se realizaron también en tampón acetato amónico (AcNH_4). En la Figura 5.17 se presenta un ejemplo con el complejo **C1**, poniéndose de manifiesto que ambas condiciones son válidas. Hay que destacar que este complejo presenta los mejores perfiles de absorción en ambas disoluciones (fosfato, Figura 5.17a; y AcNH_4 , Figura 5.17b) con dos máximos a 241 y 295 nm. Los espectros de absorción del resto de complejos mostraron que la absorbancia de los mismos disminuye notablemente con el tiempo. El complejo **T5** se encontraba precipitado a las 6 h.

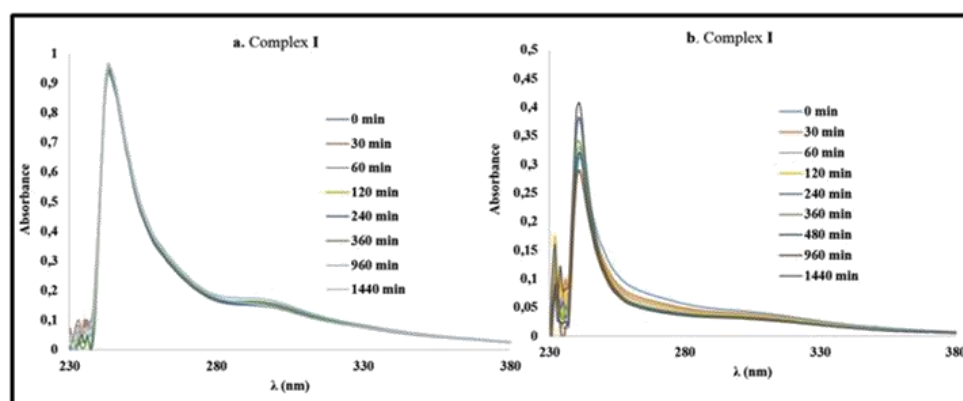


Figura 5.17. Espectros de UV-Vis dependiente del tiempo del complejo C1 (10^{-4} M) en (a) disolución tampón fosfato (50 mM, pH 7.4) y b) disolución tampón AcNH_4 (20 mM pH 6.8) a distintos tiempos.

5.2.3.2 Cálculo de la constante de estabilidad de los complejos

Los espectros de UV-Vis permiten analizar la cinética de estabilidad de los complejos en las condiciones más favorables (Figura 5.17B). Representando la variación de la absorbancia (al máximo de absorción para cada complejo) frente al tiempo, se obtiene una función que decae monoexponencialmente, y este proceso puede estudiarse como una reacción de pseudo-primer orden, dado por la ecuación $Abs = Abs_0 \cdot e^{-kt}$.

En la gráfica de la Figura 5.18 se muestra dicha función para el complejo **T2** en AcNH_4 . El ajuste teórico permite obtener el parámetro necesario (t_1) para el cálculo de la constante de estabilidad k_{obs} .

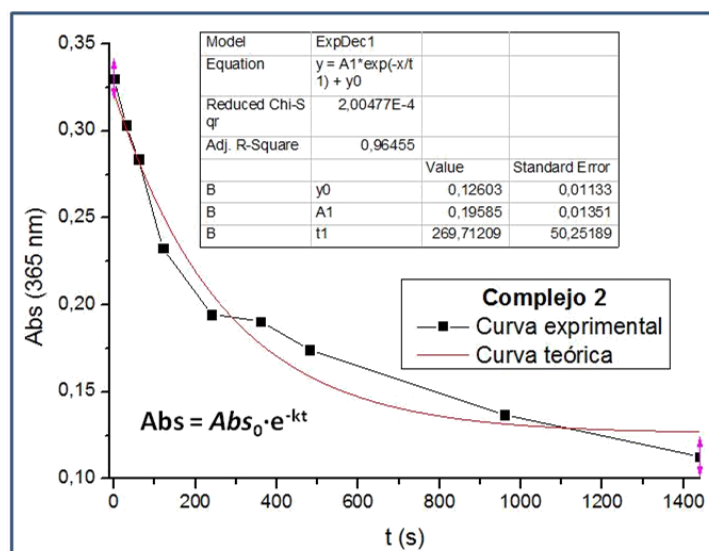


Figura 5.18. Función monoexponencial de la cinética de estabilidad del complejo T2 en disolución tampón AcNH₄ (20 mM pH 6.8) y 15% DMSO.

Los valores de K_{obs} para cada complejo en AcNH₄ se muestran en la Tabla 5.2 ¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.:

Tabla 5.2. Valores de K_{obs} ($\times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$) para los complejos en buffer acetato amónico (20 mM, pH = 6.8) y 15% DMSO.

Complejo	Fórmula	K_{obs} (en disolución)
C1	[Pt(N _H iSTSCN)] ₄	0.22
T2	[Pt(N _{Me} NO ₂ TSCNMe)] ₄	0.42
T3	[Pd(N _{Me} NO ₂ TSCNMe)] ₄	0.20
T4	[Pd(N _H NO ₂ TSCN)] ₄	0.17
T5	[Pd(N _H NO ₂ TSCNMe)] ₄	3.7
M6	PdCl(N _H NO ₂ TSCN)LH	0.18
M7	PdCl(N _H NO ₂ TSCNMe)LH	0.14
M8	Pt(N _{Me} NO ₂ TSCNMe)LH	0.79

Los complejos **T5** (tetranuclear) y **M8** (mononuclear) presentan un valor de K_{obs} superior al descrito para el cisplatino en la bibliografía⁵⁸ ($4.45 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$), lo que podría sugerir una menor estabilidad en disolución y, con ello, una reactividad mayor. El complejo **T2** (tetranuclear), presenta un valor de estabilidad similar a la del cisplatino, mientras que el resto de complejos tienen valores de K_{obs} inferiores, por lo que son más estables en disolución. Es importante destacar que los complejos mononucleares de Pd **M6** y **M7**, que tan sólo difieren en la presencia de un H (**M6**) y CH₃ (**M7**) presentan valores muy parecidos entre sí, por lo que su estabilidad en disolución es muy

similar. El otro complejo mononuclear de Pt, **M8**, tiene un valor de K_{obs} bastante superior al de **M6** y **M7**, por lo que es más estable en disolución. Mientras que este complejo presenta un enlace M-C, **M6** y **M7** tienen enlaces M-Cl, más lábiles, lo que podría ser la causa de su mayor estabilidad en disolución con respecto a **M6** y **M7**.

5.2.3.3 Determinación de la lipofilidad (Log P)

Procedimos a la determinación de la lipofilicidad de los complejos, midiendo la concentración de complejo que existe en cada fracción de una mezcla de octanol y agua. Para la obtención de Log P de cada complejo, se midió su absorbancia (al máximo de absorción) por UV-Vis en ambos medios (n-octanol y agua), como se detalla en la sección experimental. Estos valores se muestran en la Tabla 5.3:

Tabla 5.3. Valores de Log P calculados para los complejos 1-8.

Complejo	Fórmula	Log P
C1	$[\text{Pt}(\text{N}_\text{H}\text{i}\text{sTSCN})]_4$	1.47
T2	$[\text{Pt}(\text{N}_\text{Me}\text{NO}_2\text{TSCNMe})]_4$	2.82
T3	$[\text{Pd}(\text{N}_\text{Me}\text{NO}_2\text{TSCNMe})]_4$	2.78
T4	$[\text{Pd}(\text{N}_\text{H}\text{NO}_2\text{TSCN})]_4$	1.54
T5	$[\text{Pd}(\text{N}_\text{H}\text{NO}_2\text{TSCNMe})]_4$	1.88
M6	$\text{PdCl}(\text{N}_\text{H}\text{NO}_2\text{TSCN})\text{LH}$	2.74
M7	$\text{PdCl}(\text{N}_\text{H}\text{NO}_2\text{TSCNMe})\text{LH}$	2.46
M8	$\text{Pt}(\text{N}_\text{Me}\text{NO}_2\text{TSCNMe})\text{LH}$	2.30

Todos los complejos presentan valores positivos de Log P , siendo altamente lipófilos, por lo que hay más cantidad de complejo en la fracción de octanol. Además, los complejos **T2**, **T3**, **M6**, **M7** y **M8** muestran valores de Log P muy similares, y mayores que los de **C1**, **T4** y **T5** (tetranucleares) por lo que estos últimos son menos lipófilos. Todos los valores de Log P obtenidos son muy diferentes del descrito para el cisplatino (-2.4) en la bibliografía⁵⁸, lo que resulta lógico ya que todos son complejos de mayor peso molecular.

5.2.4 Estudios de interacción de los complejos frente a proteínas

Tras la determinación de las condiciones óptimas de disolución de los complejos, de su estabilidad y lipofilicidad, abordamos el estudio de su interacción con moléculas biológicas.

La interacción de complejos metálicos con proteínas ha cobrado un renovado interés en los últimos años, puesto que estas biomoléculas se consideran cruciales para la farmacocinética, biodistribución, procesos de resistencia y toxicidad de metalofármacos⁵⁹. Cisplatino y transplatino han mostrado formación de aductos con modelos como la lisozima, con las diferencias esperadas para su estructura⁶⁰⁻⁶². Como se comentó en el capítulo 1, los complejos de Pt^{II} con estructura no convencional y ligandos yoduro, no sólo formaban aductos con proteínas, sino que también perdían los ligandos amina⁶³.

Con estos antecedentes, decidimos investigar la interacción de los complejos frente a dos modelos de proteínas: lisozima de huevo de gallina (HEWL) y ribonucleasa de páncreas bovino (RNasa A), ya que ambas interaccionan con cisplatino, oxaliplatino y carboplatino, y sus aductos están completamente caracterizados por las técnicas de difracción de rayos X y espectrometría ESI MS⁶⁴.

La enzima **lisozima** fue descubierta por Alexander Fleming en 1922. Está constituida por 129 aminoácidos y tiene un peso molecular de 14305 Da⁶⁵. El huevo de gallina es la fuente más rica en esta proteína (3,5% del total de las proteínas presentes en el mismo), la cual presenta actividad antimicrobiana. Se comercializa a nivel mundial para el control de bacterias en productos cárnicos, de *Clostridium tyrobutyricum* en quesos y de bacterias en vinos y cervezas (*Lactobacillus*)⁶⁵.

El cisplatino y sus derivados forman aductos y suelen unirse mayoritariamente al N_ε del anillo de imidazol del aminoácido histidina (His-15), y en menos frecuencia, al S del grupo tioéter de una metionina (Met-12 ó Met-105)⁵⁹, como se muestra en la Figura 5.19.

Las **ribonucleasas** son enzimas que degradan secuencias de ARN. La RNasa A fue elegida como modelo para su estudio de interacción con metalofármacos debido a su gran estabilidad, pequeño tamaño (13682 Da), se encuentra totalmente caracterizada y comercialmente asequible por su bajo precio⁶⁶. La estructura de los aductos principales que esta proteína forma con cisplatino han sido publicados recientemente⁶⁷, y se sabe que los sitios de unión más frecuentes del cisplatino en esta enzima son His-105, His-119, Met-129 y Gln-28⁶⁴.

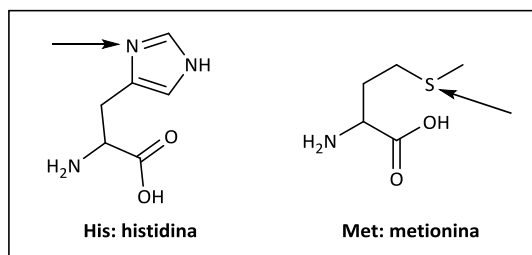


Figura 5.19. Estructura de los aminoácidos Hys y Met y lugar común de coordinación del catión metálico.

Así, procedimos a estudiar la afinidad de los complejos metálicos frente a estas dos proteínas por espectroscopía UV-Vis y, en la medida que fue posible, por espectrometría de masas.

5.2.4.1 Estudios de la afinidad de los complejos por lisozima y RNasa por UV-Vis

La monitorización por espectroscopía UV-Vis se realizó durante 24 h en una relación 3:1 (metal proteína), tal y como se describe en la sección experimental. Este estudio también se realizó con cisplatino, al no haber encontrado sus valores de afinidad con lisozima y RNasa A por espectroscopía UV-Vis (tan sólo de ESI MS).

Tras analizar los espectros de UV-Vis, se puede confirmar que, en general, la presencia de estas proteínas aumenta ligeramente la absorción del complejo. Nuevamente, el complejo **C1** mostró los mejores perfiles de absorción, tanto con Lisozima como con RNasa y, además, no se detectó precipitación de las muestras con el tiempo, con excepción del complejo **T5**, que como ya ocurrió en el estudio de la estabilidad, tras 6 h ya estaba totalmente precipitado (Figura 5.20).

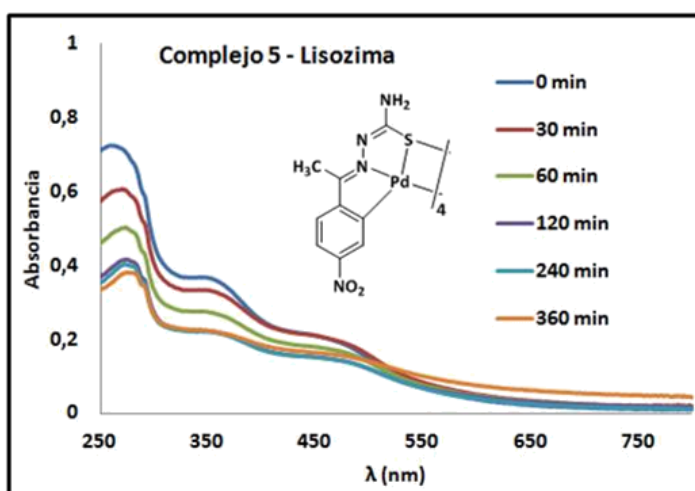


Figura 5.20. Espectro de UV-Vis dependiente del tiempo del complejo 5 (10^{-4} M) con lisozima (3:1) en AcNH_4 (20 mM, pH 6.8).

La constante de afinidad de cada complejo por las proteínas se calculó como la constante de estabilidad, puesto que la absorbancia también decae monoexponencialmente con el tiempo. Así, tras el ajuste teórico, se pudo realizar un análisis comparativo del valor K_{obs} (hallado y discutido en el apartado 5.2.3.2) y las constantes de afinidad por lisozima (K_{obsL}) y RNasa (K_{obsR}) (Tabla 5.4).

Tabla 5.4. Valores de K_{obsL} y K_{obsR} ($\times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$) para los complejos (10^{-4} M) y su interacción con lisozima y RNasa en buffer AcNH_4 (20 mM, pH = 6.8) y 15% DMSO.

