



ESCUELA DE DOCTORADO
INTERNACIONAL EN CIENCIAS
DE LA SALUD DE LA USC

Nerea
Davila Ferreira

Tesis doctoral

*Estudio y caracterización
de la acción biológica
de ciertos compuestos
organometálicos sobre líneas
celulares cancerígenas*

Santiago de Compostela, 2020



TESIS DE DOCTORADO

**ESTUDIO Y CARACTERIZACIÓN DE LA
ACCIÓN BIOLÓGICA DE CIERTOS
COMPUESTOS ORGANOMETÁLICOS
SOBRE LÍNEAS CELULARES
CANCERÍGENAS**

Nerea Davila Ferreira

ESCUELA DE DOCTORADO INTERNACIONAL DE LA UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

PROGRAMA DE DOCTORADO EN NANOMEDICINA

SANTIAGO DE COMPOSTELA

2020







Dña. **Nerea Davila Ferreira**

Título de la tesis: **Estudio y caracterización de la acción biológica de ciertos compuestos organometálicos sobre líneas celulares cancerígenas.**

Presento mi tesis, siguiendo el procedimiento adecuado al Reglamento y declaro que:

- 1) La tesis abarca los resultados de la elaboración de mi trabajo.
- 2) De ser el caso, en la tesis se hace referencia a las colaboraciones que tuvo este trabajo.
- 3) Confirmando que la tesis no incurre en ningún tipo de plagio de otros autores ni de trabajos presentados por mí para la obtención de otros títulos.

Y me comprometo a presentar el Compromiso Documental de Supervisión en el caso que el original no esté depositado en la Escuela.

En **Santiago de Compostela, 23 de diciembre de 2020.**

Fdo: Nerea Davila Ferreira



D. **Fernando Ignacio Domínguez Puento**

En condición
de: **Tutor/a y director/a**

Título de la
tesis: **Estudio y caracterización de la acción biológica de ciertos compuestos organometálicos sobre líneas celulares cancerígenas.**

INFORMA:

Que la presente tesis, se corresponde con el trabajo realizado por Dña. **Nerea Davila Ferreira**, bajo mi dirección/tutorización, y autorizo su presentación, considerando que reúne los requisitos exigidos en el Reglamento de Estudios de Doctorado de la USC, y que como director/tutor de esta no incurre en las causas de abstención establecidas en la Ley 40/2015.

En Santiago de Compostela, 23 de diciembre de 2020

Fdo: Dr. Fernando Ignacio Domínguez Puento



D. **Anxo Vidal Figueroa**

En condición
de: **Director/a**

Título de la
tesis: **Estudio y caracterización de la acción biológica de ciertos compuestos organometálicos sobre líneas celulares cancerígenas.**

INFORMA:

Que la presente tesis, se corresponde con el trabajo realizado por Dña. **Nerea Davila Ferreira**, bajo mi dirección/tutorización, y autorizo su presentación, considerando que reúne los requisitos exigidos en el Reglamento de Estudios de Doctorado de la USC, y que como director/tutor de esta no incurre en las causas de abstención establecidas en la Ley 40/2015.

En Santiago de Compostela, 23 de diciembre de 2020

Fdo: Dr. Anxo Vidal Figueroa



Este trabajo fue financiado parcialmente por la empresa NANOGAP SUB-NM-POWER S.A, propietaria y comercializadora de los Ag-AQCs.





“Defiende tu derecho a pensar, porque incluso pensar de manera errónea es mejor que no pensar” Hipatia de Alejandría

“No hay nada que temer en la vida, sólo hay cosas que entender. Ahora es el momento de comprender más para que podamos temer menos” Marie Curie



Que cada vez sea menos gente la que se quede en el camino.

A Jose y los abuelos.





AGRADECIMIENTOS

Terminando la revisión de este trabajo, son muchas las imágenes que se cruzan por mi cabeza haciendo que recuerde lo vivido durante todos estos años. La primera vez que cruzas la puerta de un laboratorio, lo haces con unas ganas infinitas de aprender y el entusiasmo de quien sabe que está empezando una aventura, pero, ¿cómo mantener esa ilusión a lo largo de todo el proceso? Para mí la respuesta es muy fácil, y es rodearte de personas que ayuden a que sientas que estás donde deberías estar, por lo que es el momento de agradecer a todas ellas el apoyo sin en el que hoy no estaría cerrando esta etapa.

En primer lugar, quiero comenzar dando las gracias a mi director y mentor, el Dr. Fernando Domínguez, por permitir que una futura graduada pudiera conocer de primera mano sobre qué trataba eso de la investigación y hacer que la elección fácil fuera decantarse por realizar una tesis. Ojalá mucha gente tenga la misma suerte y se encuentre con el positivismo, entusiasmo y palabras de aliento que me encontré yo siempre que cruzaba las puertas de ese despacho.

Al Dr. Anxo Vidal, siempre dispuesto a echar una mano en lo que hiciera falta resolviendo cualquier duda que pudiera surgir. A la Dra. Begoña García y al Dr. Gustavo Espino de la Universidad de Burgos, por proporcionarme los complejos protagonistas de este trabajo, y a Juan Cuñarro y la Dra. Sulay Tovar, por colaborar con nosotras y aportar solidez a este trabajo. A todo el equipo de NANOGAP SUB-NM-POWER S.A, por permitir que me acercara al mundo de la industria y pudiera ver de primera mano cómo el trabajo que desarrollamos entre poyatas puede tener una aplicabilidad directa más allá de las paredes del laboratorio.

A todas mis compañeras de laboratorio, sin ellas este trabajo no existiría. A Puri, por enseñarme todo lo necesario para embarcarme en esta aventura e ir guiándome durante el proceso. A Carmen, siempre disponible para ayudar en lo que hiciera falta. A Mabel, por compartir tantas horas de trabajo y discusión de resultados, a lo largo de este manuscrito queda clara tu colaboración indispensable. A Sara, por nuestras discusiones a ninguna parte que amenizaban los experimentos. A Blanca, siempre dispuesta a echar una mano y facilitarnos el trabajo

a todas; fue un placer poder compartir estos últimos coletazos contigo, los retos compartidos siempre se llevan mejor. A Ángela, por colarse de repente y hacer que fuéramos un poco más familia, pero sobre todo gracias por pasar a formar parte de esa red de fuera sin la que no estaría aquí; gracias por hacer que los tiempos de pandemia quedaran llenos de historias y por haber sumado a Laura, sin vosotras estos últimos meses habrían pasado a formar parte de esa etapa doctoral que prefieres olvidar. Y a Vanesa, sin toda tu ayuda a lo largo de estos años, no estaría escribiendo esto, literalmente; has hecho que incluso después de jornadas infinitas sintiera que iba a merecer la pena, después de haber sido la que pasaba de mí cuando llegué, te convertiste en esa amiga con la que sentarte a hablar de cualquier cosa y en la mejor compañera de trabajo que pudiera haber tenido.

A todas las personas con las que en algún momento he compartido poyata y sala de cultivo, ¡de todas vosotras me llevo algo!, y gracias también a Alexandra Elbakyan, la reina pirata de la ciencia.

En segundo lugar, agradecer a esa parte formada por todas las personas que me acompañaron fuera de esas cuatro paredes, empezando por aquellas con las que ya compartí los años de carrera. Gracias a todas las compañeras de Biosant, cuando os convirtáis en alguien importante en este mundillo, podré decir que nos dedicábamos a llevar la ciencia a los bares y brindar por todo lo que íbamos superando. A Rita, por ser una parte fundamental de mi rutina durante muchos años y seguir estando a pesar de todo lo que ha ido cambiando a nuestro alrededor. A Ici, por permanecer igual de cerca, aunque los kilómetros que nos separen no se den acortado. A Magalí, por el tiempo disfrutado bajo el mismo techo y todas las aventuras de después, llegarán más! Y, sobre todo, a Fátima, por convertirse en el complemento que no sabía que me faltaba, gracias por todos estos años, por amoldarte siempre a mi caos de quehaceres y no hacer otra cosa que sumar buenos momentos, a ver que nos esperan los próximos diez.

A mi familia de la Inma, no sé cómo habría llegado hasta aquí sin vosotras, convertisteis Compos en casa y habéis conseguido que los entrenamientos nocturnos fueran lo más esperado de algunos días; a pesar de todas mis quejas, sabéis que me hicisteis muy feliz. A Noa, gracias por compartir mucho más que un banquillo, seguiremos

aprendiendo juntas. A Cebro, esa tía borde que se convirtió en el par perfecto tanto dentro como fuera de la cancha, nunca fue tan fácil comunicarse sin decir ni mu, gracias por pasar a forma parte de esa red. Y a Bea, que llegó para darle otro punto de vista a todo y romper esquemas, gracias por llenar de color y olor a sal tantos momentos, por ser el puente que me faltaba. ¡Siempre en mi equipo, amigas!

Y gracias a ti, si aún estás leyendo esto y esperabas encontrar tu nombre, siempre hay algo que se queda en el tintero, ¡no me lo tengas en cuenta! Gracias a todas las personas que me han ido acompañando durante todo este tiempo, pero, sobre todo, a las que habéis ido llegando al final y pensáis en quedaros ¡a ver hacia dónde nos lleva todo esto!

Y, por último, muchas gracias a mi familia, o alicerce sobre o que creceu todo isto. A Ma y Pa, por creer en mí, por entender que esto es lo que quería hacer y animarme a intentarlo, siempre ahí sosteniéndolo todo. A Aino, porque contigo todo es menos malo, pero, sobre todo, cualquier cosa es mejor, por tu entusiasmo y tu ánimo en todo momento, por ayudar a darle sentido a cada decisión. Esto es tanto vuestro como mío.

Graziñas por todo y, como digo siempre, non botemos por elas, pero veña o que veña, que sexa con vós!



ÍNDICE

1. RESUMEN/RESUMO/ABSTRACT.....	1
2. INTRODUCCIÓN.....	7
2.1 Diseño de metalofármacos.....	12
2.2 Cáncer.....	24
2.2.1 Tratamientos actuales.....	27
2.2.2 Últimas tendencias: búsqueda de nuevas dianas.....	29
2.2.3 Cáncer y bacterias.....	35
2.3 Compuestos empleados.....	38
3. OBJETIVOS.....	41
4. MATERIAL Y MÉTODOS.....	45
4.1 Células.....	47
4.1.1 Líneas celulares.....	51
4.1.2 Estudio del ciclo celular.....	52
4.1.3 Inhibición de la síntesis proteica.....	53
4.1.4 Cuantificación de la oxidación de 8-OHdG.....	53
4.1.5 Determinación de los niveles de ROS.....	54
4.1.6 Estudio de las vías ferroptótica y necroptótica.....	55
4.1.7 Determinación de la expresión de CHOP.....	56
4.1.8 Determinación de la expresión de ATF6.....	58
4.1.9 Tratamiento combinado con β -mercaptoetanol.....	60
4.1.10 Tratamiento combinado con DTT.....	60
4.1.11 Tratamiento combinado con NAC.....	61
4.1.12 Tratamiento combinado con ácido aspártico.....	62
4.1.13 Análisis de la respiración mitocondrial.....	63
4.1.14 Cuantificación de la disipación de la energía en forma de calor: experimento <i>in vivo</i>	64
4.1.15 Análisis estadístico.....	65
4.2 Bacterias.....	65
4.2.1 Cepas bacterianas.....	67
4.2.2 Efecto bactericida o bacteriostático.....	67
4.2.3 Crecimiento bajo condiciones de hipoxia.....	69
4.2.4 Determinación de los niveles de ROS.....	70
4.2.5 Determinación del potencial de membrana.....	71
4.2.6 Estudio de la respiración mitocondrial.....	72

4.2.7 Ensayos de eficiencia biocida en placas tratadas con AQCs...	73
4.2.8 Influencia del NaCl en la capacidad biocida.....	75
4.2.9 Ensayos de eficiencia biocida en soportes con AQC.....	75
4.2.10 Migración de AQC.....	76
4.2.11 Análisis estadístico.....	78
5. RESULTADOS.....	79
5.1 Estudio del mecanismo de acción del complejo de rutenio.....	83
5.1.1 Eventos generales.....	85
5.1.2 Ferroptosis y necroptosis.....	88
5.1.3 Respuesta a estrés de retículo endoplásmico.....	94
5.2 Estudio del mecanismo de acción del complejo de rodio.....	99
5.2.1 Eventos generales.....	101
5.2.2 Respuesta al estrés de retículo endoplásmico.....	104
5.2.3 Exploración de otras vías.....	106
5.3 Estudio del mecanismo de acción del complejo de iridio.....	113
5.3.1 Análisis del estado general de las células.....	115
5.3.2 Valoración del estado del retículo endoplásmico.....	119
5.3.3 Efectos sobre las mitocondrias.....	121
5.4 Estudio de compuestos bactericidas.....	127
5.4.1 Evaluación de la actividad antibiótica de los compuestos organometálicos.....	129
5.4.1.1 Mecanismo de acción.....	135
5.4.2 Clústeres atómicos cuánticos depositados sobre superficies de interés industrial.....	140
5.4.2.1 Efecto bactericida de AQC depositados sobre portaobjetos.....	140
5.4.2.2 Efecto bactericida de AQC sobre placas de cultivo.....	141
5.4.2.3 Liberación de Ag-AQC de las resinas.....	145
6. DISCUSIÓN.....	149
7. CONCLUSIONES.....	157
8. LISTADO DE ABREVIATURAS.....	161
9. BIBLIOGRAFÍA.....	165

1 RESUMEN/RESUMO/ABSTRACT





RESUMEN

El uso de los metales en el campo de la medicina data de hace más de 5.000 años, y el diseño racional de metalofármacos ha sido un área profundamente estudiada desde la inclusión del cisplatino en clínica. Su éxito como tratamiento antitumoral ha guiado la búsqueda de complejos que puedan mejorar sus resultados y hacer frente a los efectos adversos ligados al mismo, abriéndose camino los compuestos organometálicos. En este trabajo hemos empleado tres compuestos con estructura “half-sandwich”, que se diferencian fundamentalmente en su centro metálico: Ru (II), Rh (III), Ir (III), presentando todos ellos capacidad antitumoral, pero desencadenando alteraciones biológicas diferenciadas que inician el mecanismo de muerte a través de distintas vías. Además, se ha estudiado su capacidad biocida debido al creciente problema asociado a la resistencia antimicrobiana, introduciendo un segundo grupo de compuestos, clústeres atómicos cuánticos de plata, que presentan propiedades prometedoras en este campo.

RESUMO

O uso dos metais no campo da medicina remóntase a máis de 5.000 anos atrás, e o deseño racional de metalofármacos foi profundamente estudado dende a inclusión do cisplatino na clínica. O seu éxito como tratamento anticanceroso guiou a procura de complexos que poidan mellorar os seus resultados e superar os efectos adversos ligados ó mesmo, abríndose camiño os compostos organometálicos. Neste traballo estudamos tres compostos con estrutura “half-sandwich”, que se diferencian fundamentalmente no seu centro metálico: Ru (II), Rh (III), Ir (III), presentando todos capacidade anticancerosa, pero desencadeando alteracións biolóxicas diferenciadas que inician o mecanismo de morte a través de distintas vías. Estudouse ademais a súa capacidade biocida debido o crecente problema asociado á resistencia antimicrobiana, introducindo un segundo grupo de compostos, clústeres atómicos cuánticos de prata, que presentan propiedades prometedoras neste eido.