Complejo	Fórmula	K_{obsL} (Lisozima)	K_{obsR} (RNasa)	K_{obsL} (Lisozima)	K_{obsR} (RNasa)
		6 h	6 h	24 h	24 h
C1	$[\text{Pt}(\text{N}_\text{H}\text{i}\text{sTSCN})]_4$	1.1	1.7*	0.73	0.54
T2	$[\text{Pt}(\text{N}_\text{Me}\text{NO}_2\text{TSCNMe})]_4$	0.97	0.42	0.83	0.85
T3	$[\text{Pd}(\text{N}_\text{Me}\text{NO}_2\text{TSCNMe})]_4$	0.42	0.2*	0.24	0.49
T4	$[\text{Pd}(\text{N}_\text{H}\text{NO}_2\text{TSCN})]_4$	1.2	1.6	0.15	0.16
T5	$[\text{Pd}(\text{N}_\text{H}\text{NO}_2\text{TSCNMe})]_4$	2.6	2.9	-	-
M6	$\text{PdCl}(\text{N}_\text{H}\text{NO}_2\text{TSCN})\text{LH}$	0.95	0.16	0.24	0.16
M7	$\text{PdCl}(\text{N}_\text{H}\text{NO}_2\text{TSCNMe})\text{LH}$	0.94	0.95	0.45	0.17
M8	$\text{PtCl}(\text{N}_\text{Me}\text{NO}_2\text{TSCNMe})\text{LH}$	1.2*	0.79	0.28	0.63
cisplatino	<i>cis</i> -DDP	1,98*	1.88*	-	-

El * indica que estos valores fueron obtenidos tras realizar un ajuste lineal.

A tiempos cortos de reacción (Tabla 5.4, 6 h):

- Los complejos tetrámeros de Pd con sustituyentes nitro, muestran una afinidad por las dos proteínas en orden creciente $\text{T3} < \text{T4} < \text{T5}$, y sus diferencias estructurales se muestran en la Figura 5.21. El complejo **T3** tiene dos grupos metilo, uno enlazado al grupo imino y otro al grupo -NH, mientras que en el complejo **T4**, los H sustituyen a estos dos grupos -CH₃. La especie **T5** tiene un grupo NH₂ y un metilo enlazado al grupo imino, por lo que se deduce que es este -CH₃ el que genera la mayor afinidad de este complejo por las dos proteínas, mientras que el -CH₃ unido al grupo -NH en el complejo **T3**, no participa en esta afinidad.

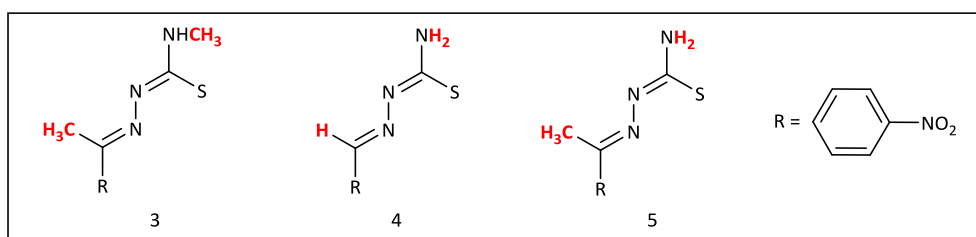


Figura 5.21. Diferencias estructurales entre los complejos tetranucleares **T3**, **T4** y **T5**.

- El complejo tetranuclear de Pt^{II} (**T2**) con sustituyente nitro es más activo que su análogo de Pd^{II} (**T3**), lo que puede estar relacionado por la mayor afinidad del Pt por el S, muy presente en proteínas. Por su parte, el complejo ciclometalado de Pt^{II} (**C1**) tiene valores de afinidad por las dos enzimas intermedios en la serie de las especies tetranucleares. Este es el único complejo que posee un grupo isopropilo en la posición 4 del anillo aromático, y del que ya habíamos reportado excelentes resultados de actividad citotóxica⁴⁴.
- Únicamente el complejo **T5** tiene mayor afinidad por las proteínas que el cisplatino, y presenta valores de K_{obsL} y K_{obsR} similares.
- Los complejos mononucleares **M7** y **M8** presentan valores de afinidad por lisozima muy similares, aunque la especie mononuclear **M8** tiene baja afinidad por RNasa.

A tiempos largos de reacción (Tabla 5.4, 24 h), la absorbancia de los complejos ha disminuido, debido a la disminución de complejo intacto, si bien la afinidad del complejo **T2** de Pt^{II} por RNasa ha aumentado considerablemente, al igual que su análogo de Pd^{II}, **T3**.

5.2.4.2 Estudio de la interacción del complejo **C1** con proteínas mediante ESI MS

Una vez analizada la afinidad de los complejos por Lisozima y RNasa, nos propusimos caracterizar el tipo de aductos que pueden formar, mediante la técnica de ESI MS. Se eligió el complejo **C1**, ya que había mostrado los mejores perfiles de absorción por UV-Vis y valores relativamente altos de afinidad con ambas proteínas. Puesto que este complejo es más afín por lisozima (Tabla 5.4), estos estudios se realizaron con dicha enzima.

Inicialmente se analizó la influencia del disolvente, realizando un estudio comparativo de la reactividad del complejo **C1** incubado con lisozima (1:1) en disolución tampón AcNH₄, utilizando 15% de DMSO (Figura 5.22A) y 15% de DMF (Figura 5.22B). El espectro del complejo en DMF presentó un perfil de ionización menor que el realizado en DMSO, con una intensidad de señales hasta 90 veces menor. En ambos casos, el ion molecular es el de la proteína nativa, por lo que parece que existe una mayor parte de proteína intacta. En el caso del DMSO, la segunda señal más intensa está a 14703.76 (pérdida de -399.88 con respecto a la señal de la proteína nativa), mientras que en el espectro de DMF, la segunda señal más intensa y de mucha menos abundancia, está a 14752.55 Da (pérdida de -448.77 Da). Todas las demás señales son prácticamente insignificantes. A

pesar de que no fuimos capaces de asignar la segunda señal, esta no tiene distribución isotópica de Pt, lo que parece indicar que el disolvente no es un mero espectador, produciendo diferencias en los pesos moleculares.

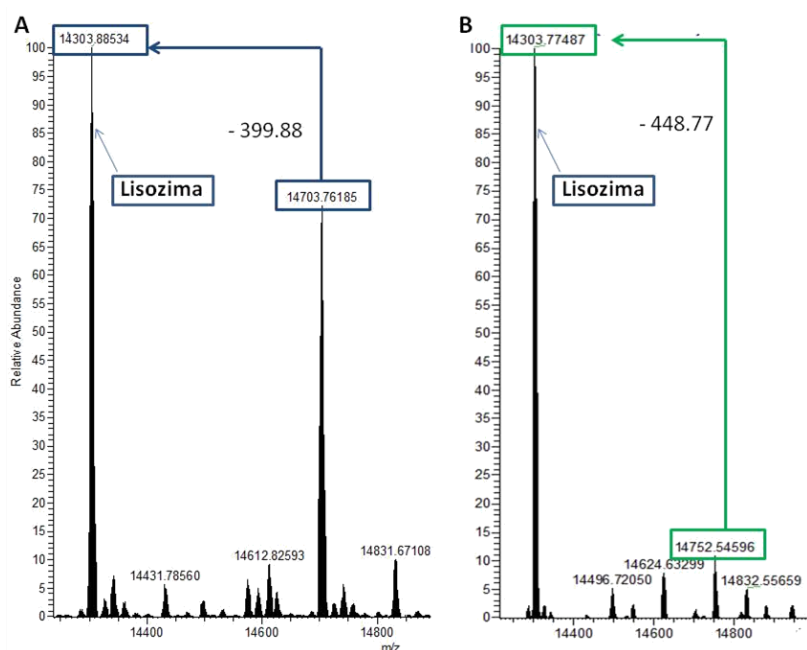


Figura 5.22. Espectros de ESI MS del complejo C1 (10^{-4} M) con lisozima (1:1) en A) 15% DMSO y B) 15% DMF, utilizando el tampón AcNH_4 (20 mM pH 6.8) tras 6 h a 37°C .

En otro experimento, utilizamos agua acidulada (pH 5.5) y 15% DMF, e incubando durante 6 h, para comprobar si este disolvente en otro medio distinto al tampón AcNH_4 , podría tener una mayor influencia en la reactividad. Se obtuvo un espectro similar al de la Figura 5.22B, por lo que el DMSO parece ser el disolvente más adecuado para la realización de estos ensayos.

Para conseguir un mayor perfil de ionización, se reemplazó el tampón de AcNH_4 por ácido acético (AcOH) (pH 4.5), y 15% de DMSO, incubando las muestras durante 6 y 24 h (Figura 5.23A y B, respectivamente). El AcOH , aunque es un ácido débil, cede fácilmente H^+ , generando una mayor ionización. El tiempo de reacción no influye en el resultado, ya que ambos espectros son iguales al espectro A de la Figura 5.22. Sin embargo, el AcOH genera una pérdida en la integridad de la lisozima de hasta un 70%, ya que el ion molecular no es el de la proteína nativa, sino la señal a 14703 Da. Con un cambio tan drástico en la estabilidad, es evidente que el uso del AcOH no parece conveniente.

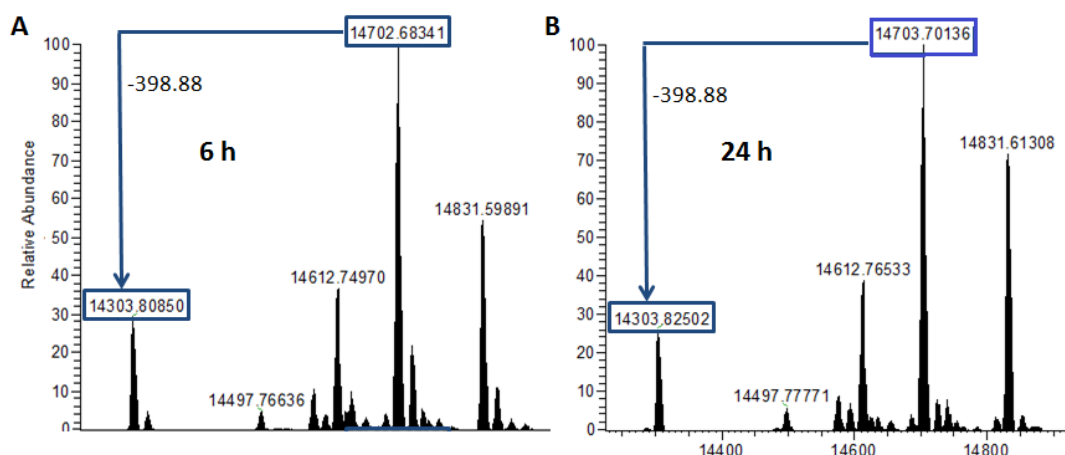


Figura 5.23. Espectros de ESI MS del complejo C1 (10^{-4} M) con lisozima (1:1) a A) 6 h y B) 24 h a 37 °C, utilizando el tampón AcNH_4 (20 mM pH 6.8) y 15% DMSO.

Intentando encontrar una explicación de lo que ocurría en estas reacciones, detectar los aductos complejo:proteína y/o comprender lo obtenido en las Figuras 5.22 y 5.23, decidimos aumentar tanto la concentración de complejo como el tiempo de reacción, con el objetivo de forzar la reactividad. De esta manera, analizamos la interacción del complejo **C1** con lisozima en una relación 3:1 (metal/proteína), en tampón AcNH_4 con 15% DMSO, a 37 °C y 48 h. La Figura 5.24 muestra un espectro mucho más complejo, pero finalmente con la aparición de señales con distribución isotópica de Pt.

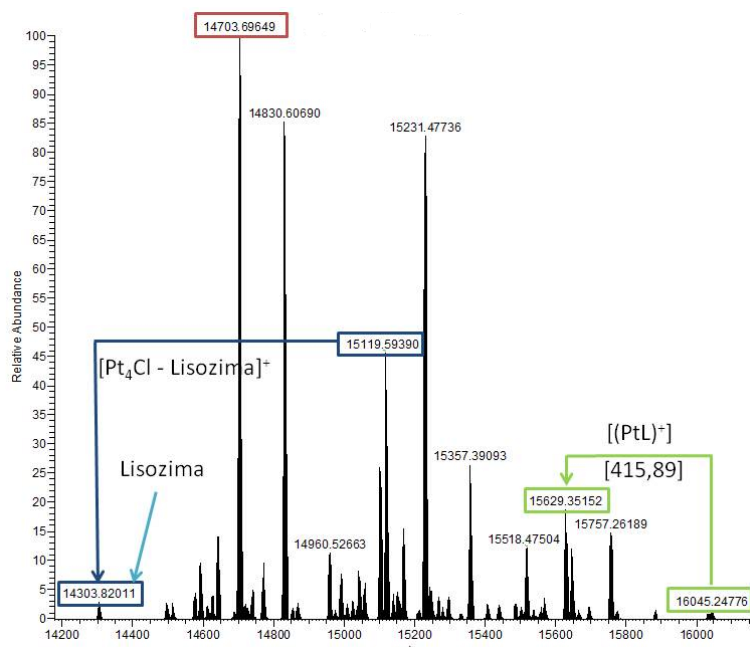


Figura 5.24. Espectro de ESI MS del complejo C1 (10^{-4} M) con lisozima (3:1) en tampón AcNH_4 (20 mM pH 6.8) y 15% DMSO tras 48 h a 37 °C.

Aunque no se consiguió detectar un aducto mayoritario, hemos podido asignar fragmentos monoméricos del complejo en las señales de la lisozima, lo que parece indicar que el tetrámero se rompe en presencia de la proteína. Hay una pérdida de 815.8 Da, que podría tratarse del fragmento $[\text{Pt}_4\text{Cl}(\text{lisozima})]^+$, y una pérdida de 415 Da, correspondiente al fragmento monomérico $[\text{PtL} + \text{H}^+]$. Así, aumentando la cantidad de complejo y tiempo, hemos logrado detectar nuevas señales con distribución isotópica de Pt.

Repetimos el experimento usando RNasa. La Figura 5.25 muestra un espectro aún más complicado que el de lisozima.

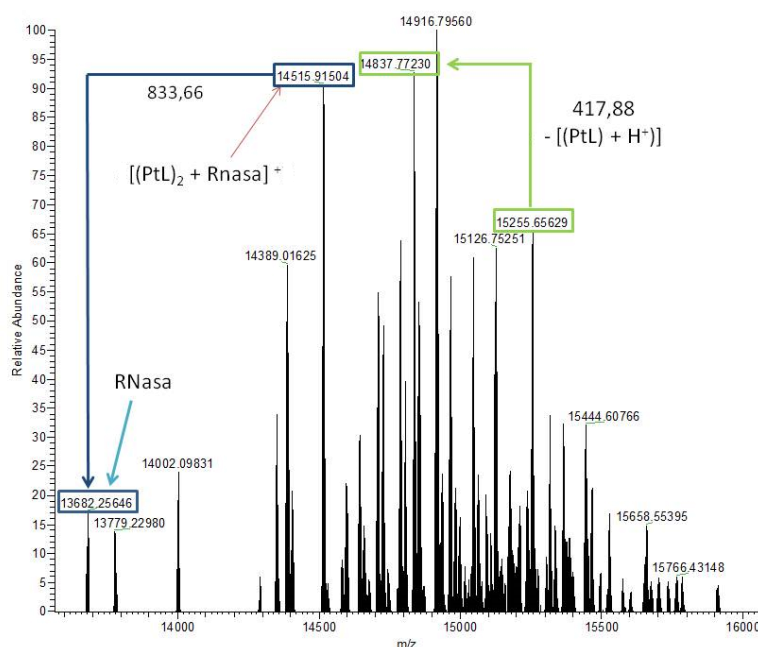


Figura 5.25. Espectro de ESI MS del complejo C1 (10^{-4} M) con RNasa (3:1) en tampón AcNH_4 (20 mM pH 6.8) y 15% DMSO tras 48 h a 37 °C.

La señal de 14515.91 Da tiene distribución isotópica de Pt y su peso molecular podría corresponder al aducto $[(\text{PtL})_2\text{-RNase}]^+$. La diferencia entre las señales de 15255.66 y 14837.77 se corresponde con la pérdida de un fragmento monomérico.

5.2.5 Estudios de interacción del complejo C1 con 1-metilimidazol

Para poder entender esta platinación, procedimos a analizar la reactividad del complejo C1 frente a modelos más pequeños, para poder asignar los posibles sitios de unión del metal.

Las proteínas se unen a los complejos metálicos a través de heteroátomos como N, O y S de ligandos biológicos. Los restos aminoácidos con grupos amido, amidato, amino, carbonil y carboxilato se sitúan en los extremos N o C-terminal de la cadena polipeptídica, y es a estos grupos a los que se coordinan los restos metálicos, uniones muy dependientes del pH del medio⁶⁸.

Como ya ha sido descrito previamente⁵⁹, el cisplatino se une a la lisozima únicamente a través de un residuo de His (His-15), mediante la coordinación del Pt al N_ε del anillo imidazólico.

Decidimos estudiar la reactividad del complejo **C1** frente al anillo de imidazol, eligiendo para ello la molécula de 1-metilimidazol (Melm) (Figura 5.26), que se ha usado en la bibliografía como modelo para evaluar la posible interacción con restos de His⁶⁹.

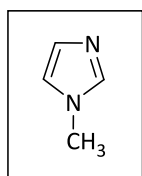


Figura 5.26. Estructura molecular del Melm.

5.2.5.1 Monitorización de la interacción del complejo 1 con Melm por ¹H-RMN

La reacción entre el complejo **C1** y Melm (1:2) se monitorizó por ¹H-RMN, a t = 0, 1, 2, 6 y 24 h, en una mezcla DMSO-d₆:D₂O (1:1).

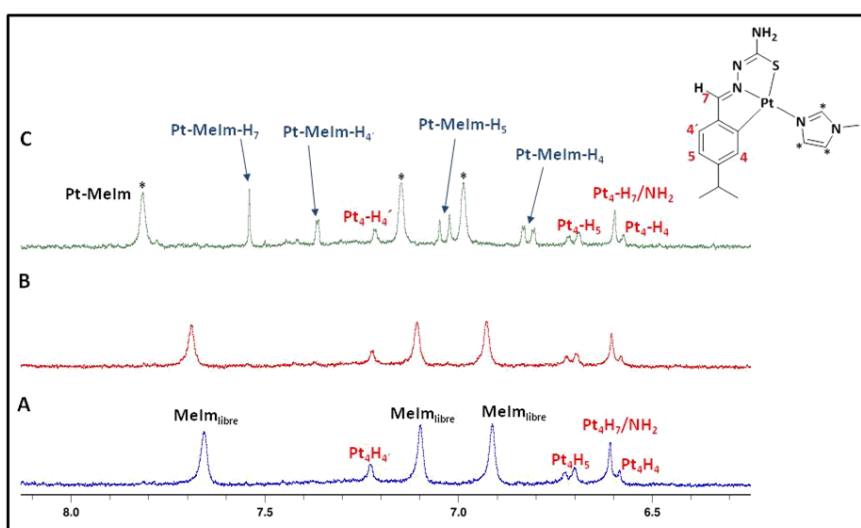


Figura 5.27. Región aromática de los espectros de ¹H-RMN de la reacción del complejo **C1** con Melm en las siguientes condiciones experimentales: A) complejo **C1**:Melm (1:2), 0 h; B) complejo **C1**:Melm (1:2), 2 h; C) complejo **C1**:Melm (1:2), 24 h.

En los espectros A y B de la Figura 5.27 se observa como el complejo tetranuclear permanece intacto durante las primeras horas de la reacción, no habiendo variación de las señales. Después de 24 h, el espectro C muestra la aparición de un nuevo grupo de señales (especie **Pt-Melm-H**) desapantalladas con respecto al complejo **C1**. La parte aromática es el área más afectada de la estructura ciclometalada, ya que está directamente enlazada al Pt, que será el que se coordine al Melm. También observamos un desapantallamiento de las señales del Melm con respecto a las del compuesto libre, posiblemente como consecuencia de su coordinación al Pt. Las señales del complejo tetranuclear de partida no han desaparecido del espectro, lo que indica que esta especie se encuentra en exceso, y que es necesaria una mayor cantidad del mismo para reaccionar con todo el Melm, y poder generar así el fragmento monomérico.

Tras confirmar la reactividad del complejo **C1** con Melm, intentamos obtener el fragmento monomérico para su completa caracterización, variando la estequiometría. Se repitió la reacción anterior en las mismas condiciones, añadiendo un exceso de Melm (1:8) tras 24 h, y se registró el espectro de ^1H RMN.

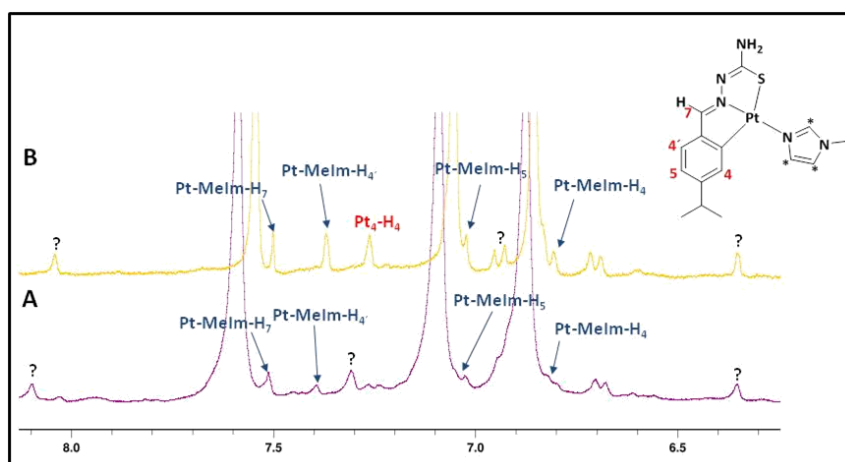


Figura 5.28. Región aromática de los espectros de ^1H -RMN de la reacción del complejo **C1** con Melm: A) complejo **C1**:Melm (**C1**:exceso), muestra sin lavar; B) complejo **C1**:Melm (1:2), tras precipitar con hexano.

En el espectro A de la Figura 5.28, tras la adición del exceso de Melm, aparecen nuevos grupos de señales, posiblemente correspondientes a fragmentos diméricos y monoméricos enlazados a Melm (?), por rotura del complejo tetranuclear. Para confirmar esta hipótesis, se extrajo una alícuota y se caracterizó por espectrometría de masas, mediante la técnica FAB.

El resto de la muestra se precipitó con agua y el sólido se lavó con hexano para retirar el exceso de Melm. Este sólido se caracterizó por ^1H RMN y espectrometría de masas FAB y ESI. El

espectro B de la Figura 5.28 muestra un aumento en la intensidad de las señales del complejo tetranuclear enlazado a Melm (**Pt-Melm-H**), lo que podría indicar que se ha producido una reasociación de los fragmentos para originar nuevamente el complejo tetranuclear enlazado a Melm.

En el espectro de masas por la técnica FAB (Figura 5.29) correspondiente a la muestra del espectro A de la Figura 5.28, aparece una señal a 497.2 (m/z), correspondiente al fragmento monomérico [**PtL(Melm) + H⁺**]. No hay otras señales a mayor m/z, por lo que la adición del exceso de Melm induce la ruptura del complejo tetranuclear en fragmentos monoméricos asociados a Melm, como ya parecía ocurrir en el espectro de ¹H RMN.

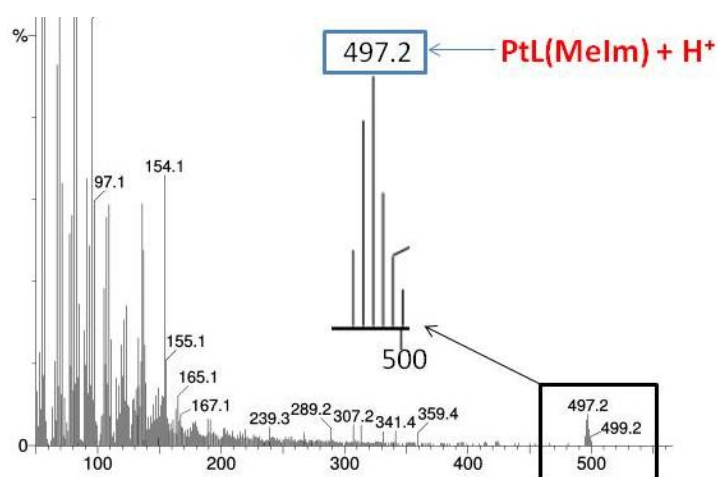


Figura 5.29. Espectro masas FAB de la muestra tras adición de exceso de Melm.

Por otra parte, tras caracterizar el sólido lavado con hexano (Espectro B, Figura 5.28) mediante FAB y ESI, se obtuvieron los espectros de la Figura 5.30. En el espectro de FAB (Figura 5.30A), aparecen señales correspondientes a: fragmento monomérico (**PtL(Melm) + H⁺**), a 497.1; fragmento dimérico (**(PtL)₂⁺**), a 828.0; fragmento dimérico asociado a Melm (**(PtL)₂Melm + H⁺**), a 911.1; trímero (**(PtL)₃ + H⁺**), a 1243.1; y tetrámero (**(PtL)₄ + H⁺**), a 1658.4. La existencia de estas señales confirmó la reasociación de las unidades monoméricas al retirar el exceso de Melm, para generar nuevamente el complejo ciclometalado, en un equilibrio controlado por la cantidad de Melm presente en el medio. En el espectro de ESI (Figura 5.30B) únicamente aparecen dos señales, que se corresponden con los fragmentos monomérico (**PtL(Melm) + H⁺**), a 497.1), y dimérico (**(PtL)₂Melm + H⁺**, 910.14), ambos asociados a Melm.

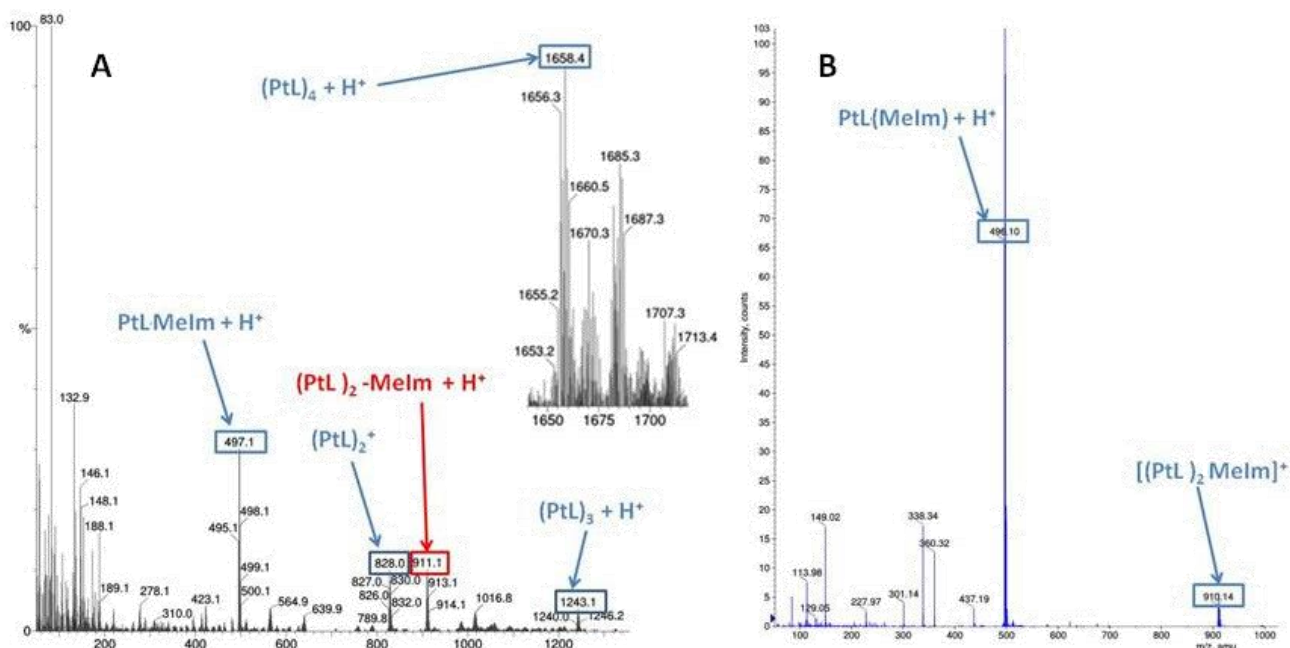


Figura 5.30. A) Espectros de FAB y B) ESI del sólido purificado tras ser lavado con hexano.