ABSTRACT

The use of metals in the medical field dates back to more than 5,000 years. The rational design of metal compounds has been a deeply studied field since the inclusion of cisplatin in the clinic. Its success as an antitumor treatment has led the search for complexes that can improve its results and deal with the side effects associated with it, opening the way for organometallic compounds. In this research, we have used three compounds with a "half-sandwich" structure which differ mainly in their metallic center: Ru (II), Rh (III), Ir (III). These compounds caused different biological alterations that initiated the death mechanism through different pathways demonstrating antitumor capacity. Furthermore, its biocidal capacity has been studied due to the increasing problem associated with antimicrobial resistance, introducing a second group of compounds, silver quantum atomic clusters, which have promising properties in this field.







2 INTRODUCCIÓN





Los metales se han usado en el campo de la medicina desde hace unos 5.000 años debido a que existía la creencia de que los metales preciosos podrían poseer también propiedades beneficiosas para la salud ¹. A pesar del uso históricamente probado de los mismos, que se remonta por lo tanto a las civilizaciones antiguas de Mesopotamia, Egipto, India y China, la química inorgánica en el campo de la medicina es considerada una disciplina bastante joven. Esto es debido a que los mecanismos de acción de los medicamentos con base metálica, conocidos como metalofármacos, se fueron estableciendo tiempo después de la descripción de las propiedades medicinales de los mismos. Los iones metálicos desempeñan papeles fundamentales en los procesos biológicos, y su introducción intencionada en el sistema biológico humano ha ido resultando de gran utilidad tanto en el tratamiento como en el diagnóstico de enfermedades^{2,3}

En la actualidad, previamente a la evaluación clínica de un determinado compuesto, se debe establecer su mecanismo de acción, pero durante el desarrollo temprano de los metalofármacos, éste era asumido o pasado por alto con la finalidad de encontrar posibles tratamientos de manera más inmediata². Estos compuestos son los protagonistas de una larga historia en la química médica, siendo en el año 1910 cuando Paul Ehrlich describió el primer compuesto de estas características con potencialidad clínica, el Salvarsan[®], un compuesto organoarsénico con actividad antimicrobiana que fue utilizado en el tratamiento de la sífilis hasta que se reemplazó por la penicilina después de la segunda guerra mundial.^{3,4} El método de trabajo seguido por este investigador supuso el nacimiento de la quimioterapia, entendiéndola como el uso de fármacos que actúan de forma específica contra algún patógeno en particular sin dañar al huésped, acuñando el término de “bala mágica” para designar a estos agentes terapéuticos ideales. Paul Ehrlich fue clave en la transición de la farmacología experimental a la terapia farmacológica, ya que se centró en la síntesis de fármacos diseñados contra una diana específica. Para ello, rompiendo con la tendencia de estudiarlos sobre animales o tejidos sanos, hizo hincapié en la necesidad de reproducir enfermedades en animales y a partir de los mismos iniciar la evaluación de posibles fármacos. ^{5,6}

Con la aproximación de Ehrlich se asentaron las bases experimentales de una renovada farmacología, que seguiría el siguiente flujo de trabajo: 1) síntesis de estructuras químicas que presentaran diferentes variaciones entre sí con la finalidad de encontrar la aproximación más adecuada; 2) cribado farmacológico para evaluar su eficacia; 3) modificación de la estructura de estas sustancias tóxicas buscando hacerlas lo más seguras posibles o bien síntesis de nuevas sustancias a partir de estos resultados. Tenemos, por lo tanto, desde los inicios del siglo veinte, la aproximación sistemática clave para la obtención de fármacos, situándose aquí el inicio de la química inorgánica médica, relacionada con el estudio y desarrollo de complejos metálicos con actividad terapéutica o de diagnóstico.^{2,4,5} Ésta presenta dos focos principales de estudio: en primer lugar, fármacos (ligandos) cuya diana está determinada por la presencia de iones metálicos en los sistemas biológicos, ya sean libres o unidos a proteínas; y, en segundo lugar, compuestos en los que el ion metálico central juega un papel fundamental en su mecanismo de acción.⁷ Las aplicaciones médicas desarrolladas gracias a esta disciplina supusieron un progreso impresionante en el campo de la medicina, pudiendo destacar: uso de radiofármacos de terapia y de diagnóstico, agentes de contraste para imagen por resonancia magnética (IRM), uso de agentes metálicos como compuestos terapéuticos y de diagnóstico, como agentes antitumorales, inhibidores enzimáticos, reconocimiento de proteínas, o suplementación de elementos esenciales.^{8,9}

A pesar del papel fundamental de los experimentos de Ehrlich en el desarrollo de este campo, cabe mencionar que la expansión del mismo se debería situar en el año 1965, con el descubrimiento casual de la actividad antitumoral del cisplatino, llevado a cabo por Barnett Rosenberg y Loretta VanCamp mientras estudiaban el efecto de una corriente eléctrica en *Escherichia coli*. Encontraron que la división celular resultaba inhibida por la producción de cis-diaminodicloroplatino (II), o cisplatino, a partir de electrodos de platino: la bacteria alcanzaba hasta 300 veces su tamaño normal pero la división celular no tenía lugar.^{3,10} Estudios posteriores indicaron que este compuesto poseía actividad antitumoral, hallazgo que condujo a la investigación y desarrollo de metalofármacos como agentes

antitumorales. Dicho compuesto había sido descrito por Michele Peyrone en el año 1844, Alfred Werner descubrió su estructura en el año 1893, y su mecanismo de acción, descrito inicialmente en el año 1985,^{11,12} se continúa estudiando en la actualidad, cuando ya han pasado 55 años desde que se descubrió su capacidad antitumoral y 42 desde que la FDA estadounidense aprobó su uso en la clínica. Con esto queda clara la importancia del desarrollo de esta disciplina de trabajo que estrechó los lazos entre la química y la medicina y permitió que en la actualidad contemos con numerosos metalofármacos envueltos en estudios clínicos.^{8,13,14,15}

Gracias a las técnicas analíticas de las que disponemos en la actualidad se están produciendo grandes avances en la descripción de metalofármacos diseñados en el laboratorio, así como en la determinación de las bases moleculares de sus mecanismos de acción. Además, el desarrollo de la química médica inorgánica está impulsado por el creciente conocimiento acerca de las funciones que presentan los iones metálicos en los sistemas biológicos. Actualmente, se cree que son 24 los elementos esenciales para la vida de los mamíferos (H, C, N, O, F, Na, Mg, Si, P, S, Cl, K, Ca, V, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Se, Mo, Sn, y I), pero incluso éstos pueden ser tóxicos a dosis altas. A pesar de que la bioquímica de varios de los mismos todavía no se conoce en profundidad, incluido su papel en las enfermedades, representan un buen punto de partida para el desarrollo de este tipo de compuestos. De esta manera, aunque la detección aleatoria de posibles fármacos a partir del cribado de bibliotecas de compuestos sigue siendo útil, el diseño racional ha ido ganando importancia. La descripción de las características que pueden proporcionar utilidad clínica a estos compuestos se ha ido estableciendo a lo largo de numerosos estudios, tomando como base los ya comentados primeros casos de éxito en el campo: el Salvarsan[®] y el cisplatino. El primero revolucionó la investigación de los antibióticos, y el segundo inspiró el desarrollo de nuevos metalofármacos para diagnosticar y tratar enfermedades como la diabetes, el Alzheimer y el cáncer.^{8,14}

En el diseño de este tipo de fármacos se debe tener en cuenta que el comportamiento del ion metálico dependerá del contexto biológico

en el que se encuentre, por lo que la determinación de la diana a la que queremos dirigir el fármaco resultará clave en este proceso.

2.1 DISEÑO DE METALOFÁRMACOS

El trabajo realizado por Alfred Werner acerca de la estructura de los complejos metálicos asentó las bases de la química inorgánica para entender que los metalofármacos podían proporcionar mecanismos de acción inaccesibles para otro tipo de compuestos. Son mucho más versátiles de lo que se pensaba inicialmente, pudiendo ajustar casi a voluntad sus características para conseguir una actividad biológica y mecanismo de acción determinados.^{16,17}

Con estos trabajos de Werner, publicados en el año 1893 (cuando todavía no se conocía el papel del electrón, indispensable actualmente en la explicación de los enlaces químicos), nace la “química de coordinación”, que hoy en día es la que se encarga del estudio de los compuestos o complejos de coordinación, definidos por la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC) como aquellos que están formados por un átomo central, generalmente un metal, unido a un conjunto de otros átomos o grupos de átomos denominados ligandos, y que en un primer momento recibieron el nombre de *Verbindungenhöher*: compuestos de orden superior. Werner sugirió además que los metales tienen dos tipos de valencia: *Hauptvalenz* o primaria (ionizable), y *Nebervalenz* o secundaria (no ionizable), así como que cada metal tendría un número característico de valencias secundarias dirigidas en el espacio para dar una conformación geométrica definida. Después de numerosos experimentos, encontró que dependiendo del número y tipo de moléculas en la estructura secundaria se obtenían un número específico de compuestos, los isómeros. Para explicar esto tuvo que proponer la configuración que debían tener las moléculas asociadas a la valencia secundaria, y fueron necesarios muchos estudios para que la comunidad científica diera credibilidad a todas sus conclusiones.^{16,18}

De esta manera, en el diseño de metalofármacos como agentes terapéuticos y de diagnóstico, con la finalidad de controlar su reactividad y modificar sus propiedades, se tendrán en cuenta las siguientes características: la elección del metal, el número de

coordinación (*Nebenvalenz*); el estado de oxidación (*Hauptvalenz*); el tipo, número y propiedades de los ligandos; la estabilidad termodinámica; la estabilidad cinética; y la estabilidad nuclear. Como parámetros transversales relacionados con la elección de todas estas características, nos encontramos el control de la toxicidad (efectos secundarios) y la elección del blanco en tejidos, órganos o células específicas donde es necesaria la actividad del metal. Por otro lado, cabe señalar que los iones metálicos pueden ser introducidos en los sistemas biológicos, pero también retirados mediante ligandos que se unirán selectivamente a los mismos, y de esta forma el tratamiento y entendimiento de numerosas enfermedades se ven beneficiados por los avances en el diseño selectivo de este tipo de compuestos terapéuticos y de diagnóstico.^{16,17,19}

Respecto al control de la toxicidad, debemos tener en cuenta en primer lugar la cantidad del metal que acepta un organismo, lo que ha supuesto un problema a la hora de sintetizar estos fármacos, ya que su determinación no resulta fácil. Actualmente disponemos de aproximaciones analíticas que nos permiten conocer mucho mejor la dinámica de los metales en el organismo, y en un primer momento se tomó como base el diagrama de Bertrand (1912). En el mismo (Fig. 1A) se representó la curva dosis-respuesta de los elementos metálicos esenciales: su rango de exposición segura está limitado en dosis bajas por síntomas de deficiencia y en dosis altas por síntomas de toxicidad de creciente gravedad, y jugando con esto podemos definir la ventana con potencialidad terapéutica (Fig. 1A). Hoy en día se puede diferenciar entre elementos esenciales y no esenciales fijándonos principalmente en su curva dosis-respuesta (Fig. 1B), y aunque esta clasificación se encuentra bajo debate debido a que las funciones moleculares de ciertos elementos todavía no están bien definidas, cabe tenerlo en cuenta a la hora del diseño de los metalofármacos. Otro punto importante en la elección del ion metálico, es que se trate o no de un metal pesado; los problemas de salud asociados a su acumulación supusieron un estigma a la hora de popularizar el uso de este tipo de compuestos en la clínica. De esta manera, las ventanas terapéuticas se definen rigurosamente para minimizar los efectos secundarios: la utilidad de cualquier fármaco es un equilibrio entre su actividad y su toxicidad.^{1,7,20}

El complejo que albergará el ion metálico deberá presentar una estructura con unas características específicas que contribuirán a disminuir la temida toxicidad, y actualmente se pueden diferenciar dos clases de metalofármacos con potencialidad clínica: los clásicos complejos metálicos de coordinación y los compuestos organometálicos. En los complejos de coordinación, el metal se une a una molécula o fragmento por un átomo distinto del carbono, y los compuestos organometálicos se definen como complejos metálicos que contienen al menos un enlace directo, covalente metal- carbono. Que estos sean las clases de metalofármacos con potencialidad clínica que encontramos en la actualidad se debe al desarrollo del campo a partir de los buenos resultados que se han ido obteniendo con el cisplatino en el tratamiento de diferentes tipos de cáncer, lo que promovió la investigación de otros compuestos con estructura similar.^{21,22}

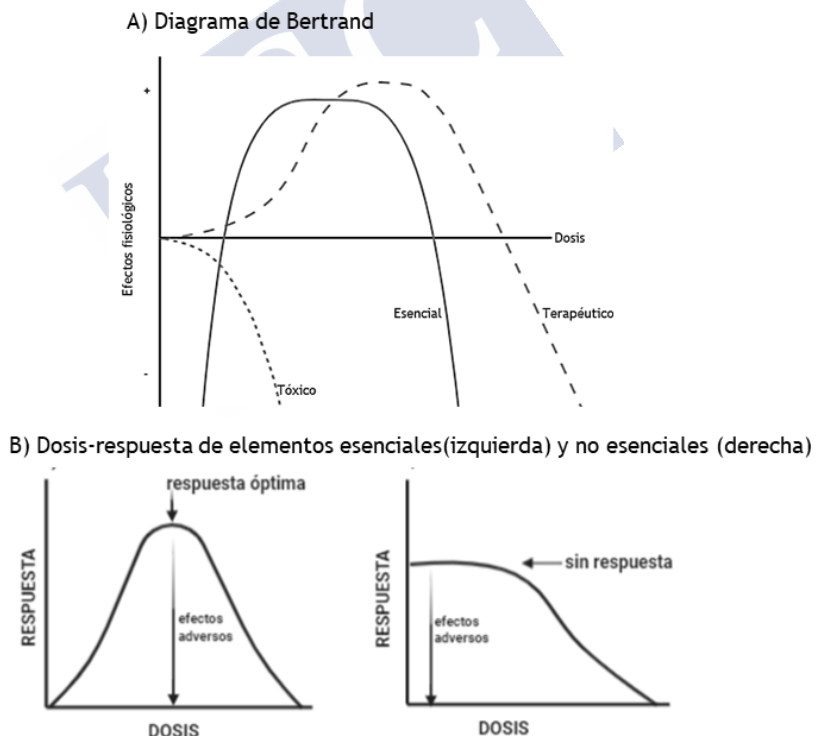


Figura 1. A) Diagrama de Bertrand ilustrando la variabilidad de respuesta fisiológica ante dosis crecientes de un determinado metal. Se representan las

diferencias entre un elemento esencial, tóxico y terapéutico, encontrándose bajo el eje de las X los valores que resultarían tóxicos para el organismo. (Adaptado de Thompson, K, *Encyclopedia of Inorganic Chemistry*, 2010; con permiso de Elsevier, número de licencia 4970270355155). **B) Gráfico dosis-respuesta de elementos esenciales y elementos no esenciales.** Se representa en el eje de las Y el nivel de respuesta obtenida frente a concentraciones crecientes en el eje de las X, correspondiéndose la gráfica que encontramos a la izquierda con la curva dosis-respuesta de los elementos esenciales, y la de la derecha, con la de los elementos no esenciales (Adaptado de *Metallomics*, 2012, 4, 1017-1019; con permiso de Elsevier, número de licencia 1084395-1).