El hecho de que por ESI no se detecten las señales del trímero y del tetrámero, indica que esta técnica no es la más adecuada para identificar los fragmentos de alto peso molecular, como ya hemos observado en varias ocasiones con estos complejos.

En base a lo discutido hasta este punto, sugerimos una vía de rupturas y reasociaciones de la unidad tetramérica que pueden ocurrir en presencia de MeIm, y que se muestra en la Figura 5.31:

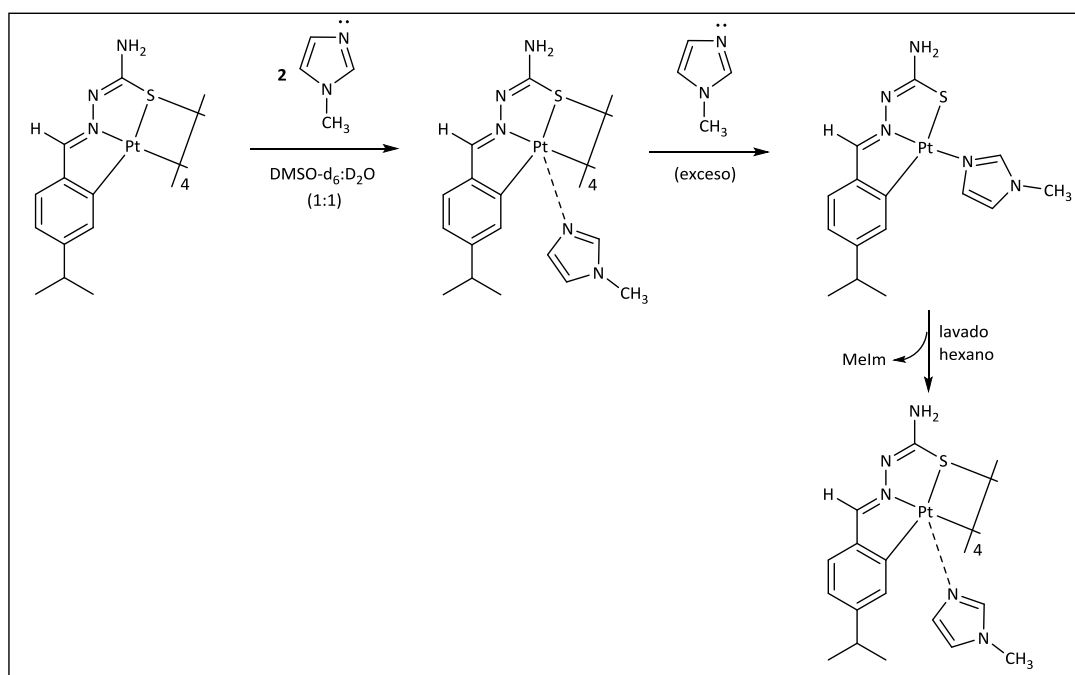


Figura 5.31. Posibles rupturas y reasociaciones del complejo C1 en presencia de MeIm.

5.2.6 Estudios de interacción de los complejos C1 y T5 con modelos de ADN

Como ya se comentó en la introducción de este capítulo, el dicromismo circular demostró previamente la formación de entrecruzamientos interhélice del complejo **C1** con CT ADN⁵⁴, con la aparición de un "efecto de coleo" a 315 nm. Elegimos los complejos **C1** y **T5** para analizar la interacción con CT ADN, mediante espectroscopía UV-Vis.

Lo ideal habría sido comparar el complejo **T5** con el complejo de Pd^{II} (Figura 5.6), que es el más análogo (Figura 5.6, complejo C2). Desafortunadamente, este complejo de Pd C2 no sólo presenta interconversión de isómeros que limita el tiempo de estudio, sino que su resolución por RMN es muy limitada y no ha permitido un estudio detallado con modelos pequeños, como Melm.

5.2.6.1 Interacción de los complejos C1 y T5 con CT ADN por UV-Vis

Para la realización de este experimento, y como se describe en la sección experimental, se prepararon muestras a concentraciones crecientes de los complejos **C1** y **T5**, manteniendo constante el CT ADN.

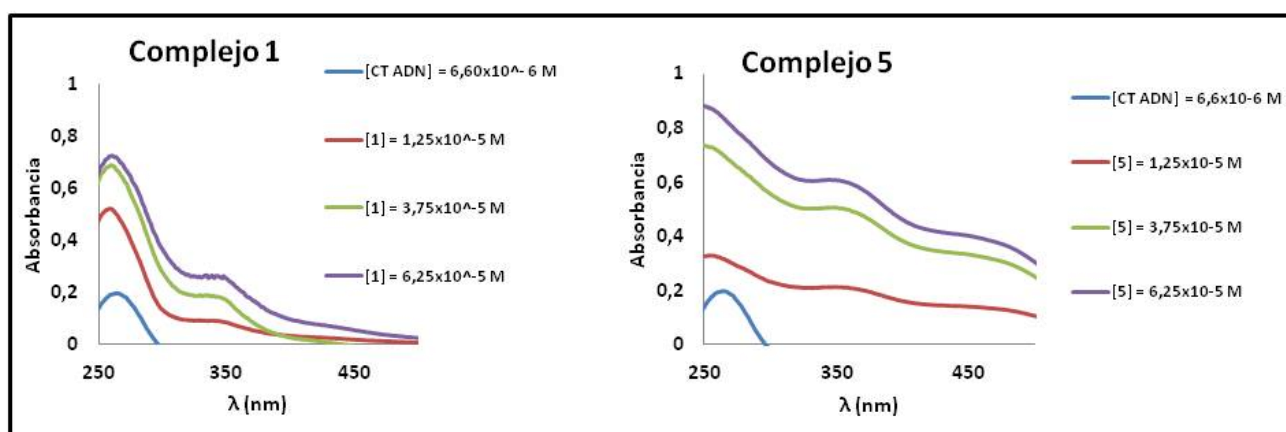


Figura 5.32. Espectros de UV-Vis de los complejos C1 (izquierda) y T5 (derecha) con CT ADN.

Los dos espectros de la Figura 5.32 muestran cómo al aumentar la concentración de complejo, aumenta ligeramente la absorbancia, fenómeno conocido como hiper Cromismo⁷⁰. Este ligero hiper Cromismo aquí observado puede sugerir la existencia de una interacción entre los complejos **C1** y **T5** y el CT ADN a través de fuerzas externas, posiblemente enlaces de hidrógeno e interacciones electrostáticas⁷¹.

5.2.6.2 Cálculo de la constante de asociación de los complejos C1 y T5 con CT ADN

El análisis cuantitativo de la afinidad de ambos complejos con CT ADN se realizó por UV-Vis, a concentración constante de cada complejo y variando la de CT ADN. La constante de asociación, K_b , se obtuvo a través de la ecuación:

$$[\text{CT ADN}]/(\epsilon_a - \epsilon_f) = [\text{CT ADN}]/(\epsilon_b - \epsilon_f) + 1/K_b(\epsilon_b - \epsilon_f)$$

representando los valores de la concentración de CT ADN en las muestras entre $\epsilon_a - \epsilon_f$, frente a $[\text{CT ADN}]/(\epsilon_b - \epsilon_f)$. En la Figura 5.33 se muestra la gráfica obtenida para el complejo **1**:

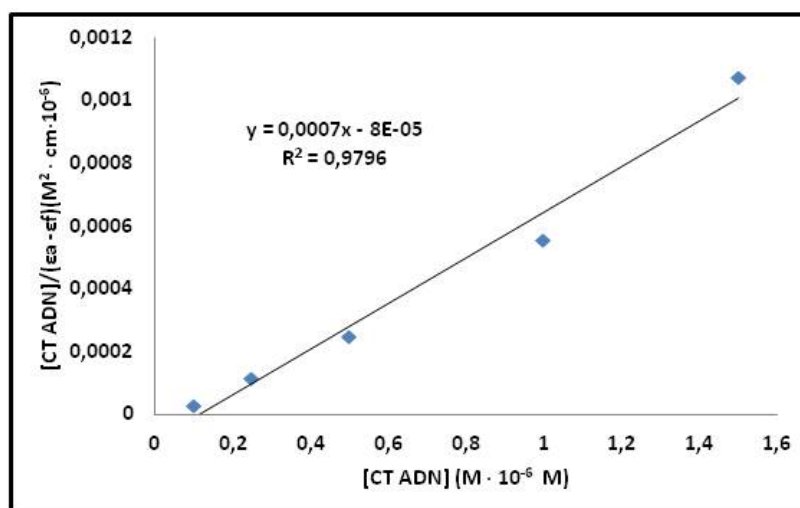


Figura 5.33. Representación de $[\text{CT ADN}]/(\epsilon_a - \epsilon_f)$ frente $[\text{CT ADN}]$ del complejo **C1**. Ecuación de la recta y coeficiente de correlación. Este ensayo presenta una relación lineal únicamente a bajas concentraciones de CT ADN, puesto que a concentraciones mayores se perdía claramente esta linealidad.

El valor de K_b para el complejo **C1** con CT ADN es de $8.7 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ y, para el complejo **T5**, es de $3.5 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$. Así, el complejo **C1** presenta una interacción mayor con el ADN que **T5** en el mismo rango de concentraciones, y la afinidad de ambos es superior a la del cisplatino⁷² ($K_b = 3.20 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$). Este ensayo pone de manifiesto nuevamente que los complejos tetrámeros tienen una reactividad diferente del cisplatino, lo que se correlaciona con otros experimentos ya comentados anteriormente⁴⁴.

Tras la determinación del tipo de interacción y la afinidad de unión del complejo **C1** a CT ADN, nos propusimos estudiar la reactividad de estos complejos a nivel molecular, con modelos de ADN más pequeños, como la 5'-GMP. Se llevaron a cabo diversos ensayos, variando las condiciones (temperatura, estequiometría, disolvente y pH) y monitorizando la reacción por ¹H-RMN. Sin

embargo, en ninguno de los experimentos realizados llegamos a ver coordinación de los complejos metálicos a 5'-GMP, lo que está en concordancia con los resultados anteriores, en los que demostrábamos que no hay interacción covalente entre el complejo metálico y el ADN. Al analizar las muestras por ESI MS, únicamente pudimos ver la señal correspondiente al fragmento monomérico coordinado a DMSO, pero ya transcurrida una semana de reacción, y nunca unión a 5'-GMP.

5.3 Parte experimental

5.3.1 Reactivos y disolventes

Los reactivos necesarios para la síntesis de los complejos: acetato de paladio (II), cloruro de paladio (II), tiosemicarbazida, *p*-nitrobenzaldehído y 1-(4-nitrofenil)etanona; el compuesto 1-metilimidazol (Melm) y ADN de timo de ternera (CT ADN) han sido suministrados por Sigma-Aldrich. El cloruro de litio fue adquirido de Fisher Scientific Company, los disolventes y las moléculas biológicas: lisozima de huevo de gallina (HEWL), ribonucleasa de páncreas bovino (RNasa A) y 5'-GMP de VWR, por Sigma Aldrich.

Los experimentos de ^1H RMN se realizaron en los disolventes deuterados DMSO- d_6 y D_2O en un aparato Bruker AMX-300 MHz y espectrómetros DRX-500 (500 MHz) a temperatura ambiente. Los experimentos de UV-Vis fueron realizados en dos espectrofotómetros: Varian Cary 50 Bio UV-Vis y Thermo Fisher Scientific Evolution 260 Bio. La caracterización por espectrometría de masas se realizaron en el Servicio Interdepartamental de Investigación (SIdI) de la Universidad Autónoma de Madrid: a) FAB y b) ESI en un espectrofotómetro de masas Hybrid Quad-Tof (QTOF) [QSTAR (ABSciex)]; y el departamento de Química de la Universidad de Florencia en un espectrofotómetro de masas Orbitrap de alta resolución (Thermo, San José, CA, EEUU), equipado con una fuente convencional de electrospray.

5.3.2 Síntesis de complejos TSCN de Pd^{II}

5.3.2.1 Síntesis de los ligandos

Los ligandos $\text{N}_\text{H}\text{NO}_2\text{TSCNMe}$ y $\text{N}_\text{H}\text{NO}_2\text{TSCN}$ se prepararon siguiendo el protocolo descrito en la bibliografía⁷³:

- **N_HNO₂TSCNMe** (sólido amarillo): rendimiento: 69%. ¹H-RMN (DMSO-d₆, 300 MHz): δ 10.44 (s, 2H, NH₂), 8.44 (s, 1H, NH), 8.21 (m, 4H, H_{2/2'}, H_{3/3'}), 2.35 (s, 3H). ¹³C-RMN (DMSO-d₆, 300 MHz): δ 179.3, 147.3, 145.2, 143.8, 127.6, 123.2, 13.8. IR: ν (NH) = 3479 cm⁻¹, 3355 cm⁻¹; ν (C=N) = 1585 cm⁻¹, ν (C=S) = 856 cm⁻¹.

- **N_HNO₂TSCN** (sólido amarillo): rendimiento: 73%. ¹H-RMN (DMSO-d₆, 300 MHz): δ 11.71 (s, 2H, NH₂), 8.40 (s, 1H, NH), 8.12 (s, 1H, H₅), 8.10 (d, 2H, H_{3/3'}), 8.02 (d, 2H, H_{2/2'}). ¹³C-RMN (DMSO-d₆, 300 MHz): δ 178.3, 147.5, 140.6, 139.5, 128.1, 123.7. IR: ν (NH) = 3849 cm⁻¹, 3337 cm⁻¹; ν (C=N) = 1588 cm⁻¹, ν (C=S) = 813 cm⁻¹.

5.3.2.2 Complejos de coordinación

En un schlenk que contiene 8 mL de metanol se introducen, bajo atmósfera inerte y agitación, 150.0 mg de PdCl₂ (0.88 mmol). A continuación, se adicionan 85.48 mg de LiCl (2.02 mmol), y se deja reaccionar 15 min a 48 °C. Posteriormente, se añade el ligando (1.76 mmol, 403.4 mg de N_HNO₂TSCNMe ó 394 mg de N_HNO₂TSCN) y se mantiene la reacción 24 h. El sólido obtenido se filtra y se lava con agua, metanol y éter etílico.

- **Pd(N_HNO₂TSCNH)N_HNO₂TSCNCl (M6)** (sólido naranja): rendimiento: 58%. ¹H-RMN (DMSO-d₆, 300 MHz): δ N_HNO₂TSCNH = 12.49 (s, 1H, NH), 8.19 (m, 4H, H_{2/2'}, H_{3/3'}), 8.17 (s, 1H, H₇), 7.52 (s, 2H, NH₂). N_HNO₂TSCN = 9.26 (s, 2H, NH₂), 8.42 (d, 2H, H_{2/2'}), 8.35 (d, 2H, H_{3/3'}), 8.16 (s, 1H, H₇). IR: ν (NH) = 3210 cm⁻¹, 3028 cm⁻¹, 2941 cm⁻¹; ν (C=N-N=C) = 1618 cm⁻¹; ν (C=N) = 1505 cm⁻¹; ν (C=S) = 848 cm⁻¹; ν (C-S) = 688 cm⁻¹, ν (Pd-Cl) = 326 cm⁻¹. Análisis elemental encontrado C₁₆H₁₅ClN₈O₄S₂Pd: C, 31.31%; H, 2.59%; N, 17.87%. Calculado PdC₁₆H₁₅ClN₈O₄S₂ · 1.4H₂O · 0.1 (CH₃)₂CO: C, 31.56%; H, 2.99%; N, 18.06%.

- **Pd(N_HNO₂TSCNMeH)N_HNO₂TSCNMeCl (M7)** (sólido naranja rojizo): rendimiento: 50%. ¹H-RMN (DMSO-d₆, 300 MHz): δ L_{Me} = 7.85 (d, 2H, H_{2/2'}), 7.43 (d, 2H, H_{3/3'}), 2.41 (s, 6H). N_HNO₂TSCNMeH = 8.30 (s, 2H, NH₂), 8.25 (m, 4H, H_{2/2'}, H_{3/3'}), 2.41 (s, 6H). ¹³C-RMN (DMSO-d₆, 300 MHz): δ N_HNO₂TSCNMe = 164.3, 161.9, 154.8, 130.2, 127.1, 119.4, 14.6. N_HNO₂TSCNMeH = 180.5, 154.8, 146.3, 125.3, 123.6, 14.6. IR: ν (NH) = 3326 cm⁻¹, 3110 cm⁻¹, 2923 cm⁻¹; ν (C=N-N=C) = 1629 cm⁻¹; ν (C=N) = 1556 cm⁻¹; ν (C=S) = 858 cm⁻¹; ν (C-S) = 688 cm⁻¹, ν (Pd-Cl) = 321 cm⁻¹. Análisis elemental

encontrado PdC₁₈H₁₉ClN₈O₄S₂: C, 28.11%; H, 4.36; N, 14.10%. Calculado PdC₁₈H₁₉ClN₈O₄S₂ · 1.9H₂O: C, 27.73%; H, 4.78; N, 14.37%.

5.3.2.3 Complejos ciclometalados

En un schlenk que contiene 14.1 mL de AcOH glacial se introducen 150.0 mg de Pd(OAc)₂ (0.67 mmol) y ligando (1.34 mmol, 320 mg de L_{Me} ó 300 mg de L) y se mantiene a 40 °C en atmósfera inerte y bajo agitación durante 3 días. El sólido obtenido se lava con agua, disolución acuosa de NaHCO₃ (5%), agua y acetona.

[Pd(N_HNO₂TSCN)]₄ (T4): sólido naranja: rendimiento: 45%. ¹H-RMN (DMSO-d₆, 300 MHz): δ 8.22 (s, 2H, NH₂), 8.04 (s, 1H, H₂), 7.71 (d, 1H, H₂'), 7.11 (s, 1H, H₇), 6.89 (d, 1H, H₃). IR: ν (NH) = 3039 cm⁻¹; ν (C=N-N=C) = 1651 cm⁻¹; ν (C=N) = 1504 cm⁻¹; ν (C=S) = 684 cm⁻¹. Análisis elemental encontrado C₃₂H₂₄N₁₆O₈S₄Pd₄: C, 24.13.%; H, 3.67 %; N, 13.59%. Calculado PdC₁₆H₁₅ClN₈O₄S₂ · 1.4H₂O: 23.98%; H, 3.52%; N, 13.98%. ¹

[Pd(N_HNO₂TSCNMe)]₄ (T5) (sólido rojo): rendimiento: 37%. ¹H-RMN (DMSO-d₆, 300 MHz): δ 8.10 (s, 1H, H₂), 7.67 (d, 1H, H₂'), 7.45 (s, 2H, NH₂), 6.80 (d, 1H, H₃), 1.85 (s, 3H, CH₃). ¹³C-RMN (DMSO-d₆, 300 MHz): δ 167.8, 166.2, 164.8, 155.9, 144.8, 125.7, 125.3, 119.3, 13.1. IR: ν (NH) = 3453 cm⁻¹, 3353 cm⁻¹; ν (C=N) = 1558 cm⁻¹; ν (C=N-N=C) = 1629 cm⁻¹; ν (C=S) = 676 cm⁻¹. MS (ESI) m/z: 554 [M-Cl]⁺. Análisis elemental encontrado C₃₆H₃₂N₁₆O₈S₄Pd₄: C, 25.30.%; H, 3.88 %; N, 12.81.%. Calculado C₃₆H₃₂N₁₆O₈S₄Pd₄ · 1.5H₂O: 24.98%; H, 4.19%; N, 12.95%. ²

¹ No se ha podido obtener el espectro de ¹³C RMN de este complejo debido a la baja resolución de las señales, que impiden su completa caracterización por esta técnica. Tampoco se ha podido obtener el espectro de masas FAB debido a su alto peso molecular

² No se ha podido obtener el espectro de ¹³C RMN de este complejo debido a la baja resolución de las señales, que impiden su completa caracterización por esta técnica.

5.3.3 Estructura de rayos X

Tabla 5.5. Longitudes y ángulos de enlace seleccionados para la especie $[Pd(N_HNO_2TSCNMe)]_4$.

Longitudes de enlace seleccionadas (Å)			
Pd ₁ - S ₁	2.354(4)	C ₅ - Pd ₁	2.001(14)
Pd ₁ - S ₂	2.314(4)	C ₁₈ - Pd ₂	2.015(15)
Pd ₂ - S ₁	2.327(4)	C ₂₇ - Pd ₃	2.016(14)
Pd ₂ - S ₃	2.364(4)	C ₃₆ - Pd ₄	2.000(15)
Pd ₃ - S ₂	2.361(4)	N ₃ - Pd ₁	1.989(12)
Pd ₃ - S ₄	2.331(4)	N ₇ - Pd ₂	2.009(12)
Pd ₄ - S ₄	2.369(4)	N ₁₁ - Pd ₃	2.006(13)
Pd ₄ - S ₃	2.323(4)	N ₁₅ - Pd ₄	2.005(12)
Ángulos de enlace seleccionados (°)			
S ₂ -Pd ₁ -S ₁	98.83(15)	Pd ₂ - S ₁ - Pd ₁	105.61(15)
S ₁ -Pd ₂ -S ₃	100.24(14)	Pd ₁ - S ₂ - Pd ₃	106.02(15)
S ₄ -Pd ₃ -S ₂	98.45(14)	Pd ₄ - S ₃ - Pd ₂	107.68(15)
S ₃ -Pd ₄ -S ₄	99.12(14)	Pd ₃ - S ₄ - Pd ₄	109.62(16)

Tabla 5.6. Datos cristalográficos del complejo $[Pd(N_HNO_2TSCNMe)]_4$.

Fórmula química	C ₄₂ H ₅₀ N ₁₆ O ₁₁ Pd ₄ S ₇
Peso molecular	1605.00
Temperatura	296(2) K
Longitud de onda	0.71073 Å
Tamaño del cristal	0.010 x 0.062 x 0.240 mm
Apariencia del cristal	Rojo pálido prismático
Sistema cristalino	Ortorrómbico
Grupo espacial	Pca 21
Dimensiones de la celda unidad	a = 29.7770(14) Å α = 90° b = 9.1304(4) Å β = 90° c = 21.0103(7) Å γ = 90°
Volumen	5712.2(4) Å ³
Z	4
Densidad calculada	1.866 mg/cm ³
Coefficiente de absorción	1.565 mm ⁻¹
F(000)	3192

5.3.4 Estudio del comportamiento en disolución y lipofilicidad de los complejos

5.3.4.1 Determinación de la estabilidad

La estabilidad en disolución de los complejos **C1** a **M8** se determinó por la técnica de UV-Vis, realizando mediciones por triplicado, mediante un espectrofotómetro Varian Cary 50 Bio. Se prepararon disoluciones stock 5 mM de los complejos en DMSO, y posteriormente se diluyeron hasta alcanzar la concentración final (10^{-4} M) en disolución tampón fosfato (50 mM pH = 7.4) ó acetato amónico (20 mM pH = 6.8), y 15 % de DMSO. Finalmente, se monitorizó la medición de la absorbancia realizando un barrido de λ entre 200 y 800 nm durante 24 h a 25 °C.

La constante K_{obs} se calculó a partir de los espectros UV-Vis, representando la variación de la absorbancia (al máximo de absorción para cada complejo) frente al tiempo, usando el programa OriginPro 8.5.1. Se obtiene una función que decae monoexponencialmente, y el proceso puede estudiarse como una reacción de pseudo-primer orden⁷⁴. Los valores finales se obtuvieron tras realizar tres mediciones.

5.3.4.2 Determinación del coeficiente de partición (Log P)

El coeficiente de partición octanol-agua para los complejos **C1** a **M8** se determinó siguiendo el siguiente procedimiento experimental descrito en la bibliografía⁵⁸: se mezclaron y agitaron 100 mL de agua Milli-Q y 100 mL de n-octanol durante 96 h para permitir la saturación de ambas fases. Se prepararon disoluciones de los complejos en la fase acuosa saturada y posteriormente se adicionó la misma cantidad de n-octanol, también saturado. Se agitaron ambas fases durante 10 min y posteriormente se centrifugaron 5 min a 6000 rpm para conseguir su separación. El máximo de absorción medido por UV-Vis en cada fase nos dio la concentración. A partir de la expresión $\text{Log } P = [\text{Log}(\text{compuesto})_{\text{oct}} / \text{Log}(\text{compuesto})_{\text{aq}}]$ se hallaron los datos de la Tabla 5.3.

5.3.5 Estudio de la afinidad de los complejos con lisozima y RNasa por UV-Vis

La afinidad de unión de los complejos **C1** a **M8** frente a proteínas se determinó mediante UV-Vis, de manera análoga al estudio de la estabilidad en disolución, mediante con un espectrofotómetro Varian Cary 50 Bio. Se prepararon disoluciones de cada complejo con Lisozima de huevo de gallina (HEWL) y RNasa A (stock 10^{-3} M en agua milli-Q) (3:1 metal/proteína) en disolución tampón acetato amónico (20 mM pH = 6.8) y 15% DMSO. Se monitorizó la medición de la absorbancia realizando un barrido de λ entre 200 y 800 m durante 24 h a 25 °C.

Las constantes de afinidad K_{obsL} y K_{obsR} se calcularon de a partir de los espectros UV-Vis, manera análoga a la constante de estabilidad. Se representó la variación de la absorbancia (al máximo de absorción para cada complejo) frente al tiempo, usando el programa OriginPro 8.5.1, obteniendo una función que decae monoexponencialmente. El proceso puede estudiarse como una reacción de pseudo-primer orden. Los valores finales se obtuvieron tras realizar tres mediciones.

5.3.6 Estudio de la interacción del complejo 1 con Lisozima y RNasa mediante ESI MS

Inicialmente se prepararon disoluciones del complejo **C1** (10^{-4} M) con Lisozima (1:1), y se incubaron a 37 °C en las siguientes condiciones: a) AcNH_4 (20 mM pH = 6.8) y 15% de DMSO ó DMF durante 6 h; b) agua acidulada (pH = 5.5) y 15 de DMF, durante 6 h; c) AcOH (20 mM, pH = 4.5) y 15% de DMSO, durante 6 y 24 h. Posteriormente, se prepararon disoluciones del complejo **1** con Lisozima ó RNasa A (3:1 metal/proteína) en tampón AcNH_4 y se incubaron a 37 °C durante 48 h.

Tras diluir cada muestra 1/20 con agua, se registró el espectro ESI MS por introducción directa de la dilución a un flujo de 5 $\mu\text{L}/\text{min}$ en un espectrómetro de masas Orbitrap de alta resolución (Thermo, San Jose, CA, USA), equipado con una fuente ESI convencional. Las condiciones de trabajo fueron las siguientes: voltaje de spray de 3.1 kV, voltaje capilar 45 V, temperatura capilar de 220 °C, voltaje de lentes de tubo 230 V. La vaina y los gases auxiliares fueron agrupados a 17 (unidades arbitrarias (ua)) y a 1 ua. Para la adquisición, se utilizó un software Xcalibur 2.0. (Thermo), mientras que el promedio de deconvolución y fue obtenido mediante la herramienta de intergración Xtract. Para la adquisición del espectro, se utilizó una resolución nominal (a m/z 400) de 100,000.

5.3.7 Interacción del complejo C1 con Melm por ^1H -RMN

Experimento 1

Se adicionó una disolución de Melm (0.99 mg, 12.06 μmol) en D_2O sobre una disolución del complejo **C1** (10 mg, 6.03 μmol) en DMSO-d_6 , en un volumen final de 0.5 mL (1:1) en un tubo de RMN. El tubo se mantuvo en un termoagitador (Thermomixer C, Eppendorf, España) a 37 °C bajo agitación durante todo el experimento (24 h), y los espectros de ^1H RMN se registraron a 0, 1, 2, 6 y 24 h.

Experimento 2

Se repitió la reacción del experimento 1, añadiendo tras 24 h un exceso de MeIm (2.98 mg, 36.18 μmol) y se caracterizó por ^1H RMN y espectrometría de masas FAB. El resto de la muestra se precipitó con agua y se lavó con hexano, se secó a vacío durante una noche a 40 °C y se caracterizó por ^1H RMN y espectrometría de masas FAB y ESI.

5.3.8 Estudios de interacción de los complejos C1 y T5 con modelos de ADN por UV-Vis

Estos experimentos se realizaron en disolución tampón Tris-HCl 5 mM, que se preparó pesando 78.8 mg de Tris-HCl y 292.2 mg de NaCl, y se disolvieron en H_2O . La disolución se enrasa hasta 100 mL en un matraz aforado y se ajusta a un pH de 7.4 con una disolución de NaOH 0.5 M.

- Cuantificación de la concentración de CT ADN: se disolvieron 5 mg de CT ADN en 100 mL de disolución tampón Tris-HCl y se mantuvo bajo agitación toda la noche a temperatura ambiente. La determinación de la concentración exacta de la disolución de CT ADN se realizó registrando el espectro de UV-Vis a λ entre 200-400 nm, y se calculó a partir de la ley de Lambert-Beer, siendo *Abs* la absorbancia medida experimentalmente, ϵ el coeficiente de absortividad molar, que es característico de cada sustancia (para el CT ADN, $6600 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$), y *l* la longitud de la cubeta de medida (1 cm).