Dentro del grupo formado por los complejos de coordinación encontramos al cisplatino, un complejo inorgánico de geometría planocuadrada, y los resultados clínicos obtenidos con el mismo propiciaron que se realizaran numerosos estudios para determinar qué características estructurales serían las que responsables de dotar de actividad antitumoral a un compuesto de platino. Cleare y Hoeschele, mediante el análisis de numerosos compuestos análogos al cisplatino, fueron los que establecieron, en el año 1973, estas relaciones actividad-estructura, determinando que los criterios estructurales que se tendrían que seguir son:²³ a) los compuestos deben tener dos grupos amino con geometría *cis* (resultando inactivos los de geometría *trans*); b) es necesario, aunque no suficiente, que los compuestos tengan dos grupos salientes que sean *cis* entre sí, entendiéndose grupos salientes como aquellos que se pierden más fácilmente; c) los compuestos deben ser neutros (así cuando se encuentren circulando por el organismo serán inactivos, y una vez en el ambiente intracelular sufrirán el proceso de activación); d) los compuestos con menos sustituyentes alquilo sobre la amina son más activos, debiendo poseer cada ligando amina al menos un hidrógeno unido al nitrógeno; e) la facilidad con la que se pierdan los grupos salientes afectará a la actividad y toxicidad de los compuestos, siendo preferible que estos grupos salientes sean solo moderadamente fáciles de eliminar. La estructura general de estos complejos será la mostrada en la Fig. 2A, donde la X representa a los grupos salientes y el ligando R será un hidrógeno o un sustituyente alquilo. La gran mayoría de los compuestos de platino que se han testado se adhieren a estos criterios, pero nos encontramos todavía con pocos ejemplos que hayan llegado a la clínica.

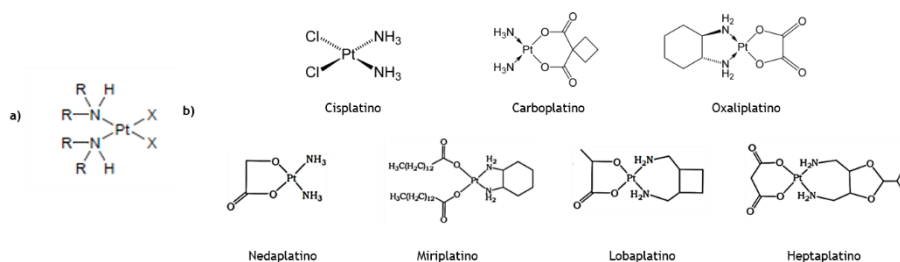


Figura 2. A) Estructura general de los compuestos de platino con potencialidad antitumoral. R= sustituyente alquilo o H; X= grupo saliente. (Adaptado de *R. Alderden, M. Hall, T. Hambley et al, Journal of Chemical Education*; con permiso de Copyright (YEAR) American Chemical Society, 2006) **B) Metalofármacos con base de platino aprobados en el tratamiento contra el cáncer.**

Los primeros esfuerzos en el desarrollo de complejos de platino se llevaron a cabo por el grupo de trabajo de Rosenberg, en el año 1969, siendo los responsables del desarrollo del carboplatino, que, junto con el oxaliplatino y el cisplatino, son los únicos compuestos de platino que han sido aprobados por la FDA para el tratamiento de una amplia gama de cánceres (en 1989, 2002 y 1978, respectivamente). Representan el 50% de las terapias antitumorales, destacando su actividad terapéutica en un conjunto de tumores sólidos. Cerca de 40 complejos de platino han alcanzado los ensayos clínicos, siendo el más prometedor el satraplatino, que podría unirse a los 3 nombrados con anterioridad.^{13,24,25} La estructura de todos estos compuestos de platino (II) es plano cuadrada (Fig. 2) y se adecúa a la establecida por Cleare y Hoeschele, destacando también otros compuestos cuyo uso clínico se aprobó en ciertos países: el nedaplatino y el miriplatino, el lobaplatino, y el heptaplatino, aprobados, respectivamente, en Japón, China y Corea.²⁶⁻²⁸

Todos estos medicamentos de platino (II) presentan las mismas limitaciones curativas que se fueron viendo con el cisplatino: su administración está ligada a la aparición de graves efectos secundarios y la adquisición o presencia de resistencia a los mismos^{29,30} Es por esto que, a pesar de su vigente uso en clínica, continúa aumentando la búsqueda de nuevas entidades químicas que puedan superar estas limitaciones. Estos complejos han servido para establecer los múltiples factores que determinarán que un compuesto presente actividad

antitumoral, además de su estructura: a) los parámetros termodinámicos y cinéticos del centro metálico, dependiendo sus preferencias de unión de la naturaleza del metal y de su estado de oxidación; b) la naturaleza de los ligandos no salientes, que afectará de manera crucial a parámetros que determinarán la biodistribución y farmacocinética de los complejos (tamaño, solubilidad, interacciones no covalentes, lipofilidad, etc.); c) las cinéticas de activación (por ejemplo, si ésta se produce a través del intercambio de ligandos, será clave la naturaleza de los ligandos salientes), que de manera ideal ocurrirá en un momento y lugar apropiado dentro del organismo. El control de todos estos factores, así como la interconexión de los mismos, supone una tarea extremadamente difícil, especialmente si consideramos que debe realizarse en un entorno biológico, lo que explica que se haya aprobado el uso en clínica de tan pocos metalofármacos.

En el diseño racional de los posibles fármacos a partir de todas estas premisas, nos encontramos con una gran desventaja: suelen generar una alta toxicidad causada por una reactividad incontrolada con biomoléculas diferentes a las del sitio específico de la enfermedad a tratar. Disponemos básicamente de dos estrategias para disminuir esta toxicidad general: el desarrollo de una activación altamente selectiva, o bien la entrega específica en la diana a tratar. Ambos enfoques, además de reducir esta toxicidad, podrían incrementar su eficacia.^{31,32}

Debido a la alta toxicidad asociada a estos compuestos de platino, se han estado investigando compuestos que contuvieran metales diferentes con el objetivo de descubrir nuevos fármacos citotóxicos con mayor índice terapéutico, pero con muy pocos se han alcanzado los ensayos clínicos.³³ Se han hecho estudios prácticamente de todos los grupos de metales de la tabla periódica, siendo los complejos de rutenio, de titanio y de oro, los que mejores resultados han arrojado.³⁴ En esta búsqueda es donde surgen los, ya nombrados anteriormente, compuestos organometálicos, concepto introducido por Gérard Jaouen y Anne Vessières en el año 1985, tratándose de compuestos con función biológica y con un enlace metal-carbono, ya sean de origen natural o sintético.³⁵

Comparados con los compuestos orgánicos, los compuestos organometálicos ofrecen un amplio rango de oportunidades en el diseño

de nuevas clases de posibles fármacos, con nuevos mecanismos de acción potenciales, incluso cuando los comparamos con los compuestos de coordinación clásicos. Esto se debe a que presentan una amplia variedad estructural, pudiendo ir de linear a octaédrica (e incluso más allá), y una diversa estequiometría (por ejemplo, un complejo octaédrico con seis ligandos diferentes presentaría treinta estereoisómeros), pudiendo controlar sus propiedades cinéticas mediante el diseño racional de los ligandos. Además, normalmente no presentan carga, son relativamente lipofílicos, y su ion metálico se encuentra en un estado de baja oxidación. Los compuestos organometálicos más populares (metallocenos, compuestos “half-sandwich”, CO -, ligandos- π , carbenos) se empezaron usando como biosensores o en procesos catalíticos, pero han ido ganando protagonismo en la química médica debido a su potencialidad terapéutica.^{21,22}

A pesar de llevar tantos años en estudio, no encontramos ningún compuesto organometálico cuyo uso haya sido aprobado en clínica como agente antitumoral, lo que se debe a los métodos de cribado altamente sesgados empleados en las primeras etapas de la selección de fármacos: tanto con complejos de coordinación como con organometálicos, la selección se basaba en escoger compuestos con niveles altos de genotoxicidad y citotoxicidad *in vitro*, lo que conllevaba que en los ensayos clínicos fallara la estabilidad de los mismos y surgieran diversos problemas de toxicidad. Un cambio de enfoque volvió a reactivar el campo, demostrándose que complejos que no habían superado estos métodos de cribado presentaban una prometedora actividad clínica, pudiendo destacar los siguientes ejemplos de complejos de coordinación (que se empezaron a investigar antes que los organometálicos): KP1019b (indazolio- bis-indazol-tetracloro-rutenato) y NAMI-A (*trans*-imidazol-dimetilsulfóxido-tetracloro rutenato), encontrándose ambos actualmente en ensayos clínicos en fase II.³⁶

Los responsables de la introducción de los compuestos organometálicos en la búsqueda de nuevos agentes antitumorales fueron los trabajos de Köpf y Köpf-Marier publicados en 1987. Se inspiraron en la estructura del cisplatino, y consiguieron resultados

prometedores con compuestos de titanio y complejos metalloceno dicloruro.^{15,37}

En el diseño de estos compuestos organometálicos se presentó un nuevo desafío: sus centros metálicos estarán bastante expuestos al solvente, por lo que es imprescindible que se comporten de manera estable en soluciones acuosas, a la vez que presentan la buscada capacidad antitumoral. No fue hasta el año 2008 cuando el grupo de Peter Sadler demostró que complejos areno de rutenio (II), permanecían estables en medios acuosos y con una alta capacidad citotóxica (esto se constató experimentalmente en células humanas de cáncer de ovario, A2780, y de cáncer de pulmón, A549). Con esta demostración, las investigaciones posteriores en este campo se centraron en este tipo de compuestos más que nunca, pero el trabajo previo que se había desarrollado fue clave para llegar a este punto.²¹ El compuesto organometálico que sentó las bases de estas investigaciones fue el RAPTA-T, que presentó tanto *in vitro* como en *in vivo* efectos muy similares a los observados con el citado NAMI-A, demostrando ser selectivo en tumores metastásicos. En ambos compuestos el centro metálico está ocupado por rutenio, que produce una toxicidad menor que la de los compuestos basados en platino, pudiendo reducirse con ellos los efectos secundarios asociados a la quimioterapia.²⁵ Desde el punto de vista del diseño racional de fármacos, el andamiaje proporcionado por este tipo de compuestos areno de rutenio constituye una plantilla ideal:³⁸ introduciendo pequeñas modificaciones en el compuesto RAPTA se pudieron estudiar los cambios en su acción biológica, ayudando también a definir su mecanismo de acción antitumoral. De esta manera, el desarrollo de numerosos compuestos a partir de este andamiaje base incrementaron el conocimiento acerca de cómo cada parte del complejo contribuye a la función del mismo.^{39,40}

El andamiaje RAPTA (Fig. 3a) se ha descrito como una estructura “half-sandwich” o “taburete de piano”, siendo por lo tanto la que encontramos en los complejos areno de Ru (II) con potencial antitumoral, representándose como $[(\eta^6\text{-areno})\text{Ru}(\text{X})(\text{Y})(\text{Z})]$, donde X e Y son ligandos neutros quelantes y Z es mono aniónico (Fig. 3b); el ligando areno es el que confiere estabilidad al centro metálico, y representa el “asiento del taburete”, mientras que los ligandos quelantes X e Y, que estabilizan al complejo, y el ligando saliente Z, que proporciona un sitio de coordinación para las biomoléculas resultando clave en la activación del complejo, representan las “patas del taburete”.^{41,42} Mediante variaciones en los ligandos se puede ajustar la cinética de intercambio metal-ligando en muchos órdenes de magnitud, y esta característica es la clave del interés suscitado por este tipo de estructura. La naturaleza de los tres bloques que la conforman (grupo saliente, areno y quelante), será la responsable de su tasa de hidrólisis, que determinará que sean activos o no. De esta manera, la ventana del tiempo de activación que nos ofrecen es muy amplia, ya que las modificaciones a las que los podemos someter son muy numerosas, multiplicándose porque estará determinada por el conjunto y no simplemente por la elección individual de los mismos.

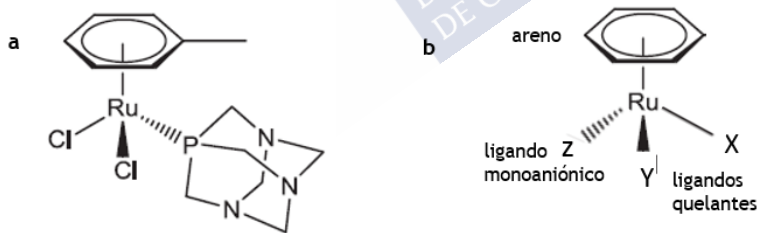


Figura 3. Representación de la estructura “half-sandwich” o “taburete de piano”. a) RAPTA-T; b) Estructura general de los complejos areno de Ru(II), donde los ligando X,Y y Z representan las patas del taburete y el ligando areno el asiento.

El control ejercido sobre la estabilidad cinética y termodinámica, como demostraron P. Sadler *et al*, resulta clave en el desarrollo de fármacos dado que determina directamente su capacidad terapéutica. Está bien descrito que el anillo terminal en este tipo de compuestos es crucial en

su actividad, encontrándose variaciones dependiendo del tamaño, flexibilidad y grado de hidrofobicidad del mismo, habiéndose demostrado que la citotoxicidad se incrementa con el tamaño, según el siguiente orden: benzeno < p-cimeno < bifenilo < dihidroantraceno < tetrahydroantraceno. Le confieren carácter lipofílico al compuesto, lo que mejora su absorción en las células y resulta clave tanto en las interacciones biomoleculares como en los procesos de reconocimiento. Por otro lado, la naturaleza del ligando quelante es la que determinará la estabilidad y cinética de intercambio de ligandos, que resultan indispensables para que estos compuestos presenten actividad citotóxica. A pesar de las numerosas aproximaciones que se han llevado a cabo, no encontramos una correlación tan clara, como en el caso de los anillos de areno, entre estos ligandos y la actividad, ya que se entenderá en el contexto del complejo y no en la del ligando aislado (los complejos resultaron ser más activos que los ligandos, por lo que esta cinética de intercambio será la clave, más que el ligando en sí). Y, por último, el grupo saliente es el que determina la activación del compuesto, habiéndose estudiado esta dinámica encontrándose en el grupo saliente Cl, Br, I, N₃... y cuya elección dependerá de nuevo del conjunto del complejo, siendo el Cl es con el que se han emergido resultados más prometedores.⁴³⁻⁴⁶