-Determinación del tipo de interacción: Se prepararon muestras de cada complejo a diferentes concentraciones (entre 0 y 6.25×10^{-5} M), manteniendo constante la de CT ADN (6.6×10^{-6} M) y llegando a un volumen final de 2 mL con buffer Tris- HCl, utilizando 2.5% de DMSO. En paralelo, se prepararon otros seis microtubos que contenían buffer Tris y el complejo, para registrar los blancos. Las muestras se incubaron en un termoagitador a 37 °C bajo agitación durante 20 minutos. Finalmente se midió la absorbancia de cada muestra, realizando un barrido de λ entre 200 y 800 nm.

5.3.8.1 Determinación de la constante de asociación de los complejos C1 y T5 con CT ADN

Para calcular la constante de afinidad, K_b , de los complejos **C1** y **T5** con CT ADN se prepararon muestras de cada complejo a concentración constante (5 μM), variando la de CT ADN (entre 0 y 1.5 μM), y llegando a un volumen final de 2 mL con buffer Tris- HCl, utilizando 2.5 % de DMSO. Las

muestras se incubaron en un termoagitador a 37 °C durante 20 minutos y se midió la absorbancia de cada una, realizando un barrido de λ entre 200 y 800 nm.

La ecuación que permitió obtener el valor de K_b es la mostrada en el apartado 5.2.6.2. En esta ecuación, ϵ_a es el coeficiente de extinción molar del compuesto en cada punto, ϵ_f el coeficiente de extinción molar del compuesto libre y ϵ_b el coeficiente de extinción molar del compuesto enlazado al CT ADN. El valor de ϵ_a se calcula a partir de la ley de Lambert-Beer en cada espectro de UV-Vis a la λ máxima de la banda de transferencia de carga del compuesto, y ϵ_f se calcula con la ley de Lambert-Beer en el tubo que únicamente contiene al complejo libre.

5.4 Bibliografía

- (1) Campbell, M. J. M. *Coord. Chem. Rev.*, **1975**, *15*, 279.
- (2) Dudley, K. H.; Miller, H. W.; Schneider, P. W.; McKee, R. L. *J. Org. Chem.*, **1969**, *34*, 2750.
- (3) Lobana, T. S. *RSC Adv.*, **2015**, *5*, 37231.
- (4) Casas, J.; Castellano, E. E.; Rodríguez-Argüelles, M. C.; Sánchez, A.; Sordo, J.; Zukerman-Schpector, J. *Inorg. Chim. Acta* **1997**, *260*, 183.
- (5) Basuli, F.; Peng, S. M.; Bhattacharya, S. *Inorg. Chem.*, **2000**, *39*, 1120.
- (6) Gingras, B. A.; Sirianni, A. F. *Can. J. Chem.*, **1964**, *42*, 17.
- (7) Duan, C.-Y.; Wu, B.-M.; Mak, T. C. W. *J. Chem. Soc, Dalton Trans.*, **1996**, 3485.
- (8) Dessy, G.; Fares, V.; Scaramuzza, L.; Tomlinson, A. A. G.; De Munno, G. *J. Chem. Soc, Dalton Trans.*, **1978**, 1549.
- (9) Basuli, F.; Peng, S.-M.; Bhattacharya, S. *Inorg. Chem.*, **1997**, *36*, 5645.
- (10) Lima, R. L. d.; Teixeira, L. R. d. S.; Carneiro, T. M. G.; Beraldo, H. *J. Braz. Chem. Soc.*, **1999**, *10*, 184.
- (11) Ashfield, L. J.; Cowley, A. R.; Dilworth, J. R.; Donnelly, P. S. *Inorg. Chem.*, **2004**, *43*, 4121.
- (12) López-Torres, E.; Mendiola, M. A.; Pastor, C. J.; Pérez, B. S. *Inorg. Chem.*, **2004**, *43*, 5222.
- (13) Santos, I. G.; Abram, U.; Alberto, R.; Lopez, E. V.; Sanchez, A. *Inorg. Chem.*, **2004**, *43*, 1834.
- (14) Kowol, C. R.; Berger, R.; Eichinger, R.; Roller, A.; Jakupec, M. A.; Schmidt, P. P.; Arion, V. B.; Keppler, B. K. *J. Med. Chem.*, **2007**, *50*, 1254.
- (15) Kokina, T. E.; Gorshkov, N. B.; Glinskaya, L. A.; Kurat'eva, N. V.; Sheludyakova, L. A.; Tkachev, A. V.; Larionov, S. V. *Russ. J. Coord. Chem.*, **2013**, *39*, 442.
- (16) Mahajan, R. K.; Kaur, I.; Lobana, T. S. *Talanta* **2003**, *59*, 101.
- (17) Richardson, D. R.; Kalinowski, D. S.; Richardson, V.; Sharpe, P. C.; Lovejoy, D. B.; Islam, M.; Bernhardt, P. V. *J. Med. Chem.*, **2009**, *52*, 1459.
- (18) Duffy, K. J.; Price, A. T.; Delorme, E.; Dillon, S. B.; Duquenne, C.; Erickson-Miller, C.; Giampa, L.; Huang, Y.; Keenan, R. M.; Lamb, P.; Liu, N.; Miller, S. G.; Rosen, J.; Shaw, A. N.; Smith, H.; Wiggall, K. J.; Zhang, L.; Luengo, J. I. *J. Med. Chem.*, **2002**, *45*, 3576.
- (19) Du, X.; Guo, C.; Hansell, E.; Doyle, P. S.; Caffrey, C. R.; Holler, T. P.; McKerrow, J. H.; Cohen, F. E. *J. Med. Chem.*, **2002**, *45*, 2695.
- (20) Kovala-Demertzi, D.; Demertzis, M. A.; Filiou, E.; Pantazaki, A. A.; Yadav, P. N.; Miller, J. R.; Zheng, Y.; Kyriakidis, D. A. *Biomaterials.*, **2003**, *16*, 411.
- (21) Beraldo, H.; Gambino, D. *Mini. Rev. Med. Chem.*, **2004**, *4*, 31.
- (22) Papageorgiou, A.; Iakovidou, Z.; Mourelatos, D.; Mioglou, E.; Boutis, L.; Kotsis, A.; Kovala-Demertzi, D.; Domopoulou, A.; West, D. X.; Dermetzis, M. A. *Anticancer Res.*, **1997**, *17*, 247.
- (23) Scovill, J. P.; Klayman, D. L.; Franchino, C. F. *J. Med. Chem.*, **1982**, *25*, 1261.
- (24) Domagk, G.; Behnisch, R.; Mietzsch, F.; Schmidt, H. S. *Naturwissenschaften* **1946**, *33*, 315.
- (25) Dobek, A. S.; Klayman, D. L.; Dickson, E. T.; Scovill, J. P.; Tramont, E. C. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1980**, *18*, 27.
- (26) Manetti, F.; Corelli, F.; Biava, M.; Fioravanti, R.; Porretta, G. C.; Botta, M. *Farmaco.*, **2000**, *55*, 484.
- (27) De Clercq, E. *Viruses* **2010**, *2*, 1322.

- (28) Bauer, D. J.; St Vincent, L.; Kempe, C. H.; Young, P. A.; Downie, A. W. *Am. J. Epidemiol.*, **1969**, *90*, 130.
- (29) Teitz, Y.; Ronen, D.; Vansover, A.; Stematsky, T.; Riggs, J. L. *Antiviral Res.*, **1994**, *24*, 305.
- (30) Altun, A.; Kumru, M.; Dimoglo, A. *J. Mol. Struc. THEOCHEM.*, **2001**, *535*, 235.
- (31) Brockman, R. W.; Thomson, J. R.; Bell, M. J.; Skipper, H. E. *Clin. Cancer Res.*, **1956**, *16*, 167.
- (32) Quiroga, A. G.; Navarro Ranninger, C. *Coord. Chem. Rev.*, **2004**, *248*, 119.
- (33) Quiroga, A. G.; M. Pérez, J.; Montero, E. I.; Masaguer, J. R.; Alonso, C.; Navarro-Ranninger, C. *J. Inorg. Biochem.*, **1998**, *70*, 117.
- (34) Quiroga, A. G.; Cubo, L.; Miguel, P. J. S.; Moneo, V.; Carnero, A.; Navarro-Ranninger, C. *Eur. J. Inorg. Chem.*, **2008**, *2008*, 1171.
- (35) Quiroga, A. G.; Cubo, L.; Miguel, P. J. S.; Moneo, V.; Carnero, A.; Navarro-Ranninger, C. *Eur. J. Inorg. Chem.*, **2008**, *2008*, 1183.
- (36) Albert, J.; Ceder, R. M.; Gomez, M.; Granell, J.; Sales, J. *Organometallics.*, **1992**, *11*, 1536.
- (37) Omae, I. *Coord. Chem. Rev.*, **2004**, *248*, 995.
- (38) Kawamoto, T.; Nagasawa, I.; Kuma, H.; Kushi, Y. *Inorg. Chem.*, **1996**, *35*, 2427.
- (39) Omae, I. *Coord. Chem. Rev.*, **2014**, *280*, 84.
- (40) Garcia-Ruano, J. L.; Lopez-Solera, I.; Masaguer, J. R.; Navarro-Ranninger, C.; Rodriguez, J. H.; Martinez-Carrera, S. *Organometallics.*, **1992**, *11*, 3013.
- (41) Navarro-Ranniger, C.; Lopez-Solera, I.; Perez, J. M.; Rodriguez, J.; Garcia-Ruano, J. L.; Raithby, P. R.; Masaguer, J.; Alonso, C. *J. Med. Chem.*, **1993**, *36*, 3795.
- (42) García-Ruano, J. L.; González, A. M.; López-Solera, I.; Masaguer, J. R.; Navarro-Ranninger, C.; Raithby, P. R.; Rodríguez, J. H. *Angew. Chem. Int. Ed.Eng.*, **1995**, *34*, 1351.
- (43) Navarro-Ranninger, C.; López-Solera, I.; González, V. M.; Pérez, J. M.; Alvarez-Valdés, A.; Martín, A.; Raithby, P. R.; Masaguer, J. R.; Alonso, C. *Inorg. Chem.*, **1996**, *35*, 5181.
- (44) Quiroga, A. G.; Perez, J. M.; Lopez-Solera, I.; Masaguer, J. R.; Luque, A.; Roman, P.; Edwards, A.; Alonso, C.; Navarro-Ranninger, C. *J. Med. Chem.*, **1998**, *41*, 1399.
- (45) Farrell, N. *Coord. Chem. Rev.*, **2002**, *232*, 1.
- (46) Kovala-Demertzi, D.; Demertzi, M. A.; Miller, J. R.; Papadopoulou, C.; Dodorou, C.; Filousis, G. *J. Inorg. Biochem.*, **2001**, *86*, 555.
- (47) Singh, D.; Singh, R. V. *J. Inorg. Biochem.*, **1993**, *50*, 227.
- (48) Li, Q. X.; Tang, H. A.; Li, Y. Z.; Wang, M.; Wang, L. F.; Xia, C. G. *J. Inorg. Biochem.*, **2000**, *78*, 167.
- (49) Antholine, W.; Knight, J.; Whelan, H.; Petering, D. H. *Mol. Pharmacol.*, **1977**, *13*, 89.
- (50) Antholine, W. E.; Knight, J. M.; Petering, D. H. *J. Med. Chem.*, **1976**, *19*, 339.
- (51) Arion, V. B.; Jakupec, M. A.; Galanski, M.; Unfried, P.; Keppler, B. K. *J. Inorg. Biochem.*, **2002**, *91*, 298.
- (52) Kovala-Demertzi, D.; Miller, J. R.; Kourkoumelis, N.; Hadjikakou, S. K.; Demertzi, M. A. *Polyhedron.*, **1999**, *18*, 1005.
- (53) Quiroga, A. G.; M. Pérez, J.; López-Solera, I.; Montero, E. I.; Masaguer, J. R.; Alonso, C.; Navarro-Ranninger, C. *J. Inorg. Biochem.*, **1998**, *69*, 275.
- (54) Quiroga, A. G.; Pérez, J. M.; López-Solera, I.; Masaguer, J. R.; Luque, A.; Román, P.; Edwards, A.; Alonso, C.; Navarro-Ranninger, C. *J. Med. Chem.*, **1998**, *41*, 1399.
- (55) Gutierrez, M. A.; Newkome, G. R.; Selbin, J. J. *Organomet. Chem.*, **1980**, *202*, 341.

- (56) Chakladar, S.; Paul, P.; Venkatsubramanian, K.; Nag, K. *J. Chem. Soc, Dalton Trans.*, **1991**, 2669.
- (57) Janiak, C. *J. Chem. Soc, Dalton Trans.*, **2000**, 3885.
- (58) Marzo, T.; Pillozzi, S.; Hrabina, O.; Kasparkova, J.; Brabec, V.; Arcangeli, A.; Bartoli, G.; Severi, M.; Lunghi, A.; Totti, F.; Gabbiani, C.; Quiroga, A. G.; Messori, L. *Dalton Trans.*, (Cambridge, England : 2003) **2015**, *44*, 14896.
- (59) Casini, A.; Mastrobuoni, G.; Temperini, C.; Gabbiani, C.; Francese, S.; Moneti, G.; Supuran, C. T.; Scozzafava, A.; Messori, L. *Chem. Commun.*, **2007**, 156.
- (60) Calderone, V.; Casini, A.; Mangani, S.; Messori, L.; Orioli, P. L. *Angew. Chem. Int. Ed. Eng.*, **2006**, *45*, 1267.
- (61) Lau, J. K.; Deubel, D. V. *Chemistry.*, **2005**, *11*, 2849.
- (62) Peleg-Shulman, T.; Najajreh, Y.; Gibson, D. *J. Inorg. Biochem.*, **2002**, *91*, 306.
- (63) Messori, L.; Cubo, L.; Gabbiani, C.; Álvarez-Valdés, A.; Michelucci, E.; Pieraccini, G.; Ríos-Luci, C.; León, L. G.; Padrón, J. M.; Navarro-Ranninger, C.; Casini, A.; Quiroga, A. G. *Inorg. Chem.*, **2012**, *51*, 1717.
- (64) Messori, L.; Marzo, T.; Merlino, A. *J. Inorg. Biochem.*, **2015**, *153*, 136.
- (65) You, S.-J.; Udenigwe, C. C.; Aluko, R. E.; Wu, J. *Food Res. Int.*, **2010**, *43*, 848.
- (66) Raines, R. T. *Chem. Rev.*, **1998**, *98*, 1045.
- (67) Messori, L.; Merlino, A. *Inorg. Chem.*, **2014**, *53*, 3929.
- (68) Holm, R. H.; Kennepohl, P.; Solomon, E. I. *Chem. Rev.*, **1996**, *96*, 2239.
- (69) Sundberg, R. J.; Martin, R. B. *Chem. Rev.*, **1974**, *74*, 471.
- (70) Milutinovic, M. M.; Bogojeski, J. V.; Klisuric, O.; Scheurer, A.; Elmroth, S. K. C.; Bugarcic, Z. D. *Dalton Trans.*, **2016**, *45*, 15481.
- (71) Rizvi, M. A.; Zaki, M.; Afzal, M.; Mane, M.; Kumar, M.; Shah, B. A.; Srivastav, S.; Srikrishna, S.; Peerzada, G. M.; Tabassum, S. *European J. Med. Chem.*, **2015**, *90*, 876.
- (72) Nakamoto, K.; Tsuboi, M.; Strahan, G. D. In *Drug–DNA Interactions*; John Wiley & Sons, Inc.: 2008, p 1.
- (73) Sah, P. P. T., Daniels, T. C. *Rec. Trav. Chim.*, **1950**, *69*, 1545.
- (74) Santos, R. L. S. R.; van Eldik, R.; de Oliveira Silva, D. *Inorg. Chem.*, **2012**, *51*, 6615.