En el diseño racional de estos fármacos, al conocimiento de los parámetros clave necesarios para maximizar sus propiedades, debemos sumar el conocimiento del mecanismo a través del cual ejercen sus efectos biológicos. De esta manera, partimos del efecto que queremos alcanzar definiendo después las propiedades que debería presentar el fármaco que desarrollase dicho mecanismo de acción. Como se ha comentado, tradicionalmente, el descubrimiento al azar de compuestos metálicos con actividad terapéutica es el que ha iniciado este campo, siendo muy numerosas las investigaciones llevadas a cabo en torno a los mismos con el objetivo de entender el porqué de su éxito. Desde que se descubrió la actividad biológica del cisplatino, se han dedicado muchos esfuerzos para dilucidar su mecanismo de acción, pero previamente a esto cabe destacar que la primera razón del éxito de este compuesto es que, una vez introducido por vía intravenosa, permanece en forma neutra hasta que se encuentra en el interior de las células. Esto

es debido a los iones cloruro que presenta (Fig. 2): en el torrente sanguíneo la concentración de iones cloruro es alta (en torno a 100 mM), pero dentro de la célula sufre un descenso (a 2-30 mM), lo que provoca el desprendimiento de estos iones del cisplatino que son sustituidos por moléculas de agua, volviéndose la molécula mucho más reactiva hacia los centros nucleófilos de las biomoléculas. De esta manera, habiéndose activado, ejerce su mecanismo de acción dentro de la célula, estando actualmente aceptado que el principal mecanismo responsable de la acción terapéutica del cisplatino es la formación de aductos con el ADN: una vez hidrolizado, presenta carga positiva, que es atraída por la carga negativa externa del ADN, en concreto, gracias a su mayor nucleofilicidad, por los átomos de guanina y adenina en la posición N7 en el surco principal de la molécula, siendo estos los sitios más reactivos para la unión de metales.¹¹ Estos aductos provocan el desenrollamiento y flexión del ADN, evitándose la transcripción y replicación de esta biomolécula, desencadenándose el proceso apoptótico (muerte celular programada). Las rutas activadas en la célula que desencadena este proceso, continúan investigándose, ayudando en la elección de nuevas dianas para los fármacos en desarrollo. Pero este no es el único mecanismo de acción, ya que se ha estimado que solamente el 1% del cisplatino es capaz de alcanzar el núcleo. Se puede unir a proteínas de la membrana celular (fosfolípidos y fosfatidilserinas), o bien reaccionar con moléculas del citoplasma que presenten sitios nucleofílicos, como RNA, microfilamentos del citoesqueleto, o proteínas y péptidos que contengan grupos tioles; la principal diana (después del ADN) es el tripéptido glutatión (GSH). La toxicidad ligada a estas uniones puede contribuir al efecto citotóxico del compuesto, ya que supone el bloqueo de proteínas con importantes funciones en la célula,⁴⁷ también provoca que la cantidad de fármaco que alcanza su diana principal sea muy pequeña (por ejemplo, la unión a GSH favorece su transporte al exterior de la célula). Además, estas uniones, como demostraron Lesterhuis y colaboradores, afectan a vías de transducción de señales que desencadenan una respuesta inmune. Surgen así los principales problemas que nos encontramos con este tratamiento: efectos secundarios y aparición de resistencias, y que han motivado la búsqueda de nuevos tratamientos.^{30,48-52}

De esta manera, los mecanismos de acción descritos para el cisplatino y otros fármacos aprobados en clínica, han posibilitado que a lo largo de estos años las estrategias en el desarrollo de nuevos metalofármacos se enfocasen en un mecanismo de acción concreto. Alessio y colaboradores fueron los que, en el año 2009, establecieron la primera clasificación de metalofármacos anticancerígenos en desarrollo, basándose en cuáles de sus componentes resultaban indispensables en su mecanismo de acción: 1. La acción biológica desencadenada se debe al metal, como p. ej. en los compuestos cuya función depende de la unión directa del metal a la molécula diana. 2. El metal desempeña un papel estructural, p. ej. cuando las interacciones con las dianas ocurren a través de uniones no covalentes. 3. El metal funciona como transportador de ligandos que serán la parte activa del compuesto. 4. El compuesto metálico se comporta como un catalizador, p. ej. a través de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) que causarán el daño celular. 5. El compuesto metálico es fotoactivo y se comporta como un fotosensibilizador.³² Pero a principios del año 2020, Gilles Gasser, Paul J. Dyson y Eszter Boros, detallan una nueva clasificación que abarca todos los fármacos con base metálica, incluyéndose los agentes de diagnóstico por imagen. Esta se basa en su mecanismo de acción principal, intentado establecer sus características clave: 1. Metalofármacos que se unen covalentemente a la biomolécula diana, como p. ej. el cisplatino, carboplatino, oxaliplatino y auranofina. 2. Metalofármacos que se unen a enzimas mediante enlaces no covalentes simulando ser sus sustratos o metabolitos, como p. ej. los complejos de oxovanadio. 3. Fármacos que se activan mediante reacciones redox, como los complejos de Ru(II) u Pt(IV). 4. Compuestos fotoactivables para terapia fotodinámica y quimioterapia fotoactivada, como p. ej. complejos con base de Pd(II) Os(II), Ru(II) o Ir(III). 5. Complejos metálicos que sirven de transportadores de ligandos biológicamente activos, como los complejos liberadores de CO (CORMs) o los compuestos con base de curcumina. 6. Fármacos catalíticos, como los complejos miméticos de la superóxido dismutasa (SOD) o proteasa. 7. Radiometales y agentes radioactivos usados en radioimagen y terapia, como p. ej. los complejos de Tc(VII). 8. Agentes de contraste de imagen por resonancia magnética (IRM), como

complejos basados en Fe(II)Fe(III) o Eu(II)Eu(III). 9. Metalofármacos con modos de acción poco comunes, como p. ej. las sales de bismuto(II).² Gracias a esta revisión se pueden ver resumidos todos los esfuerzos que se han llevado a cabo en la búsqueda de nuevos complejos metálicos con potencialidad clínica, y los grandes avances desde que se comenzó a explorar este campo, pero queda clara también la necesidad de continuar investigando, ya que muchos mecanismos de acción todavía no están bien descritos, y dada la complejidad de los sistemas biológicos siguen surgiendo problemas a la hora de trasladarlos a la clínica.

En relación con esta necesidad de seguir aumentando el conocimiento en el tratamiento con complejos con base metálica, se establece el tema de estudio de esta tesis doctoral. Tomando como base al compuesto impulsor de este campo, el cisplatino, nos centramos en la búsqueda de posibles metalofármacos que pudieran incluirse entre los agentes con potencialidad anticancerígena. La elección de este tema se debe a que actualmente el cáncer es la segunda causa de muerte en el mundo, y cada año el número de personas que padecen esta enfermedad va en aumento.

2.2 CÁNCER

El cáncer es, de acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), un término genérico que designa un grupo amplio de enfermedades que pueden afectar a cualquier parte del cuerpo, caracterizándose por un proceso de crecimiento y diseminación incontrolado de células que se extienden más allá de los límites normales y pueden invadir partes adyacentes del cuerpo y propagarse a otros órganos. Este proceso se conoce como metástasis, y es la principal causa de muerte por cáncer. La razón por la que tantos esfuerzos en investigación se dirigen a mejorar su tratamiento, es que se trata de la segunda causa de muerte a nivel mundial, estimándose que durante el año 2018 fue el responsable de 9,6 millones de muertes; esto es, aproximadamente 1 de cada 6 muertes se debió al cáncer.

Las enfermedades no transmisibles (ENT) son en la actualidad las responsables de la mayoría de las muertes mundiales, y se estima que el cáncer se situará como la principal causa de muerte y la barrera más

importante para aumentar la esperanza de vida en todos los países del mundo en el siglo XXI. Los cánceres más comunes a nivel mundial son los de pulmón y de mama, representando cada uno, en el año 2018, el 12,3 % de nuevos casos diagnosticados de un total de alrededor de 18 millones, de los que en torno a 9,5 millones correspondieron a hombres y 8,5 millones a mujeres. Debemos hacer aquí también una diferenciación, ya que mientras que para las mujeres los cánceres más comunes son los de mama, colorrectal, pulmón, cervical y de tiroides, para los hombres lo son los de pulmón, próstata, colorrectal, estómago e hígado. Y globalmente, los responsables del mayor número de muertes son los cánceres de pulmón, colorrectal, de estómago, de hígado, y de mama. Estas cifras presentan variaciones si analizamos los datos por países, tanto en las principales causas de muerte como en la incidencia de cáncer. Por ejemplo, en España, en el año 2019, se diagnosticaron 277.234 nuevos casos, siendo los más frecuentes los de colon y recto, próstata, mama, pulmón y vejiga. A pesar de que el riesgo de desarrollar cáncer ha ido en aumento, estimándose que en el año 2040 se diagnosticarán mundialmente 29,5 millones de nuevos casos, el riesgo de mortalidad asociado al mismo ha ido disminuyendo de manera considerable en los últimos 20 años. Esto se debe tanto a su detección precoz como a lo mejora en los tratamientos existentes gracias a los avances en la comprensión de su biología.

Se trata de una enfermedad multifactorial resultado de la interacción entre los factores genéticos de una persona y agentes externos, que se pueden agrupar en tres categorías: carcinógenos físicos (p. ej. la radiación ionizante ultravioleta), carcinógenos químicos (p. ej. componentes del tabaco, amianto, arsénico), y carcinógenos biológicos (p. ej. infecciones producidas por ciertos parásitos, virus o bacterias). Dicha interacción provoca una alteración en el material genético que conlleva la pérdida de los mecanismos celulares responsables del control de su integridad, acrecentándose su complejidad si tenemos en cuenta que se trata de una enfermedad de múltiples capas que interactúan entre sí (celular, tisular y organicista), resultando por lo tanto el enfoque en el genoma demasiado limitado: en su desarrollo intervienen múltiples factores a nivel biológico tales como el perfil hormonal o la condición en la que se encuentra el sistema inmune.⁵³

El primer reto a la hora de intentar comprender esta enfermedad es definir las diferencias existentes entre las células tumorales y las células normales del organismo, y así poder dirigir los tratamientos hacia dianas específicas que no dañen las partes sanas del organismo. Fueron Hanahan y Weinberg, quienes, en sendas revisiones publicadas en los años 2000 y 2011, establecieron lo que actualmente se conocen como las señas de identidad del cáncer: la gran mayoría de los cánceres desarrollados parecen compartir una serie de alteraciones bioquímicas, moleculares y celulares que permiten el crecimiento del tumor, así como su diseminación en el organismo. Son ocho las alteraciones básicas en la fisiología de las células que podrían dar lugar conjuntamente a su crecimiento maligno: autosuficiencia en las señales de crecimiento, insensibilidad a las señales inhibitorias del crecimiento, evasión de la muerte celular programada (apoptosis), estimulación para formar vasos sanguíneos a través de los que se suministren nutrientes a los tumores (angiogénesis), potencial replicativo ilimitado, capacidad de invadir tejidos circundantes (metástasis), evasión del sistema inmune y capacidad de reprogramación o modificación del metabolismo para alimentar el crecimiento y división celular. La adquisición de estas características ocurre en diferentes etapas del proceso neoplásico a través de múltiples mecanismos, y es posible gracias a dos características habilitantes principales: el desarrollo de la inestabilidad genómica en las células cancerosas, que genera mutaciones aleatorias que impulsan la progresión tumoral, y el proceso inflamatorio promovido por células inmunes innatas, que terminan contribuyendo a este crecimiento descontrolado. De esta manera, además del necesario conocimiento de las bases genéticas que predisponen el desarrollo del cáncer, los microambientes generados tanto alrededor de los tejidos como de los tumores deben estudiarse en profundidad tanto para la prevención como el control de la aparición de neoplasias malignas.^{54,55}

Al conocimiento de las bases moleculares del cáncer, indispensables para el desarrollo de tratamientos adecuados, se une el conocimiento acerca de los citados factores externos que contribuyen a su aparición, y que puede ayudar a la reducción de la incidencia de esta enfermedad. Actualmente, se estima que entre el 30% y el 50% de los cánceres se pueden prevenir evitando ciertos factores de riesgo, por lo

que, sumándole a esto una mejora en el diagnóstico precoz de los mismos y el tratamiento que mejor se adecúe a cada caso, los números expuestos con anterioridad podrían reducirse e incluso cambiar la tendencia actual.

2.2.1 Tratamientos actuales

En la actualidad nos encontramos con diferentes tipos de tratamientos, que en muchas ocasiones aparecen combinados para aumentar su eficacia. Convencionalmente nos encontrábamos con tres posibilidades: cirugía, que además de servir para la extirpación de tumores localizados puede funcionar como diagnóstico y en ocasiones servir como prevención; radioterapia, que consiste en la destrucción de las células cancerígenas usando partículas u ondas de alta energía; y la quimioterapia, con la que se alcanza todo el organismo y consiste en la administración de un fármaco o de una serie de ellos, vía oral o vía parenteral, con la finalidad de evitar la enfermedad, evitar su propagación o bien paliar sus síntomas. Recientemente han ido surgiendo nuevos enfoques que aumentaron los tipos de tratamientos con los que nos podemos encontrar: terapia dirigida, que consiste en el uso de determinadas sustancias que identifican y atacan con precisión ciertos tipos de células cancerosas; inmunoterapia, con la que se puede cambiar o reforzar el funcionamiento del sistema inmunitario para encontrar y atacar a las células cancerosas; terapia hormonal, dirigida hacia aquellos tipos de cáncer altamente dependientes a los niveles de ciertas hormonas, pudiendo alterar o bloquear a las mismas; y trasplante de células madre o médula ósea, con el que se reemplazarán las células madre que han sido destruidas por el cáncer o por la quimioterapia y/o radiación usadas en el tratamiento.

El tratamiento principal, tanto actual como históricamente, es la quimioterapia, de la que hemos hablado desde el inicio de este trabajo, habiéndose iniciado con Paul Ehrlich en el año 1910, demostrándose su viabilidad en el tratamiento del cáncer en la década de 1940, cuando se emplearon gas mostaza y antagonistas de folato contra linfomas y leucemias.^{33,56} Como hemos resaltado, el compuesto que se ha usado mayoritariamente en el tratamiento del cáncer es el cisplatino, que continúa empleándose en un 50-70% de los casos, usualmente en

combinación con otros fármacos. En el tratamiento de cáncer de testículos es dónde se han obtenido los mejores resultados, empleándose también en el tratamiento de cáncer de ovario, cervical, de vejiga, orofaríngeo, broncogénico, linfoma, osteosarcoma, melanoma y neuroblastoma.^{33,36} Se ha demostrado su eficacia contra tumores sólidos, quedando excluidos por lo tanto tumores altamente incidentes, así como tumores secundarios. Además, su tratamiento está limitado por efectos secundarios que incluyen nefrotoxicidad, ototoxicidad, neurotoxicidad, náuseas o vómitos; algunos se pueden controlar mediante la administración combinada de diuréticos y antagonistas de los receptores de serotonina, pero continúan siendo, especialmente la neurotoxicidad, factores limitantes. Estas toxicidades se deben a su distribución no específica dentro del organismo, que ya hemos comentado cuando se hacía alusión a que muy poca cantidad del fármaco llegaba hasta su molécula diana principal, derivándose de esto otro factor limitante: la incapacidad de alcanzar cantidades lo suficientemente elevadas en el tumor para conseguir eliminarlo. Pero, sin duda, el mayor obstáculo que surge como respuesta al uso de este tratamiento, es la resistencia al mismo.^{36,57} En torno al 90% de la mortalidad de pacientes con cáncer se puede atribuir a los mecanismos de resistencia, entendiéndola como la capacidad de las células tumorales de evitar el efecto de la terapia limitando así su efectividad.