Chapter 6. Summary and conclusions

Chapter 2

1. Complex **1**, with general formula $cis\text{-PtI}_2(\text{ipa})_2$, endowed with antitumor activity, shows a similar reactivity versus DNA to cisplatin, and different versus proteins. However, this complex differs to cisplatin-DNA's reactivity in the some particular aspects that can justify a different reactivity. Those reactivity aspects are as follows: i) generates a premature termination in RNA synthesis very similar to cisplatin, ii) produces very similar amounts of ICLs in DNA, and iii) presents a slightly higher decrease in t_m , resulting in a destabilization of the double helix.

2. The complexes **2-5** with general formula $trans\text{-PtI}_2(\text{amine})(\text{amine}')$, endowed with antitumor activity as well, present notable differences in the reactivity versus DNA with transplatin. The complexes produce:

- i) a premature termination in RNA synthesis similar to the one produce by transplatin;
- ii) 1,3- intrastrand crosslinks (also different to cisplatin's);
- iii) an increase in t_m of 6 °C, that results in a higher stabilization of the double helix, with complex **5** particularly; and
- iv) a higher amount of bis-adducts with CT DNA (80 - 90%), so they produce bifunctional lesions more efficiently than transplatin, specially the complex **4**. Also, the complexes generate a higher unwinding of plasmid DNA.

3. The experiments using UVA light with the complexes **1**, **2**, **3** and **5**, show an increase in cytotoxic activity in solid tumour cells only with the *trans* complexes, especially in the cell line LCLC-103H, where the compounds are even more active than complex $trans\text{-[PtCl}_2(\text{ipa})(\text{ma})]$. Moreover, under irradiation, *trans* complexes **2** and **5** show an increase in their affinity for the DNA, especially complex **5**. Moreover UVA light enhances a higher reactivity and affinity of these complexes with small DNA models (f. e. 5'-GMP) than the one observed in the dark.

4. Computational studies of singlet-singlet transitions of complexes **1**, **2** and **5**, show the presence of dissociative "d-d" electronic transitions with the irradiation, due to dominant contributions of the LUMO orbital, promoting the release of the amine ligands in the *cis* complex **1** and the iodide ligands in complexes *trans* **2** and **5** when reacting with DNA. These results confirm the classic

reactivity of *trans* complexes containing Pt-I bonds versus DNA. Moreover, the irradiation at $\lambda = 365$ nm is capable of promoting successive reactions, generating mono and bis-adducts with DNA models.

Chapter 3

1. The classic reactivity of Pt^{II} complexes with iodide ligands and aliphatic amines versus DNA has been corroborated by X-ray diffraction, obtaining the crystalline structure of the *trans*-[Pt(9-EtG)₂(ipa)₂]²⁺ specie. In this structure, the geometry around the Pt^{II} is approximately square-planar, and the Pt^{II} is bound to the two 9-EtG molecules in *trans* position, which are in the same plane. The structure displayed the presence of an intramolecular hydrogen bond interaction between the oxygen atom of the 9-EtG and the hydrogen atom of the NH₂ of the ipa ligand. This interesting interaction could prevent that the ligands can rotate freely around the Pt-N bonds, which might influence in the stability of the double helix when the platination takes place.

2. The complexes containing Pt-Cl bond are more cytotoxic in the tumour cell line MKN45 (from gastric cancer) than complexes containing Pt-I bond, although none of them is more active than cisplatin. The complexes *cis* **Cl-1** and *trans* **Cl-3** have satisfactory values of IC₅₀, although a higher concentration is required to produce the 100% of cell death. The complex **I-5**, also presents a good cytotoxic activity.

3. The species bearing chloride ligands induce an activation of the apoptotic way similar to cisplatin after 24 h of treatment, and superior than the complexes bearing iodide ligands, which their apoptotic activation is clearly lower.

4. Complexes **Cl-1** and **Cl-3** induce the proteolysis of the effector caspase-3 after 48 h of treatment, while cisplatin does it at 24 h. The proteolysis of this enzyme causes the fragmentation of the antiapoptotic substrate PARP-1, generating a fragment of 89 KDa, and produces its inhibition. The complexes with Pt-I bond, **I-5** and **I-6**, produce a very weak proteolysis of caspase-3 after 48 h and, therefore, a lower inhibition of PARP-1, which is consistent with the results of viability and cell cycle analysis.

5. None of these complexes, by contrast with cisplatin, produce an stabilization of the p53 tumour suppressor protein, which indicates that the activation of the apoptotic pathway by these compounds is p53-independent. This result suggests that the complexes could be good candidates in tumours in which the gene encoding p53 is mutated, which happens in more than 50% of cancers.

6. The cell cycle analysis show that the behaviour of complex **CI-3** is the most similar to cisplatin, greatly decreasing G1 phase. None of these complexes causes the arrest of the cell cycle in the intra-S state, so they participate in advanced stages, as complex **CI-1**, which causes arrest in G2/M stage. The complexes **I-5** and **I-6**, induce a higher arrest in G1 checkpoint, inhibiting the DNA replication, while in other stages, these compounds are less active than compounds with Pt-Cl bond. Like this, the substitution of halide ligands in these complexes, produces notable differences in their cytotoxic activity, reactivity and in their action mechanism.

Chapter 4

1. The synthesis of four *trans* Pt^{IV} complexes with intercalating naphthalimide ligands from their Pt^{II} counterparts has been performed, using Cl₂ as oxidizing agent. With H₂O₂ we detected the oxidation, but the purification process has not been possible.

2. These *trans* Pt^{IV} complexes show great stability in DMSO, even higher to their Pt^{II} counterparts, in specially **Pt^{IV}-1a** and **Pt^{IV}-2b**, which stability values are up to 90% of intact complex after 1 week. In PBS and NaCl solutions, these compounds are also more stable than their parental Pt^{II} species. It is important to note the great stability of **Pt^{IV}-2a** and **Pt^{IV}-2b** in all solvents and conditions.

3. The *trans* Pt^{IV} complexes do not interact with plasmid DNA. However, in the presence of the biological reductants AsA and GSH, they suffer the reduction process to the Pt^{II} species, which interact with the DNA. These interactions let us to establish the relation with the Pt^{II} species. Complex **Pt^{IV}-1a** has shown to be more sensible to the reduction with AsA, while the other complexes are reduced faster with GSH and they interact stronger with the plasmid DNA. With both

reductants, the compounds **Pt^{IV}-1b**, **Pt^{IV}-2a** and **Pt^{IV}-2b** produce variations in the electrophoretic mobility of the two isoforms CCC and OC at the maximum concentration, ending into a co-migration (reported effect for cisplatin and their Pt^{II} derivatives). Complex **Pt^{IV}-1a** interacts stronger with CCC form in the presence of GSH. Hence, we confirm that the *trans* Pt^{IV} complexes suffer the reduction with both reductants to Pt^{II} actives species.

4. The ¹⁹⁵Pt NMR and ESI MS techniques have confirmed the reduction of **Pt^{IV}-1a** and **Pt^{IV}-2b** with AsA and GSH. Complex **Pt^{IV}-1a** is reduced to its Pt^{II} counterpart with GSH, and with AsA, we detect the [PtCl(abid)(ipa)(DMSO-d₆)]⁺ (627.16 uma) specie. On the other hand, complex **Pt^{IV}-2b** is reduced to its parental Pt^{II} compound, while with GSH, we detect the formation of the [Pt(dibibi)(dma)(GSH)]⁺ (945.22 uma) specie, where the GSH is bound to the Pt^{II} atom.

5. These complexes show great *in vitro* antitumor activity, superior than their Pt^{II} counterparts and even to cisplatin, especially those complexes that have the aliphatic naphthalimide, **Pt^{IV}-1a** and **Pt^{IV}-1b**. Complex **Pt^{IV}-2b** show low activity in the cisplatin resistant cell line, being one of its resistance mechanisms the overexpression of GSH. Therefore, it seems that the overexpression of GSH, causes the reduction and the subsequent coordination of the metal, producing the inactivation of the compound. Free ligands have not showed antiproliferative activity in the three tumour cell lines used, that confirms the formation of the Pt complex is essential for the higher antitumor activity.

6. These *trans* Pt^{IV} complexes present higher lipophilicity than their parent Pt^{II} compounds, which is consistent with their cytotoxic activity and a better cellular uptake. Complex **Pt^{IV}-1a**, which is the most active compound, also is the most lipophilic, as its Pt^{II} counterpart.

7. These results suggest that the *trans* Pt^{IV} complexes synthesized in this work have better pharmacological properties than their Pt^{II} counterparts. For this reason, these complexes would be good candidates for future researchs in antitumor therapy.

Chapter 5

1. We have synthesized four Pd^{II} complexes with two TSCN ligands, **N_HNO₂TSCNMe** and **N_HNO₂TSCN**, two mononuclear species, **PdCl(N_HNO₂TSCN)LH (M6)** and **PdCl(N_HNO₂TSCNMe)LH (M7)**, and two tetranuclear species, **[Pd(N_HNO₂TSCN)]₄ (T4)** and **[Pd(N_HNO₂TSCNMe)]₄ (T5)**.

2. We have solved the crystal structure by X-ray diffraction of the tetranuclear specie **[Pd(N_HNO₂TSCNMe)]₄ (T5)**. This structure confirms the tetranuclear moiety of the Pd^{II} complex, which is coordinated through the sulphur atom, the iminic nitrogen and the carbon in ortho position of the same ligand, and through the sulphur atom of a neighbour ligand. The core of each monomer unit consist of an eight-membered ring of alternating Pd^{II} and S atoms. The spatial distribution of the phenyl groups, and the distances between them, suggest the existence of a non-covalent π-π interaction. This structure shows the following different features in comparison with **C2** complex, **[PdN_HisTSCN)]₄**:

a) the eight-membered ring of **T5** is closer and tenser than the **C2**'s ring; b) the distances and bond angles between the Pd and S atoms are higher in complex **C2**, whose boat conformation could allow a greater accessibility of the metal centre for the biological target. This fact supports an can justify the higher cytotoxic data of **C2** complex.

3. The Pd^{II} complexes synthesized in this work, along with others of Pd^{II} and Pt^{II} developed previously in the group, have shown notable differences in their aqueous solution's behaviour, being **[PtN_HisTSCN)]₄ (C1)**, the complex which presents the best absorption UV profiles after 24 h. These differences are summarized then:

3.1. The mononuclear specie **M8** has a higher K_{obs} value than the mononuclear compounds **M6** and **M7**, because **M8** has a Pt-C bond, stronger than Pt-Cl bond.

3.2. All complexes are highly lipophilic, so there are more amount of complex in the octanol fraction, and all of them show quite different values to the cisplatin's values, possibly due to their high molecular weight.

4. These complexes show a different affinity for lysozyme and RNase, and once again, complex **C1** displays the best absorption profiles. All complexes display higher affinity at short reaction times. The structural differences of the tetranuclear complexes seem to be the responsible of their

affinity, as it seems clear that the methyl group (CH₃) bound to the -NH group of the tetranuclear species **[Pd(N_{Me}NO₂TSCNMe)]₄ (T3)**, **[Pd(N_HNO₂TSCN)]₄ (T4)** and **[Pd(N_HNO₂TSCNMe)]₄ (T5)**, does not promote or increase the affinity values. Only complex **T5** is more reactive for the two enzymes than cisplatin.

5. Studying the adducts that complex **C1** can form with lysozyme by ESI MS, we have demonstrated that DMSO is the best solvent and, that a decrease of pH induces a loss of the protein integrity. The spectra achieved using long reaction times (48 h), and higher amounts of complex **C1** with lysozyme and RNase displayed the best results obtained by ESI-MS. In spite of the complexity of the spectra, we could detect lost fragments corresponding to a monomer unit, and also some Pt:protein adduct.

6. In the presence of Melm (small models of protein binding sites), complex **C1** generates a monomer unit which is capable of re-associate in the presence of a lower amount of Melm, generating an equilibrium controlled by the amount of Melm present in the reaction media. These results have been proved by ¹H NMR, FAB and ESI MS.

7. The final conclusions of the TSCN complexes' reactivity versus DNA models are the following:

i) the interaction study of complexes **C1** and **C5** with CT DNA by UV-Vis, showed an hyperchromic effect, which suggests a non-covalent interaction between these complexes and DNA. Our group reported previously this kind of interaction using circular dichroism and DNA adduct's electrophoresis mobility. Moreover, the binding constant (K_b) of **C1** and **C5** species with CT DNA are higher than cisplatin's, which manifests their different reactivity and binding capacity. The reactivity studies of complex **C1** with 5'-GMP using ¹H NMR showed no adduct formation which supports the non-covalent binding of these TSCN complexes to the DNA.

Capítulo 6. Resumen y conclusiones

Capítulo 2

1. El complejo **1** de fórmula general *cis*-PtI₂(ipa)₂, que muestra actividad antitumoral, presenta una reactividad frente al ADN similar a la del cisplatino, y diferente frente a las proteínas. Sin embargo, este complejo aunque similar, presenta diferencias importantes que pueden justificar su citotoxicidad, entre ellas: genera una parada en la síntesis de ARN muy similar a la del cisplatino, produce cantidades muy semejantes de ICLs en el ADN y también presenta una disminución en la t_m del CT ADN ligeramente superior, lo que produce una desestabilización de la doble hélice.