La resistencia al cisplatino, y a los agentes quimioterápicos en general, se puede dividir en dos categorías: intrínseca o adquirida. La resistencia intrínseca indica que los factores mediadores de la resistencia preexisten en las células tumorales antes de recibir el tratamiento, y la resistencia adquirida es aquella que se desarrolla durante el tratamiento de tumores que inicialmente eran sensibles, debido a diversos factores adaptativos, como un aumento en la expresión de la diana terapéutica o la activación de vías de señalización alternativas. Los tumores presentan diferentes capacidades claves para los mecanismos de resistencia: una elevada adaptabilidad, la activación de la supervivencia, la inactivación de las vías de señalización de la muerte y la evasión de los supresores del crecimiento. En el desarrollo de la resistencia también juega un papel importante la inestabilidad genética, la heterogeneidad, la alta tasa de mutación de las células

tumorales, los cambios citogenéticos, la diversidad dentro del tumor, y el microambiente tumoral.⁵⁸ Esta resistencia puede estar limitada al fármaco al que se expone al paciente, o bien tratarse de una resistencia a múltiples fármacos (MDR, por sus siglas en inglés). De esta manera, resistencias encontradas con el cisplatino se extienden a otros fármacos, siendo esta la principal preocupación a la hora de diseñar nuevos tratamientos. Los mecanismos relacionados con esta MDR son múltiples: aumento del flujo de fármacos, factores de crecimiento, factores genéticos (mutaciones genéticas, amplificaciones y alteraciones epigenéticas), aumento de la capacidad de reparación del ADN y aumento del metabolismo de los xenobióticos. Conduciendo todos a la reducción de la eficacia terapéutica de los fármacos administrados.^{59,60}

Con el objetivo de mejorar la supervivencia de los pacientes con cáncer, se están desarrollando nuevos quimioterápicos para sustituir al cisplatino y superar estas limitaciones, y de los que ya hemos hablado al principio de este trabajo. A pesar de que aproximadamente otros diez compuestos de platino se encuentran actualmente en ensayos clínicos, estos candidatos no han podido abordar suficientemente muchas de las desventajas asociadas con el cisplatino. Por lo tanto, existe la necesidad de nuevos enfoques que estén diseñados a propósito para eludir los inconvenientes expuestos.⁶¹

2.2.2 Últimas tendencias: búsqueda de nuevas dianas

La identificación de nuevos fármacos que puedan revertir la MDR en las células cancerosas aumentará la eficacia de los agentes quimioterápicos, especialmente en las últimas etapas del desarrollo del cáncer, brindando además la oportunidad de tratar tumores actualmente incurables. De esta manera, el diseño de compuestos que presenten mecanismos de acción diferentes al cisplatino y demás compuestos de platino expuestos anteriormente, será clave en el desarrollo de este campo, siendo la búsqueda de dianas intracelulares más accesibles que el ADN el objetivo principal en la búsqueda de nuevos tratamientos quimioterápicos.^{32,59}

Para abordar este objetivo es fundamental conocer las diferencias existentes entre las células cancerígenas y las normales, por lo que

metabolismo del cáncer se ha ido estudiando en profundidad, ahondando en las diferentes señas de identidad resumidas por Hanahan y Weinberg.^{55,62} Para satisfacer las altas demandas biosintéticas y bioenergéticas de la proliferación rápida y sostenida que ocurre durante el proceso tumoral, las células cancerosas elevan su absorción de glucosa, y fue en el año 1956 cuando Otto Warburg observó que en lugar de producirse una oxidación completa de la glucosa para alimentar la respiración mitocondrial, con la que se obtendría un rendimiento energético mayor (36 moléculas de ATP por molécula de glucosa), tenía lugar de manera predominante una glucólisis aeróbica, esto es, la fermentación de la glucosa a lactato, que presenta un rendimiento energético marcadamente inferior (4 moléculas de ATP por molécula de glucosa) (Fig. 4). Esto se conoce como “el efecto Warburg”, y este investigador postuló que el mal funcionamiento de las mitocondrias podría explicarlo, situando por lo tanto a estos orgánulos en el origen del cáncer.⁶³ Este efecto es una característica indiscutible de muchas células cancerosas, pero hoy se sabe que no se debe necesariamente a una respiración mitocondrial dañada, ya que muchas células que muestran el metabolismo Warburg poseen la respiración mitocondrial intacta, encontrándonos incluso con determinados tipos de cáncer que dependen de la respiración mitocondrial. Sin embargo, de lo que no hay duda es de que las células cancerosas en proliferación presentan unos requerimientos metabólicos muy diferentes a la mayoría de las células diferenciadas normales, mostrándose estas dependencias metabólicas como una buena diana donde atacar a las estas células.^{55,62,64}

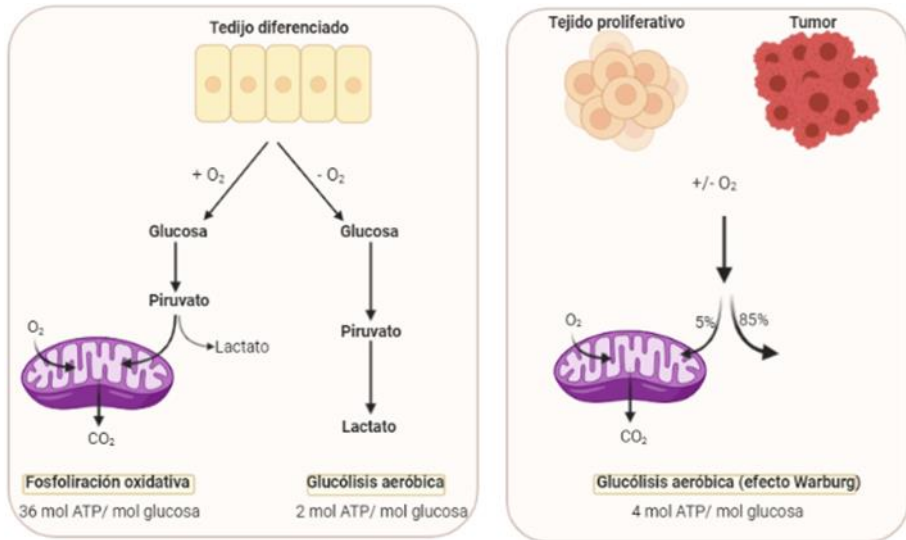


Figura 4. Efecto Warburg. En las células cancerosas la principal vía de obtención de energía es la glucólisis aeróbica, independientemente de la cantidad de O_2 disponible, obteniendo un rendimiento energético menor que a través de la fosforilación oxidativa. Imagen creada con BioRender.com.

La respiración mitocondrial en el cáncer se ha estudiado durante décadas, gracias a lo cual se han identificado roles pleiotrópicos de las mismas en el proceso tumoral. Además, su importancia en el funcionamiento de todas las células está bien establecida, habiéndose descubierto que afectan a procesos que tradicionalmente no se relacionaban con este orgánulo, tales como la inflamación, la señalización metabólica y la muerte, transformación y determinación del destino celular. De esta manera se reafirman como una interesante diana sobre la que trabajar: el papel central de las mitocondrias tanto en el metabolismo como en la muerte celular las convierte en una buena diana terapéutica; dirigir la acción de los fármacos a las mitocondrias, posibilita la elección de diferentes dianas, no excluyentes entre sí, tales como: a) la producción mitocondrial de ATP, b) vías anabólicas indispensables en la proliferación celular, c) permeabilización de la membrana mitocondrial externa, lo que conduce a la liberación citosólica de proteínas proapoptóticas, d) incremento de la producción de las especies reactivas de oxígeno (ROS) interrumpiendo la

transferencia de electrones a través de la cadena de transporte de electrones (ETC), promoviendo así una respuesta a estrés oxidativo que produciría la muerte de las células tumorales. El desafío es hacer esto de forma selectiva.^{62,65,66}

Se ha demostrado que en el desarrollo tumoral juega un papel imprescindible el aumento en la producción de ROS: las células cancerosas incrementan su ratio en comparación con el de las células normales con la finalidad de hiperactivar las vías de señalización necesarias para la transformación celular y el desarrollo del tumor. De esta manera, los enfoques terapéuticos dirigidos a atacar ROS han ido atrayendo atención los últimos años.^{66,67}

Niveles elevados de ROS causan daño en el ADN, las proteínas y los lípidos, lo que promueve la inestabilidad genética y el proceso tumoral; actúan además como moléculas de señalización contribuyendo al crecimiento anormal de las células, la metástasis, la resistencia a la apoptosis, la angiogénesis, e incluso en algunos casos, al bloqueo de diferenciación celular. Estos niveles aumentados activan vías de señalización específicas de la supervivencia celular: pérdida de la función del gen supresor de tumores, aumento del metabolismo de la glucosa, adaptaciones a condiciones hipóxicas y generación de mutaciones oncogénicas. Sin embargo, juegan un papel dual, ya que se pueden alcanzar niveles tóxicos de producción de ROS que provoquen un efecto antitumoral, dando como resultados un aumento en el estrés oxidativo que inducirá la muerte (Fig. 5).^{68,69} De esta manera, las células cancerosas deben prevenir esta acumulación excesiva y mantener el equilibrio redox, para lo que han aumentado su capacidad antioxidante.



Figura 5. Dualidad de las especies reactivas de oxígeno (ROS). Su nivel elevado en las células cancerosas les aporta una serie de características básicas para su proliferación descontrolada, pero cuando se supera cierto umbral, pasan a tener un efecto antitumoral.

Las células cancerosas presentan un equilibrio redox alterado respecto al de las células normales: alta producción de ROS contrarrestada con una alta tasa de eliminación de las mismas. Y esta característica única puede hacerlas más sensibles que las células normales a las alteraciones en los niveles de ROS o manipulaciones redox: las estrategias tanto para eliminar como para producir ROS se presentan como terapias contra el cáncer potencialmente eficaces.⁶⁷

Las especies reactivas de oxígeno se dividen en dos tipos, radicales libres, que contienen uno o más electrones desapareados, y ROS sin radicales libres, que son químicamente reactivas y se pueden convertir en radicales libres. Algunos ejemplos ampliamente estudiados con el anión superóxido (O_2^-), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo ($\bullet OH$), y provienen principalmente de dos fuentes: la mitocondria y las NADPH oxidasas unidas a la membrana (NOXs). Pueden producirse también como un subproducto de ciertas reacciones

bioquímicas, como la β -oxidación en los peroxisomas, la síntesis de prostaglandinas y las reacciones de desintoxicación por el citocromo P450.^{67,70}

En el mantenimiento de los niveles redox en las células cancerosas, son importantes los dos mecanismos principales de producción de ROS. Las NOXs transfieren electrones a través de las membranas biológicas para producir O_2^- , que se convierte rápidamente en H_2O_2 , pudiendo afectar a múltiples eventos de señalización; actualmente se conoce que niveles elevados de ROS derivados de NOXs están involucrados en la transformación y progresión de muchos cánceres (vejiga, mama, colon y recto, riñón, pulmón, melanoma, leucemia, esófago, ovario, páncreas, próstata, estómago y tiroides), pero el papel de las mitocondrias en la homeostasis de ROS en las células cancerosas parece tener más peso.⁶⁹ Durante el proceso de respiración mitocondrial, los electrones pasan a través de la cadena transportadora de electrones (ETC) hasta el aceptor final, como el oxígeno molecular (O_2). Durante este proceso puede ocurrir que los electrones se escapen de esta cadena de transporte y reaccionen con el O_2 para producir O_2^- : se ha demostrado que el generado a partir de los complejos I, II y III juega un papel fundamental en la señalización redox (Fig. 6). El O_2^- se libera en la matriz mitocondrial y es convertido rápidamente por la enzima superóxido dismutasa 2 (SOD2) en H_2O_2 . Además, el complejo III puede liberar O_2^- en el espacio intermembrana, pudiendo éste atravesar los canales aniónicos dependientes de voltaje hacia el citosol, donde se convierte en H_2O_2 por la acción de la SOD1. Esta última también puede desintoxicar el O_2^- en el espacio intermembrana para producir H_2O_2 libremente difusible.⁶⁷

La producción de ROS por parte de las mitocondrias puede provocar daños oxidativos en las proteínas, las membranas y el ADN mitocondriales, perjudicando la capacidad de estos orgánulos para sintetizar ATP y llevar a cabo su amplia gama de funciones metabólicas. Además, este daño oxidativo mitocondrial también puede aumentar la tendencia de las mitocondrias a liberar proteínas al espacio intermembrana mediante la permeabilización de la membrana externa mitocondrial (MOMP) y activar el mecanismo apoptótico de la célula, así como inducir el poro de transición de la permeabilidad mitocondrial

(PTP). De esta manera el daño oxidativo mitocondrial contribuye a una amplia gama de patologías.^{65,69}

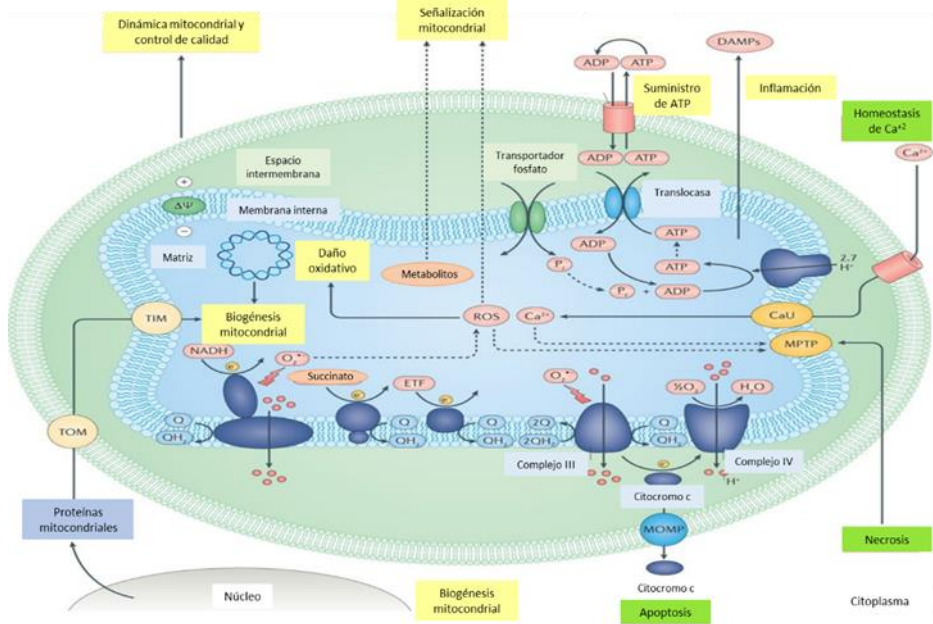


Figura 6. Panorama general de las funciones desempeñadas por la mitocondria. Estas funciones pueden verse alteradas a través de la afectación de diferentes vías: suministro de ATP, biogénesis mitocondrial, fisión y fusión mitocondrial y control de calidad, inducción del poro transitorio de permeabilidad mitocondrial (MPTP), producción de ROS, liberación de factores proapoptóticos al citosol y homeostasis del calcio. (Adaptado de M. Murphy, R. Hartley, *Nature Reviews Drug Discovery*, 2018; con permiso de Elsevier, número de licencia 501620974)

Además de contribuir a numerosas patologías, los niveles de ROS son clave en el mecanismo de acción provocado por los antibióticos que se están empleando en la actualidad, abriéndose de esta manera la posibilidad de que compuestos desarrollados con esta diana, pudieran ampliar su potencial terapéutico: compuestos con potencial anticancerígeno podrían presentar una buena actividad bactericida.

2.2.3 Cáncer y bacterias

Las variaciones en los niveles de ROS, además de estar relacionados con numerosas patologías y pudiendo ser una diana

adecuada para el tratamiento del cáncer, también desempeñan un papel clave en el mecanismo de muerte desencadenado por los antibióticos empleados en la actualidad. Según la hipótesis presentada por Michael Kohanski y James Collins en el año 2007, los metalofármacos con efecto bactericida, tanto en bacterias GRAM positivas como negativas, estimulan la producción de radicales hidroxilos, que matan a las bacterias por daño oxidativo a través de diversos mecanismos. Esto refuerza el interés en el desarrollo de posibles fármacos que afecten a las variaciones redox, ya que los problemas derivados de las resistencias bacterianas a los antibióticos actuales suponen una preocupación creciente a nivel mundial.⁷¹

Los mecanismos de resistencia antimicrobiana (AMR, por sus siglas en inglés) no paran de crecer, por lo que se han convertido en una amenaza para la vida en todo el mundo. Día tras día aparecen y se propagan nuevos mecanismos de defensa que ponen en peligro la capacidad para tratar enfermedades infecciosas comunes, como la neumonía, la tuberculosis, la septicemia, la gonorrea o las enfermedades de transmisión alimentaria. Datos recopilados por la OMS ponen de manifiesto que AMR hacen que patógenos como *Acinetobacter sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella enterica*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, se hayan vuelto resistentes a compuestos antimicrobianos claves en la actualidad. Históricamente, el desarrollo e implementación de cada nuevo antibiótico ha ido seguido de la aparición de resistencias.⁷²

La revolución de los antibióticos provocada por la arsfenamina, comercializada como *salvarsan* y descubierta por Paul Ehrlich en 1910, de la que se ya habló como pieza clave en el desarrollo de metalofármacos, fue seguida por el descubrimiento de *Prontosil* por Domagk (en 1932) y, aunque el uso de las sulfonamidas ha ido desapareciendo, todavía permanece vigente.⁶ La aparición de la penicilina, descubierta por Alexander Fleming en 1928 y purificada por Norman Heatley, Howard Florey y Ernst Chain 10 años después, supuso una nueva etapa en el desarrollo de compuestos antibióticos, introduciéndose en la clínica en el año 1941. Selman Waksman, a finales de la década de 1930, desarrolló un estudio acerca de microbios

como productores de compuestos antibióticos, iniciándose así la Edad de Oro del descubrimiento de los mismos.⁷³ Actualmente los antibióticos de uso más extendido son los β -lactámicos, grupo al que pertenecen la penicilina y sus derivados, y en el que encontramos también las cefalosporinas; los otros antibióticos de uso común son las quinolonas, los macrólidos, las tetraciclinas, las sulfonamidas y los aminoglucósidos.⁷⁴

Datos publicados por la OMS ponen de manifiesto que la evolución de los AMR hace cada vez más necesarios la implementación en clínica de nuevos antibióticos, pero en la actualidad encontramos pocos en vías de desarrollo: los 60 productos (50 antibióticos y 10 biológicos) que se encuentran bajo estudio aportan pocos beneficios con respecto a los tratamientos existentes y muy pocos están concebidos para luchar contra las bacterias resistentes que representan una mayor amenaza. Para ello, es muy importante que se amplíen los conocimientos acerca de cómo los antibióticos matan a las bacterias: la hipótesis postulada por Michael Kohanski y James Collins abrió este campo, pero es necesario conocer los diferentes mecanismos que conducen a la muerte, ya que no hay una única vía para desencadenarla. Además de la producción de ROS nos encontramos con otros cambios en el metabolismo celular y la respuesta celular general, tales como la inducción de SOS y los efectos reguladores de RpoS. Por otro lado, se ha constatado que el entorno en el que se encuentren las bacterias también resulta clave para el mecanismo desencadenado por los antibióticos, lo que también se tendrá que tener en cuenta a la hora de su implementación y distribución.⁷⁵

El creciente problema de salud a nivel mundial originado por el cáncer, así como la necesidad de encontrar nuevos compuestos antibióticos, han definido el trabajo de esta tesis doctoral, uniéndose ambos por la implicación de los niveles de ROS en el mecanismo de acción. De esta manera, el mismo metalofármaco puede poseer propiedades tanto anticancerígenas como antibióticas.

2.3 COMPUESTOS EMPLEADOS

Siguiendo la tendencia en el desarrollo de nuevos compuestos metalofármacos con potencial terapéutico de la que se ha hablado con anterioridad, se seleccionaron unos compuestos organometálicos con estructura “half-sandwich” o “taburete de piano” (Fig. 4). Los mismos se han sintetizado atendiendo a las diferentes características expuestas,^{41,76} escogiendo en este caso tres centros metálicos diferentes que se han ido abriendo paso como posibles agentes quimioterápicos: el iridio (Ir), el rodio (Rh), y el rutenio (Ru).^{33,36}

Este trabajo se ha llevado a cabo en colaboración con el Departamento de Química de la Universidad de Burgos, donde encontramos al grupo de trabajo responsable de sintetizarlos. Estos se han seleccionado a partir de un cribado inicial de un grupo numeroso de compuestos que presentaban estos centros metálicos con diferentes variaciones en los ligandos, siendo el objetivo que, además de mostrar una buena capacidad citotóxica, fueran estables y presentaran una buena solubilidad (experimentos realizados por nuestro grupo de investigación publicados en la tesis doctoral de la Dra Mabel Aacuña).

En la Fig. 7 se muestra la estructura de los compuestos de estudio: $\text{RuCl}(\text{cym})(\text{phbzIm})$, $\text{RhCl}(\text{Cp}^*)(\text{phbzIm})$ e $\text{IrCl}(\text{Cp}^*)(\text{phbzIm})$. Presentando la estructura “half-sandwich” o “taburete de piano”, su principal diferencia es el metal que ocupa la posición central del compuesto: Ru (II), Rh (III) e Ir (III). Como “asiento del taburete” presentan un ligando areno, que según se ha descrito puede resultar clave en la absorción celular e interacción con posibles dianas, diferenciando entre un areno ciclopentadieno (Cp^*) y un cimeno (cym). Como “patas del taburete” presentan al Cl como grupo saliente, que es decisivo en la activación del complejo, y al ligando phbzIm como quelante, que proporciona estabilidad y es clave en la cinética del intercambio de ligandos.

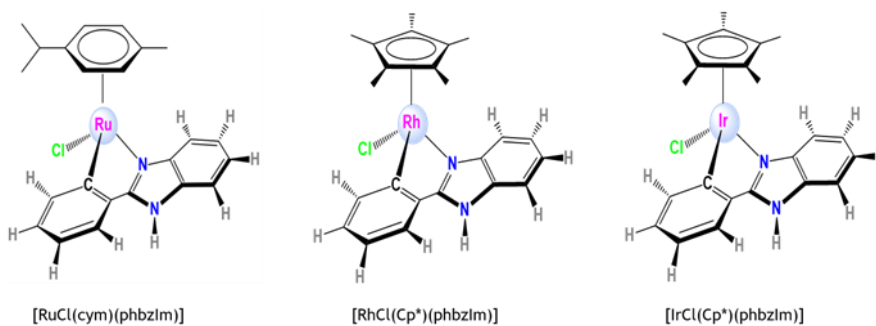


Figura 7. Estructura química de los compuestos seleccionados para este trabajo. Los tres compuestos empleados presentan una estructura “half-sandwich” o “taburete de piano” con el ligando phbzIm y el Cl como grupo saliente, diferenciándose en los ligandos areno: ciclopentadieno (Cp*) y cimeno (cym); y en sus centros metálicos: rutenio, rodio e iridio.

2.3.1 Ag-AQCs

En la última parte de este trabajo se ha llevado a cabo un acercamiento al método desarrollado en los doctorados industriales. En colaboración con la empresa NANOGAP SUB-NM-POWER S.A se estudió la aplicación que pudieran tener a nivel industrial unas preparaciones de Ag-AQCs.

Los clústeres cuánticos atómicos (AQCs, de sus siglas en inglés “Atomic quantum clusters”), se definen como un grupo de átomos (2-200 átomos) de plata u otros metales con una composición bien definida. Estudios previos han demostrado su potencialidad como agentes biocidas,^{77,78} por lo que se llevaron a cabo una serie de aproximaciones basadas en esta premisa. Múltiples procesos llevados a cabo a nivel industrial, se pueden ver afectados por el indeseado crecimiento bacteriano en las superficies en las que se llevan a cabo. De esta manera se testó la capacidad bactericida que pudieran presentar unas series de revestimientos de Ag-AQCs depositados sobre diferentes superficies.





3 OBJETIVOS



1. Estudio del efecto de los compuestos $\text{RuCl}(\text{cym})(\text{phbzIm})$, $\text{RhCl}(\text{Cp}^*)(\text{phbzIm})$ e $\text{IrCl}(\text{Cp}^*)(\text{phbzIm})$ sobre líneas celulares humanas establecidas.
2. Caracterización de los mecanismos de acción desencadenados por estos compuestos organometálicos en células eucariotas y procariotas.
3. Estudio de sus potenciales usos farmacológicos.





4 MATERIAL Y MÉTODOS





4.1 CÉLULAS

Reactivos

- Líneas celulares
- *Dulbecco's Modified Eagle Medium low glucose* (DMEN) (Sigma, Cat. N. ° D6046)
- *Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Nutrient Mixture F-12 Ham* (DME/F-12, mezcla 1:1) (Sigma, Cat. N. ° D8062)
- *Dulbecco's Modified Eagle Medium high-glucose* (DMEM-Hi) (Sigma, Cat. N. ° D5671)
- Insulina (Sigma, Cat. N. ° I9278-5ML)
- Toxina de cólera (Sigma, Cat. N. ° C8052)
- Hidrocortisona (Sigma, Cat. N. ° H-0888)
- EGF (Sigma, Cat. N. ° 9644)
- Suero de caballo (Thermo Fisher, Cat. N. ° 16050122)
- Suero Fetal Bovino (FBS) (Gibco, Cat. N. ° 10270-106)
- Penicilina/Estreptomina (P/S) (Gibco, Cat. N. ° 15140-122)
- L- Glutamina (Gibco, Cat. N. ° 25030-024)
- Solución salina tamponada con fosfato (PBS)
- Tripsina (0,05% Tripsina-EDTA 1X) (Gibco, Cat. N. ° 25300-062)
- Medio *Luria Bertani* (LB)
- Medio SOC
- Agar
- [IrCl(Cp*)(phbzIm)] (sintetizado por el Departamento de Química de la Universidad de Burgos, España)
- [RhCl(Cp*)(phbzIm)] (sintetizado por el Departamento de Química de la Universidad de Burgos, España)
- [RuCl(cym)(phbzIm)] (sintetizado por el Departamento de Química de la Universidad de Burgos, España)
- DMSO (Sigma, Cat. N. ° D8418)
- Plásmido CHOP::GFP (Addgene plasmid #21898; <http://n2t.net/addgene:21898>; RRID:Addgene_21898)
- Plásmido p5xATF6-GL3 (Addgene plasmid #11976; <http://n2t.net/addgene:11976>; RRID: Addgene_11976)
- Bacterias *E. coli* DH5 α (Invitrogen, Cat. N. ° 18265-017)

- Enzimas de restricción Ase I y NEBuffer (New England, Cat. N. ° R0526S)
- Enzima de restricción Cla I y buffer C (Promega, Cat. N. ° R6551)
- Enzima de restricción Not I y buffer C (Promega, Cat. N. ° R6431)
- Kit *NucleoSpin Plasmid* (Macherey-Nagel, Cat. N. ° 740588.250)
- Kit *NucleoBond® Xtra Midi* (Macherey-Nagel, Cat. N. ° 740410.50)
- Reactivo de transfección DreamFect™ Gold (OZ Bioscience, Cat. N. ° LM80250)
- Tunicamicina (TU) (Sigma, Cat. N. ° T7765-1MG)
- Ampicilina (Sigma, Cat. N. ° A9518)
- D- Luciferina (Sigma, Cat. N. ° L9504)
- Glicilglicina (Gly-Gly) (Sigma, Cat. N. ° G3915)
- Fosfato potásico (Merck, Cat. N. ° 1.05104.1000)
- Sulfato de magnesio hepta-hidratado (MgSO4) (Sigma, Cat. N. ° 230391)
- *Ethylene glycol-bis (2-aminoethylether)-N, N, N, N-tetraacetic acid* (EGTA) (Sigma, Cat. N. ° E3889)
- Adenosine 5'-triphosphate sodium salt (ATP) (Sigma, Cat. N. ° A3377)
- Bradford (Sigma, Cat. N. ° B6916)
- BSA (Promega, Cat. N. ° R396E)
- *3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide* (MTT) (Sigma, M2128-1G)
- Solución de solubilización (SDS/0,1NHCl)
- Sonda DHE, indicador de superóxido dihidroetidio (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Cat. N. ° D11347)
- Peróxido de hidrógeno (H₂O₂) (Sigma, Cat. N. ° 512813)
- Kit *NucleoSpin Tissue* (Macherey-Nagel, Cat. N. ° 740952.50)
- Kit *EpiQuik 8-OHdG DNA Damage Quantification Direct* (Epigentek, Cat. N. ° P-6003-96)
- Kit *Seahorse XFp Cell Mito Stress Test* (Agilent, Cat. N. ° 103010-100)
- Kit *Seahorse XFp Glycolysis Stress Test* (Agilent, Cat. N. ° 103017-100)
- XF *base medium* (Agilent, Cat. N. ° 103193-100)
- D-Glucosa (Gibco, Cat. N. ° A24940-01)

- Sal sódica del ácido pirúvico (piruvato) (Sigma, Cat. N.º P5280)
- Solución de hidróxido sódico 0,1 M (NaOH 0,1N) (Panreac, Cat. N.º 1416861211)
- Kit *Click-It™ Plus O-propargyl-puromycin (OPP) Protein Synthesis Assay* (Invitrogen™, Cat. N.º C10456)
- Cicloheximida (CHX) (Sigma, Cat. N.º 7698-1G)
- Paraformaldehído (Sigma, Cat. N.º 158127)
- Etanol (Panreac, Cat. N.º 121086.1212)
- Triton (Sigma, Cat. N.º X100)
- Ioduro de propidio (PI) (Sigma, Cat. N.º P5264)
- Hoechst (Sigma, Cat. N.º 33258)
- Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) (Thermo Scientific, Cat. N.º BP-129-1)
- Ribonucleasa- a (RNA-sa) (Sigma, Cat. N.º R6513)
- 1,4-Dithiothreitol (DTT) (Fluka, Cat. N.º 43817)
- N-Acetil-L-cisteína (NAC) (Sigma, Cat. N.º A9165)
- β-mercaptoetanol (Sigma, Cat. N.º M3148)
- Ácido aspártico (Sigma, Cat. N.º PHR1104)
- Erastin (Sigma, Cat. N.º E7781)
- Hidroxianisol butilado (BHA) (Sigma, Cat. N.º B1253)
- Necrostatina-1 (Nec-1) (Sigma, Cat. N.º N9037)
- Necrosulfonamida (NSA) (Sigma, Cat. N.º 480073)
- Deferoxamina (DFO) (Sigma, Cat. N.º 252750)
- Ferrostatina- 1 (Fer-1) (Sigma, Cat. N.º SML0583)
- Ácido nordihidroguaiarético (NDGA) (Sigma, Cat. N.º 479975)
- *1,4-Diamino-2,3-dicyano-1,4- bis(2-aminophenylthio) butadiene* (UO126) (Sigma, Cat. N.º 662005-1MG)
- Agarosa (Thermo Scientific, Cat. N.º BP160-500)
- Bromuro de etidio (Sigma, Cat. N.º E7637-5G)
- 2-log DNA Ladder (New England Biolabs)
- Tampón TE
- Tampón TAE (tris-acetato-EDTA)
- Agua Mili-Q
- Hielo