2. Los complejos **2-5** de fórmula general *trans*-PtI₂(amina)(amina'), que también muestran actividad antitumoral, presentan diferencias notables con el transplatino. Así, generan: i) una parada prematura en la síntesis de ARN similar a la del transplatino, ii) forman cruzamientos 1,3-intracatenarios, diferentes a los del cisplatino; ii) producen un aumento en t_m de 4-6 °C en CT ADN, produciendo una mayor estabilización de la doble hélice, en especial el complejo **5**; y iii) una mayor cantidad de bisaductos en el ADN (80-90 %), por lo que producen lesiones bifuncionales más *eficientemente* que el transplatino, sobre todo el complejo **4**, y también se traducen en un mayor desenrollamiento del ADN plasmídico.

3. Los ensayos con irradiación UVA de los compuestos de **1-5** sólo muestran un aumento de la actividad citotóxica de los complejos *trans* en células de tumores sólidos, sobre todo en la línea LCLC-103H, donde son incluso más activos que el complejo *trans*-[PtCl₂(ipa)(ma)]. Además, bajo irradiación, los complejos *trans* **2** y **5** presentan un aumento de su afinidad por CT ADN muy superior al tratamiento en oscuridad, en especial el complejo **5**. Además, la luz UVA produce que estas dos especies sean más reactivas y afines frente a modelos más pequeños de ADN (p. ej. 5'-GMP) que en ausencia de luz.

4. Los estudios computacionales sobre los estados singlete-singlete de los complejos **1**, **2** y **5** muestran la presencia de transiciones electrónicas disociativas "d-d" por la irradiación, que involucran al orbital LUMO, induciendo la pérdida de los ligandos amina en el complejo *cis* **1** y de los ligandos yoduro en los complejos *trans* **2** y **5**, al formar aductos con el ADN, confirmando la reactividad clásica de los complejos *trans* con enlace Pt-I frente al ADN. Además, la irradiación a

365 nm es capaz de promover reacciones sucesivas, generando mono y bisaductos con modelos de ADN.

Capítulo 3

1. La reactividad clásica de complejos de Pt^{II} con ligandos yoduro y aminas alifáticas frente al ADN se ha confirmado por difracción de rayos X, obteniendo la estructura de la especie ***trans*-[Pt(9-EtG)₂(ipa)₂]²⁺**. En ella se confirma el entorno casi plano-cuadrado en torno al Pt^{II}, que se encuentra formando un bisaducto con dos moléculas de 9-EtG en posición *trans*, que están en el mismo plano. En esta estructura, se observa la existencia de una interacción intramolecular de tipo enlace de hidrógeno entre el átomo de oxígeno de la 9-EtG y el átomo de H del grupo NH₂ del ligando ipa. Esta interacción podría impedir que los ligandos puedan rotar libremente en torno al enlace Pt-N, lo que todo ello pudiera influir en la estabilidad de la doble hélice cuando se produce la platinación.

2. Los complejos con enlace Pt-Cl son más citotóxicos en la línea celular tumoral MKN45 que los complejos con enlace Pt-I, aunque ninguno de ellos es más activo que el cisplatino. Los complejos *cis* **Cl-1** y *trans* **Cl-3** con ligandos cloruro tienen valores satisfactorios de IC₅₀, aunque se requieren mayores concentraciones de los mismos para producir el 100% de muerte celular. La especie con enlace Pt-I, *trans* **I-5**, también presenta una buena actividad citotóxica.

3. Las especies con ligandos cloruro inducen una activación de la ruta apoptótica similar a la del cisplatino tras 24 h de tratamiento, y superior a la de los complejos con ligandos yoduro, cuya activación de apoptosis es claramente inferior.

4. Los complejos **Cl-1** y **Cl-3** inducen la proteólisis del efector caspasa-3 a las 48 h de tratamiento, mientras que el cisplatino lo hace a las 24 h. La proteólisis de esta enzima provoca la rotura del sustrato antiapoptótico PARP-1, produciendo un fragmento de 89 KDa, e inhibiendo su función. Los complejos con enlace Pt-I, **I-5** e **I-6**, producen una proteólisis de caspasa-3 mucho más débil después de 48 h y, por tanto, una menor inhibición de PARP-1, lo que se ajusta a los resultados obtenidos en los ensayos de viabilidad y ciclo celular.

5. Ninguno de estos complejos, a diferencia del cisplatino, produce una estabilización de la proteína supresora de tumores p53, lo que pone de manifiesto que la activación de la ruta apoptótica por estas especies sigue una vía independiente de esta proteína, convirtiéndolos en buenos candidatos en tumores donde el gen que codifica para p53 haya sufrido mutaciones, lo que ocurre en más del 50% de los casos.

6. Los ensayos de ciclo celular muestran que el comportamiento del complejo **CI-3**, es el más parecido al del cisplatino, produciendo una bajada importante en la fase G1. Ninguno de los complejos provoca la detención del ciclo en la fase intra-S, por lo que actúan en etapas más avanzadas, como el complejo **CI-1**, que produce una gran parada en la fase G2/M. Los complejos con ligandos yoduro, **I-5** e **I-6**, inducen una mayor parada en el punto de control de G1, impidiendo la replicación del ADN, mientras que en otras fases del ciclo, son claramente menos activos que los complejos con enlace Pt-Cl. Así, la sustitución de los ligandos haluro, provocan grandes diferencias en su actividad citotóxica, en su reactividad y en su mecanismo de acción.

Capítulo 4

1. La síntesis de los complejos *trans* de Pt^{IV} con ligandos intercalantes naftalimida se ha logrado a partir de los análogos *trans* de Pt^{II} usando Cl₂ como agente oxidante. Con H₂O₂ se observa la oxidación, pero no ha sido posible el proceso de purificación.

2. Estos complejos *trans* de Pt^{IV} presentan una gran estabilidad en DMSO, incluso superior a la de sus análogos de Pt^{II}, y en especial las especies **Pt^{IV}-1a** y **Pt^{IV}-2b**, con valores de hasta el 90% de complejo inalterado después una semana. En PBS y NaCl, los complejos de Pt^{IV} son también más estables que las especies de Pt^{II}. De todos los datos, cabe destacar la gran estabilidad de los complejos **Pt^{IV}-2a** y **Pt^{IV}-2b** en todos los disolventes y condiciones ensayadas.

3. Los complejos de Pt^{IV} no muestran interacción con ADN plasmídico. Sin embargo, en presencia de agentes de los agentes reductores biológicos AsA y GSH, se reducen a la especie análoga de Pt^{II}, y producen interacción, que nos sirve además para poder establecer la relación con las especies de Pt^{II}. El complejo **Pt^{IV}-1a** ha mostrado ser más sensible a la reducción con AsA, mientras que los otras

especies se reducen más rápidamente en presencia de GSH y además presentan una interacción más fuerte con el plásmido. En presencia de ambos reductores, los complejos **Pt^{IV}-1b**, **Pt^{IV} 2a** y **Pt^{IV}-2b** producen variaciones en la movilidad electroforética de las dos isoformas OC y CCC del plásmido a la máxima concentración, llegando incluso a la comigración (efecto descrito para el cisplatino y para sus análogos de Pt^{II}). El complejo **Pt^{IV}-1a** interacciona más intensamente con la forma CCC en presencia de GSH. Por tanto, se confirma que los complejos *trans* de Pt^{II} en presencia de AsA y GSH, se reducen a una especie activa de Pt^{II}.

4. Los experimentos de ¹⁹⁵Pt RMN han confirmado la reducción de las especies **Pt^{IV}-1a** y **2b** en presencia de los dos reductores, cuyos resultados han sido corroborados también por ESI MS. El complejo **Pt^{IV}-1a** con GSH se reduce a la especie precursora de Pt^{II}, y con AsA se obtiene la especie [PtCl(abid)(ipa)(DMSO-d₆)⁺ (627.16 uma). Por su parte, el complejo **Pt^{IV}-2b** se reduce al precursor de Pt^{II} con AsA, mientras que con GSH se observa la formación de la especie [Pt(dibibi)(dma)(GSH)]⁺ (945.22 uma), donde el GSH está coordinado al Pt^{II}.

5. Estos complejos presentan gran actividad antitumoral *in vitro*, superior a la de sus análogos de Pt^{II} e incluso al cisplatino, en especial aquellos portadores de la naftalimida alifática, **Pt^{IV}-1a** y **1b**. El complejo **Pt^{IV}-2b** presenta una baja actividad en la línea celular resistente al cisplatino, siendo uno de sus mecanismos de resistencia la sobreexpresión de GSH. Por tanto, parece que la sobreexpresión de este agente, provoca la reducción y posterior unión de GSH, inactivando al complejo. Los ligandos libres no muestran actividad en las líneas tumorales ensayadas, lo que apoya que la formación del complejo con Pt es fundamental para la alta actividad antitumoral.

6. Los complejos *trans* de Pt^{IV} presentan una lipofilicidad más alta que los de Pt^{II}, lo que se refleja en su actividad citotóxica y mejor internalización. El complejo **Pt^{IV}-1a**, que resulta ser el más activo, es también el más lipófilo, como también le ocurre a su análogo de Pt^{II}.

7. Estos resultados sugieren que los complejos de Pt^{IV} sintetizados en este trabajo, mejoran sus propiedades farmacológicas con respecto a las especies de Pt^{II}, lo que les convierte en buenos candidatos para futuros experimentos en terapia antitumoral.

Capítulo 5

1. Se han sintetizado cuatro complejos de Pd^{II} con dos ligandos TSCN, **N_HNO₂TSCNMe** y **N_HNO₂TSCN**, dos mononucleares, **PdCl(N_HNO₂TSCN)LH (M6)** y **PdCl(N_HNO₂TSCNMe)LH (M7)**, y dos tetranucleares, **[Pd(N_HNO₂TSCN)]₄ (T4)** y **[Pd(N_HNO₂TSCNMe)]₄ (T5)**.

2. Se ha podido obtener la estructura por difracción de rayos X de la especie tetranuclear **[Pd(N_HNO₂TSCNMe)]₄, T5**. Esta estructura confirma la naturaleza tetranuclear del complejo de Pd^{II}, cuya coordinación es a través de los átomos de S, N imínico y C orto del mismo ligando y al azufre de un ligando vecino. El núcleo de cada unidad monomérica consiste en un anillo de ocho miembros, en el que se alternan los átomos de Pd y de S de tal forma que la orientación espacial que adquieren los grupos fenilo, y sus distancias, sugieren la existencia de una interacción no covalente tipo π-π. Esta estructura presenta las siguientes características diferentes al complejo **C2**: a) El anillo de ocho miembros del complejo **T5** es más cerrado y tenso que el del complejo **C2** (más abierto), b) Las distancias y ángulos de enlace Pd-Pd y Pd-S son mayores en el complejo **C2**, cuya conformación tipo bote permitiría una mayor accesibilidad del centro metálico a la diana biológica y con ello se justificarían los mejores datos de actividad citotóxica del complejo **C2**.

3. Los complejos de Pd^{II} sintetizados en esta tesis, junto con otros de Pd^{II} y Pt^{II} desarrollados previamente por el grupo de investigación, han mostrado notables diferencias en su comportamiento en disolución acuosa, siendo el complejo **C1** el que presenta los mejores perfiles de absorción por UV. Estas diferencias se resumen a continuación:

3.1. La especie mononuclear **M8** tiene un valor de K_{obs} superior a la de las especies mononucleares **M6** y **M7**, ya que este complejo tiene un enlace M-C, más fuerte que el enlace M-Cl.

3.2. Todos los complejos son altamente lipófilos, habiendo más cantidad de complejo en la fracción de octanol, con valores muy diferentes a los del cisplatino, debido a su alto peso molecular.

4. Los complejos muestran una afinidad variable por las proteínas lisozima y RNasa, siendo nuevamente el complejo **C1** el que muestra los mejores perfiles de absorción. Todos ellos son más afines por ambas enzimas a tiempos cortos de reacción, y las diferencias estructurales que muestra cada uno, parecen ser las responsables de su afinidad, quedando claro que en las especies

tetranucleares $[\text{Pd}(\text{N}_{\text{Me}}\text{NO}_2\text{TSCNMe})_4]$ **T3**, $[\text{Pd}(\text{N}_{\text{H}}\text{NO}_2\text{TSCN})_4]$ **T4** y $[\text{Pd}(\text{N}_{\text{H}}\text{NO}_2\text{TSCNMe})_4]$ **T5**, el grupo CH_3 enlazado al $-\text{NH}$, no ayuda en los valores de afinidad. Únicamente el complejo **T5** es más afín por las dos proteínas que el cisplatino.

5. Estudiando los aductos que el complejo **C1** puede formar con lisozima por ESI MS, hemos demostrado que el DMSO es el mejor disolvente y que la disminución del pH disminuye la integridad de la lisozima sin mejorar los resultados. Los mejores resultados se obtuvieron usando tiempos largos de reacción (48 h) e incubando mayores cantidades complejo **C1** con lisozima y RNasa. Aunque stos espectros presentan un gran complejidad debido al gran número de señales, nos han permitido asignar pérdidas correspondientes al fragmento monomérico, y algún aducto Pt:proteína.

6. Se ha confirmado la reactividad del complejo **C1** frente a modelos más pequeños, como el Melm, por ^1H RMN y espectrometría de masas FAB y ESI. En presencia de Melm, el complejo **C1** no sólo origina rupturas, sino que en presencia de menor cantidad de Melm es capaz de reasociar sus unidades monoméricas originando un equilibrio controlado por la cantidad de Melm presente en el medio.

7. Las conclusiones con respecto al estudio de la reactividad de los complejos TSCN con modelos de ADN son las siguientes: El estudio de la interacción de los complejos **C1** y **C5** con CT ADN por UV-Vis muestra un efecto hipercrómico, lo que sugiere la existencia de una interacción no covalente entre estos complejos y el ADN. Este efecto ya había sido observado previamente con dicroísmo circular y gel de agarosa en los complejos **C1** y **C2**. Los complejos **C1** y **C5** además presentan una constante de interacción (K_b) con el CT ADN muy superior a la del cisplatino, poniendo de manifiesto su distinta reactividad y capacidad de unión por a esta molécula. El estudio de la reactividad complejo **C1** con 5'-GMP por ^1H RMN, no ha permitido observar la formación de aductos, lo que pone de manifiesto que estos complejos no se unen covalentemente al ADN.