Materiales

- Líneas celulares
- Cepa de *Escherichia coli* DH5 α (ATCC 25922)
- Cámara de flujo laminar
- Incubador InCuSafe Panasonic (MCO-18AC-PE)
- Incubador IN30 Memmert (DE 66812464)
- Centrífuga (Thermo Scientific Sorvall ST 16R)
- Lector de placas CLARIOstar®
- Microcentrífuga (Centrífuga 5424 Eppendorf)
- Citómetro Guava EasyCyte (Millipore)
- Microcentrífuga (Centrífuga 5418R Eppendorf)
- Centrífuga Beckman Coulter Avanti® J-26S XPI
- Termobloque Accublock™ (Labnet)
- Agitador ROTAMAX 120 Heidolph™
- Baño de agua Fisher Isotemp, modelo 2341
- SimpliAmp™ Thermal Cycler PCR System (Thermo Fisher)
- Vortex ZX3 Advanced Vortex Mixer (Velp® Scientific)
- Combi-Spin FVL-2400N (BIOSAN)
- Espectrofotómetro Nanodrop™2000 (Thermo Scientific)
- Cubeta y fuente de Electrophoresis Power Supply EPS 301 (Amersham Biosciences)
- Sistema de imágenes de gel de alta definición Molecular Imager® Gel Doc™ XR System (BIO-RAD)
- Microscopio Digital Invertido Leica DMI 6000 B
- Analizador de flujo extracelular XFp Seahorse (Bioscience)
- Microscopio Olympus IX51 equipado con la cámara Olympus DP72
- Luminómetro Lumat LB 9507 (Berthold Technologies)
- Termómetro rectal (BAT-12 Microprobe-Thermometer, Physitemp, Clifton, NJ)
- Cámara termográfica (E60bx: Compact-Infrared-Thermal-Imaging-Camera; FLIR, West Malling, Kent, U.K.)
- Micropipetas (Gilson)
- Placas de 100 mm de diámetro (BD Falcon)
- Placas de 60 mm de diámetro (BD Falcon)
- Placas de 96 pocillos (BD Falcon)
- Placas negras 96 pocillos (Thermo Scientific)

- Placas blanca de fondo opaco de 96 pocillos (Corning)
- Placas de 24 pocillos (Thermo Scientific™ 930186)
- Placas Petri de 100 mm de diámetro (BD Falcon) tratadas con agar
- Miniplacas de cultivo Seahorse XFp (Agilent, Cat. N. ° 103025-100)
- Hemocitómetro de Neubauer
- Tubos de 25 ml (BD Falcon)
- Tubos de 15 ml (BD Falcon)
- Tubos de 1,5 ml (Eppendorf)
- Vaso de precipitados
- Matraz de vidrio
- Tubos de 500 ml de ultracentrífuga

Procedimientos

4.1.1 Líneas celulares

Se usaron tres líneas celulares diferentes: la línea celular de adenocarcinoma de pulmón humano A549, obtenida de DMSZ, n ° ACC 107 (*Leibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, Braunschweig, Germany*); la línea celular de riñón embrionario humano HEK293 (proporcionadas por el grupo CiCLON dirigido por el profesor Anxo Vidal); la línea celular epitelial no tumoral MCF10 A obtenida de ATCC (Cat. N. ° CRL-10317), y la línea celular de adenocarcinoma de mama humana MCF-7, obtenida de DMSZ, n ° ACC 115.

Las líneas celulares A549 y HEK293 se mantuvieron en el medio de cultivo *Dulbecco's Modified Eagle Medium low-glucose* (DMEN), y la línea celular MCF-7 se mantuvo en el medio de cultivo *Dulbecco's Modified Eagle Medium high-glucose* (DMEM-Hi). Estos medios se suplementaron con 10% de suero fetal bovino (FBS) y 1% de L-glutamina, penicilina y estreptomina. Son líneas que derivan de tumores sólidos y crecen de forma adherente como una monocapa. La línea celular MCF10A se mantuvo en el medio de cultivo *Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Nutrient Mixture F-12 Ham* (DMEN/F-12, mezcla 1:1). Este medio se suplementó con insulina (0,01 mg/ml), toxina de cólera (100 ng/ml), hidrocortisona (500 ng/ml), EGF (20ng/ml) y suero de caballo (5%).

Las células se incubaron en un incubador humidificado a 37 ° C con 5% de CO₂ y se crecieron en placas de cultivo de 100 mm, manteniéndolas en una confluencia del 70-80%. Para mantenerlas, se les retiró el medio, se lavaron con una solución salina tamponada con fosfato (PBS), y se empleó una mezcla de tripsina/EDTA para despegarlas de la placa. Finalmente, las células se volvieron a suspender en el medio de cultivo correspondiente y se pasaron a placas de cultivo nuevas, en una ratio de 1:5 o 1:10. Cuando fue necesario, las células se contaron usando una cámara de Neubauer. Todos los procedimientos se llevaron a cabo en una cámara de flujo laminar.

Se fue comprobando periódicamente que las líneas celulares empleadas estuvieran libres de micoplasma.

Las líneas celulares se almacenaron congeladas en medio completo suplementado con 10 % DMSO en nitrógeno líquido.

4.1.2 Estudio del ciclo celular

Los diferentes estados del ciclo celular se identificaron tiñendo al ADN con yoduro de propidio (IP), cuantificándose la señal de las células tratadas con los complejos de iridio, rodio y rutenio mediante citometría de flujo.

1) Se sembraron las células, A549 y MCF-7, en placas de 60 mm (500.000 células/placa) y se dejaron incubando durante 24 horas a 37 ° C. Se les retiró el medio y se añadieron los tratamientos seleccionados: [IrCl(Cp*)(phbzIm)] 16 µM, [RhCl(Cp*)(phbzIm)] 43 µM y [RuCl(cym)(phbzIm)] 50 µM. Se dejaron incubando a 37 ° C durante 24 horas, añadiendo en el caso del rutenio una condición en la que el tratamiento se dejó durante 48 horas.

2) Las células se recogieron, después de haberlas tripsinizado, en tubos de 15 ml, y se fijaron mediante la adición de 3 ml de etanol/muestra, manteniéndolas a 4 ° C durante toda la noche.

3) Las células fijadas se lavaron con 3 ml de PBS, llevando a cabo una centrifugación durante 5 minutos a 1.000 rpm. Se retiró el sobrenadante y el pellet se volvió a suspender en 0,5 ml de PBS.

4) Las células se tiñeron con una solución formada por IP (0,1 mg/ml), EDTA (0,1 mM), Tritón X-100 (0,1 %) y RNA-sa (2 mg/ml), y se dejaron incubando en hielo y en oscuridad durante 30 minutos.

5) Se centrifugan las muestras durante 5 minutos a 1.000 rpm, volviéndose a suspender los pellets en 100 l de PBS, y se analizan mediante citometría de flujo, en el citómetro Guava EasyCyte (Millipore).

4.1.3 Inhibición de la síntesis proteica

Se inhibió la síntesis de proteínas empleando *Click-iT Plus O-propargyl-puromycin (OPP) Protein Synthesis Assay* (Invitrogen™), de acuerdo con las instrucciones de fabricación. El OPP se incorpora a las células en crecimiento e inhibe la síntesis de proteínas al interrumpir la transferencia de péptidos en los ribosomas.

Se emplearon células A549, sembradas en placas negras de 96 pocillos a razón de 4.000 células/pocillo durante 24 horas y tratadas con los compuestos de iridio y rodio durante 6 horas: [IrCl(Cp*)(phbzIm)] 16µM, [RhCl(Cp*)(phbzIm)] 43 µM. Se empleó la cicloheximida 500 µM (CHX) como control positivo. A continuación, se añadió el reactivo *Click-iT OPP* (20 µM), se fijaron las células con formaldehído al 3,7% en PBS, se permeabilizaron con Triton X-100 al 0,5% y tiñeron con el cóctel de reacción *Click-iT Plus OPP*, conteniendo, como se indica, Alexa Fluor 488 picolil azida. Ésta se une a la OPP, pudiéndose así detectar las proteínas modificadas. La cuantificación del marcaje de OPP se midió utilizando el lector de placas CLARIOstar®.

4.1.4 Cuantificación de la oxidación de 8-OHdG

Se estudió el daño directo sobre el ADN provocado por el tratamiento con los complejos de iridio y rodio mediante el Kit *EpiQuik 8-OHdG DNA Damage Quantification Direct* (Epigentek), de acuerdo con las instrucciones de fabricación. Se trata de un ensayo colorimétrico mediante el que se detectan los niveles de 8-OHdG, un marcador del daño oxidativo del ADN y del estrés oxidativo.

1) Se emplearon células A549 sembradas en placas de 60 mm (500.000 células), que se dejaron incubando a 37 ° C durante 24 horas, tras lo que se retiró el medio y se les añadió el tratamiento correspondiente, poniendo cada una de las condiciones por duplicado: control, [IrCl(Cp*)(phbzIm)] (16 µM), [RhCl(Cp*)(phbzIm)] (43 µM)

y H₂O₂ como control positivo (200 μM). Se dejaron incubando a 37 °C durante 4 horas.

2) Se retiró el medio y se recogieron las células arrastrándolas con medio de cultivo, habiéndolas tripsinizado previamente. Se centrifugaron durante 5 minutos a 1.000 rpm, se retiró el sobrenadante, y los pellets se volvieron a suspender en 1 ml de PBS.

3) Se realizó la extracción del DNA de las muestras empleando el kit *NucleoSpin Tissue* (Macherey-Nagel), según las indicaciones del fabricante, recogiendo una cantidad de 300 ng/μl en 10μl de TE por muestra/condición, que se cuantificó en el espectrofotómetro Nanodrop™2000.

4) Se cuantificó el daño en el ADN mediante el kit *EpiQuik 8-OHdG* (Epigentek) siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADN obtenido de cada una de las condiciones se adicionó a la placa proporcionada con pocillos especialmente tratados para tener una afinidad alta por el ADN, y se fueron añadiendo las diferentes soluciones comerciales del kit. La cuantificación del 8-OHdG se realizó mediante su unión a anticuerpos específicos de captura y detección, que se trataron de manera específica para detectar un cambio de color que dependerá de la cantidad de 8-OHdG generada. Este se cuantifica colorimétricamente leyendo la absorbancia a 450 nm, que se llevó a cabo en el lector de placas CLARIOstar®. La cantidad de 8-OHdG es proporcional a la intensidad de DO medida.

4.1.5 Determinación de los niveles de ROS

El DHE se emplea para monitorizar los niveles de superóxido (O₂⁻) en el citosol. Se trata de una sonda que muestra fluorescencia azul en el citosol, pero una vez que se oxida, se intercala en el ADN mostrando fluorescencia roja. Dicha oxidación se monitoriza midiendo el incremento de fluorescencia mediante citometría de flujo usando el citómetro Guava EasyCyte.

Se estudiaron los niveles de ROS que se encuentran en las células una vez tratadas con los diferentes complejos de estudio, empleándose el H₂O₂ como control positivo.

1) Se sembraron células A549 en placas de 12 pocillos (40.000 células/pocillo) y se dejaron incubando durante 24 h a 37 °C.

2) Se añadió el tratamiento correspondiente de [IrCl(Cp*)(phbzIm)]: 16 μ M; [RhCl(Cp*)(phbzIm)]: 43 μ M; [RuCl(cym)(phbzIm)]: 50 μ M; y el control positivo de H₂O₂: 200 μ M. Se dejó el tratamiento durante 4 horas.

3) Se recogió el medio de todos los pocillos en tubos de 15 ml, tras lo que se añadieron las células recogidas tripsinizando cada uno de los pocillos con 250 μ l y arrastrando dos veces con 0,5 ml de medio de cultivo.

4) Se centrifugaron durante 5 minutos a 1.000 rpm, se retiró el sobrenadante, y los pellets se volvieron a suspender en 1 ml de PBS, cambiándolos a tubos de 1,5 ml.

5) Se centrifugaron de nuevo durante 5 minutos a 1.000 rpm (lavado), y se tiñeron con la sonda DHE, a una concentración de 0,5 μ M en PBS frío. (Recordar, que para situar la población una vez que se realice la citometría, es imprescindible dejar una muestra de células control sin teñir). Se dejaron incubando las muestras en hielo y en oscuridad durante 15 minutos.

6) Se centrifugaron durante 5 minutos a 1.000 rpm, se retiró el sobrenadante, y los pellets se volvieron a suspender en 100 μ l de PBS (lavado).

7) Se evaluó la fluorescencia presente en las células mediante citometría de flujo (Guava EasyCyte, Millipore).

4.1.6 Estudio de las vías ferroptótica y necroptótica

El análisis de las mismas se llevó a cabo mediante el estudio del efecto ejercido por una serie de inhibidores específicos sobre la viabilidad de células tratadas con el complejo de rutenio. Se realizó con un estudio de la citotoxicidad mediante el ensayo del MTT. Su tratamiento se combinó con el tratamiento posterior de las células con el complejo de rutenio. Se empleó como control positivo el erastin, que se trata de un agente antitumoral que produce la ferroptosis mediante la alteración de canales de transporte de la mitocondria, provocando la liberación de ROS y desencadenando procesos de estrés oxidativo.

Se testaron los inhibidores en dos líneas celulares diferentes: A549 y HEK293, que se sembraron en placas de 96 pocillos a razón de, respectivamente, 4.000 y 8.000 células/pocillo. Se trataron con los

inhibidores durante 1 hora, habiéndose establecido en un cribado previo las dosis adecuadas de los mismos: BHA 100 μM , Nec-1 20 μM , NSA 5 μM , DFO 5 μM , Fer-1 40 μM , NDGA 5 μM , UO126 10 μM . Tras este tiempo, se retiró el medio y se añadió el tratamiento con el complejo [RuCl(cym)(phbzIm) (50 μM). Se empleó el erastin (5 μM) como control positivo. Se dejaron incubando a 37 ° C durante 24 horas testándose cada una de las condiciones por triplicado.

Se añadieron en cada pocillo 10 μl de solución de MTT (5 mg/L), protegiendo las placas de la luz. Tras 4 horas se agregaron 100 μl de la solución de solubilización (SDS/0,1NHCL) y se dejaron incubando durante 18 horas a 37 ° C. Se midió la absorbancia a 595 nm en el lector de placas CLARIOstar®.

4.1.7 Determinación de la expresión de CHOP

Se empleó el plásmido CHOP::GFP (Addgene plasmid #21898; <http://n2t.net/addgene:21898>; RRID:Addgene_21898), que rastrea la actividad de CHOP endógeno de las células. Al activarse el promotor de este gen, se transcribe junto con él la secuencia que codifica para la proteína GFP, que emite fluorescencia, por lo que las células transfectadas se pueden detectar mediante microscopía de fluorescencia.

Para llevar a cabo esta aproximación experimental, nos encontramos con cuatro fases diferenciadas: transformación, amplificación, transfección y tratamiento.

1) Transformación: se emplearon las bacterias competentes (capaces de incorporar ADN externo a su genoma) *E. coli* DH5 α , mezclándose con el plásmido en una proporción de 1:10: 50 μl de bacterias y 2 μg de plásmido, incubándose en hielo durante 15 min. A continuación, se las sometió a un choque térmico de 42 ° C durante 45 minutos en un termobloque AccublockTM (Labnet). Se enfriaron en hielo, y se añadieron sobre 1 ml de un medio de cultivo SOC que se había calentado previamente, incubándose en agitación durante 1 h 30 minutos. Finalmente, se sembraron 100 μl de esta mezcla sobre placas Petri con medio LB suplementado con el antibiótico de selección, la ampicilina (100 μg /ml), y se dejaron creciendo toda la noche a 37 ° C. Se obtuvieron colonias de bacterias transformadas: se picaron dos de

ellas y se añadieron sobre 1 ml de LB suplementado con ampicilina, dejando que crecieran durante 12 horas con una agitación constante de 225 rpm durante toda la noche en un incubador de agitación. Por último, validamos el plásmido obtenido mediante PCR, para lo cual es preciso lisar las bacterias y aislar el plásmido; se empleó el kit *NucleoSpin Plasmid* (Macherey-Nagel), siguiendo las indicaciones del fabricante. Una vez obtenido el DNA, se cortó con los enzimas de restricción Ase I y Cla I: preparándose una mezcla de 10 µl con DNA (250 ng), enzimas de restricción (5 U/µl), buffer correspondiente (10X), y agua Mili-Q. Se dejó incubando a 37 ° C durante 1h 30 minutos, y se cargaron en un gel de agarosa al 1,2 %. Se usó el bromuro de etidio como agente intercalante, y tras la electroforesis, llevada a cabo en el *Electrophoresis Power Supply EPS 301*, se observaron los fragmentos mediante luz ultravioleta en el *Molecular Imager® Gel Doc™ XR System* procesándose las imágenes con el *ImageLab Software*.

Cuando se comprobó que el plásmido se había insertado correctamente en las bacterias transformadas, se pasó a amplificarlo.

2) Amplificación del plásmido: se añaden las bacterias transformadas sobre 250 ml de medio LB suplementado con ampicilina (100 µg /ml), y se crecieron durante 24 h a 37 ° C y 225 rpm. A continuación, se centrifugaron durante 15 minutos a 10.000 rpm en la ultracentrífuga Beckman Coulter Avanti® J-26S XPI (con el rotor JA-10). Se retiró el sobrenadante, permaneciendo en el precipitado las bacterias transformadas, y se llevó a cabo la purificación del ADN con el kit *NucleoBond® Xtra Midi* (Macherey-Nagel), según las instrucciones del fabricante. Para cuantificación la cantidad de plásmido obtenido se empleó el espectrofotómetro Nanodrop™2000.

3) Transfección: se llevó a cabo en la línea celular HEK293, que se sembró en una placa de 24 pocillos, a razón de 80.000 células/pocillo. Se usó el reactivo de transfección DreamFect™ Gold: se usó en una proporción 1:2 respecto a la cantidad de ADN; se añadieron 100 µl de mezcla de transfección sobre cada pocillo, habiéndose retirado previamente 600 µl de los mismos. Para preparar la mezcla de transfección, el reactivo de transfección se añadió sobre medio DMEN sin suplementar, sobre el que se incorporó el ADN, y se dejó incubando durante 20 min, tras lo que se les sometió a un vortex (*ZX3 Advanced*

Vortex Mixer) y se añadieron sobre las células. Se incubaron las células durante 24 h a 37 ° C, tras lo que se le añadió el tratamiento correspondiente.

4) Tratamiento: sobre las células HEK293 transfretadas se añadieron los tratamientos con los complejos de estudio: [IrCl(Cp*)(phbzIm)] 9,7 μM, [RhCl(Cp*)(phbzIm)] 29 μM, y [RuCl(cym)(phbzIm)] 50 μM. Se empleó la tunicamicina (TU) como control positivo, a una concentración de 0,5 μM. Las células se tiñeron con IP (1 μg/ml) para detectar eventos de muerte.

El plásmido CHOP::GFP es inducible, activándose solamente cuando las células se encuentran bajo una situación de estrés, (su señal aparece de color verde, mientras que la del IP es roja) y para monitorizar este fenómeno se empleó el microscopio invertido de campo claro Leica DMI 6000B, que presenta la cámara Leica DFa 360Fx y el controlador de temperatura Okolab. Se trata de un microscopio de fluorescencia time-lapse, con el que se fueron tomando imágenes cada 30 minutos durante 24 horas. Las imágenes se procesaron con el software “LAS AF”.

4.1.8 Determinación de la expresión de ATF6

Se empleó el plásmido p5xATF6-GL3 (Addgene plasmid #11976; <http://n2t.net/addgene:11976>; RRID: Addgene_11976), que rastrea la actividad de ATF6. Cuenta con el gen de la luciferasa, que codifica un enzima que emite luz cuando se oxida, por lo que para medir la actividad de este gen se emplearon ensayos de bioluminescencia.

Para llevar a cabo esta aproximación experimental, nos encontramos con tres fases diferenciadas: transformación, amplificación, y transfección. Se llevaron a cabo de igual manera que se explicó en el anterior apartado “3.1.7 Determinación de la expresión de CHOP”, con una salvedad: en este caso las enzimas de restricción empleadas para validar el plásmido obtenido fueron Ase I y Not I (con sus respectivos buffers).

Una vez se transfectaron las células, se llevó a cabo su tratamiento y evaluación del efecto de los compuestos sobre el gen de estudio.

Tratamiento: sobre las células HEK293 transfretadas se añadieron los tratamientos con los complejos de estudio: [IrCl(Cp*)(phbzIm)] 16

μM , $[\text{RhCl}(\text{Cp}^*)(\text{phbzIm})]$ $43 \mu\text{M}$, y $[\text{RuCl}(\text{cym})(\text{phbzIm})]$ $50 \mu\text{M}$. Se empleó la tunicamicina (TU) como control positivo, a una concentración de $1,2 \mu\text{M}$. Estos tratamientos se dejaron incubando a 37°C durante 2, 4 y 6 horas, para evaluar la actividad de ATF6 a estos tiempos.

La cuantificación de la actividad de ATF6 se llevó a cabo mediante el ensayo de luciferasa:

Se retiró el medio de las células y se sometieron a tres lavados consecutivos con PBS frío ($500 \mu\text{l}$). Se añadió el lysis buffer ($100 \mu\text{l}/\text{pocillo}$) y se dejaron incubando durante 15 min a RT bajo una agitación constante de 140 rpm. A continuación, se arrastraron las células depositándolas en tubos de $1,5 \text{ ml}$ mantenidos en hielo. Se centrifugaron a 4°C durante 12 min a 12.000 rpm . Se recogieron $10 \mu\text{l}$ del sobrenadante, que contiene el extracto proteico, de cada una de las muestras y se incorporaron sobre una placa blanca de fondo opaco de 96 pocillos, donde se añadieron $68 \mu\text{l}$ del tampón de ensayo luciferasa por pocillo, incubándose a RT y 140 rpm durante 5 min protegiendo las placas de la luz.

El tampón de ensayo luciferasa consta de los siguientes componentes: Gly-Gly pH 7,8 (25 mM), fosfato potásico pH7,8 (15 mM), MgSO_4 (15 mM), EGTA (4 mM), ATP (2 mM) y DTT (1 mM). Durante esta incubación se preparó la solución de luciferina ($2,5 \text{ ml}$), protegiéndose de la luz: D-luciferina (25 mM), Gly-Gly pH 7,8 (15 mM) y DTT (15 mM).

La placa con las muestras se analizó en el luminómetro Lumat LB 9507 a 488 nm .

Por último, para determinar la concentración de la proteína se utilizó el método colorimétrico Bradford: se creó una recta estándar, preparada con diferentes cantidades de proteína conocida, empleándose BSA ($0,25 \mu\text{g}/\text{ml}$). Se incubaron en una placa de 96 pocillos con una agitación de 140 rpm durante 5 min protegidas de la luz, y se realizó la lectura de la absorbancia a 488 nm en el espectrofotómetro CLARIOstar®. A partir de esta recta estándar se extrapolaron las concentraciones de los extractos proteicos, enfrentando los valores del ensayo de luciferasa frente a los valores de la recta patrón.

4.1.9 Tratamiento combinado con β -mercaptoetanol

El β -mercaptoetanol es un antioxidante que actúa como catalizador durante el proceso de reorganización de las proteínas.

Se realizó un estudio de viabilidad usando el β -mercaptoetanol en combinación con el compuesto de rodio. Se midió la citotoxicidad mediante el ensayo del MTT y mediante la observación en el microscopio Olympus IX51.

1) Ensayo de MTT: Se sembraron células A549 en placas de 96 pocillos (4.000 células/pocillo), y se dejaron incubando durante 24 horas a 37 ° C, tras lo que se añadió el tratamiento combinado de β -mercaptoetanol (25 μ M) con el compuesto [RhCl(Cp*)(phbzIm)] (43 μ M), o bien un tratamiento de este último compuesto en solitario ([RhCl(Cp*)(phbzIm)] a 43 μ M. Se dejó durante 6, 24 y 48 horas, incubándose a 37 ° C. Cada condición se testó por triplicado.

Tras los tiempos de tratamientos correspondientes, se añadieron 10 μ l de solución de MTT (5 mg/L) por pocillo, protegiendo las placas de la luz. Tras 4 horas se añadieron 100 μ l de la solución de solubilización (SDS/0,1NHCL) y se dejaron incubando durante 18 horas a 37 ° C. Se midió la absorbancia a 595 nm en el lector de placas CLARIOstar®.

2) Para observar dicho efecto mediante microscopía, se sembraron las células A549 en placas de 24 pocillos, a razón de 30.000 células/pocillo, y se dejaron incubando a 37 ° C durante 24 horas. Tras este tiempo se añadieron los tratamientos de rodio (43 μ M), y de rodio (43 μ M) combinado con β -mercaptoetanol (25 μ M), y se dejaron incubando durante 6 horas a 37 ° C. Se tiñeron con una mezcla de Hoechts (1 μ g/ml) e IP (1 μ g/ml) durante 20 minutos, tras lo que observaron usando microscopía de fluorescencia. Se tomaron imágenes representativas usando el microscopio Olympus IX51 equipado con cámara Olympus DP72 y el Software *CellSens Imaging*.

4.1.10 Tratamiento combinado con DTT

El 1,4-Dithiothreitol (DTT) es un agente reductor que actúa sobre los enlaces disulfuro: mantiene los monotioles en estado reducido y actúa como desnaturizante de proteínas, escindiendo los enlaces disulfuro entre los grupos de cisteína en proteínas y péptidos.

Se estudió el efecto que pudiera tener el DTT sobre células tratadas con los complejos de rodio. Para ello se llevó a cabo un testeo de la viabilidad de células pretratadas con DTT y posteriormente tratadas con los complejos, mediante el ensayo MTT. Además, se observaron los cambios morfológicos que pudieran tener lugar mediante microscopía.

1) Estudio citotóxico: se sembraron células A549 en placas de 96 pocillos (4.000 células/pocillo). Se dejaron incubando a 37 ° C durante 24 horas, tras lo que se retiró el medio y se añadió el tratamiento correspondiente: a) DTT (0,5 mM); b) DTT (0,5 mM) combinado con [RhCl(Cp*)(phbzIm)] (64 µM). Se dejaron incubando a 37 ° C durante 24 horas, tras lo que se añadieron 10 µl de solución de MTT (5 mg/L) en cada pocillo, protegiendo la placa de la luz e incubándola durante 4 horas a 37 ° C. Se añadieron después 100 µl de la solución de solubilización (SDS/0,1NHCL). Se incubaron las placas a 37 ° C durante 18 horas, tras lo que se midió la absorbancia a 595 nm en el lector de placas CLARIOstar®.

2) Observación mediante microscopía de los cambios morfológicos: se sembraron células A549 en placas de 24 pocillos (30.000 células/pocillo), y tras 24 horas de incubación a 37 ° C, se les añadió el tratamiento: [RhCl(Cp*)(phbzIm)] (64 µM) y una combinación de DTT (0,5 mM) y [RhCl(Cp*)(phbzIm)] (64 µM). Después de otras 24 horas de incubación a 37 ° C, se sacaron fotografías de las células tratadas en las diferentes condiciones en el microscopio de fluorescencia Olympus IX51 equipado con cámara Olympus DP72 y el software de adquisición *CellSense* (Olympus). Se escogió una muestra representativa de las mismas.

4.1.11 Tratamiento combinado con NAC

La N-Acetil-L-cisteína (NAC) presenta un potencial efecto antioxidante captando los radicales libres generados en las células como consecuencia de los procesos de estrés oxidativo. Dicho efecto se lo confiere el GSH junto a un grupo tiol (-SH) cedido por la cisteína. Se estudió el efecto que podría tener sobre el mecanismo desencadenado por los complejos de estudio el pretratamiento de las células con NAC. Se testó su viabilidad mediante el ensayo del MTT.

Se sembraron las células A549 en placas de 96 pocillos a razón de 4.000 células/pocillo. Tras 24 horas se retiró el medio y se añadió el tratamiento con NAC (10 mM) durante 2 horas a 37 ° C, tiempo tras el que se retiró y se reemplazó por los tratamientos correspondientes con los complejos de rodio e iridio, testándose tres concentraciones de cada uno de ellos. [IrCl(Cp*)(phbzIm)]: 8 µM, 16 µM, 24 µM, y [RhCl(Cp*)(phbzIm)]: 21,5 µM, 43 µM, 64,5 µM. Cada una de las concentraciones se testó por triplicado.

Tras 24 horas de tratamiento, permaneciendo las células a 37 ° C, se añadieron en cada pocillo 10 µl de solución de MTT (5 mg/L), protegiendo las placas de la luz. Tras 4 horas se añadieron 100 µl de la solución de solubilización (SDS/0,1NHCL) y se dejaron incubando durante 18 horas a 37 ° C. Se midió la absorbancia a 595 nm en el lector de placas CLARIOstar®.

4.1.12 Tratamiento combinado con ácido aspártico

El ácido aspártico es un amino ácido no esencial que participa en el ciclo de la urea, el ciclo de Krebs y en el metabolismo del ADN.

Se midió el efecto que pudiera tener el ácido aspártico sobre células tratadas con el complejo de rodio. Para ello se llevó a cabo un testeo de la viabilidad de células pretratadas con ácido aspártico y posteriormente tratadas con rodio, mediante el ensayo MTT. Además, se observaron los cambios morfológicos que pudieran tener lugar mediante microscopía.

1) Estudio citotóxico: se sembraron células A549 en placas de 96 pocillos (4.000 células/pocillo). Se dejaron incubando a 37 ° C durante 24 horas, tras lo que se retiró el medio y se añadió el tratamiento correspondiente: [RhCl(Cp*)(phbzIm)] (43 µM y 64,5 µM) solo y en combinación con ácido aspártico (20 mM). Cada una de las condiciones se testó por triplicado, incubándose a 24 horas a 37 ° C. A continuación, en cada pocillo se añadieron 10 µl de solución de MTT (5 mg/L), protegiendo las placas de la luz, y tras 4 horas, 100 µl de la solución de solubilización (SDS/0,1NHCL). Todas las muestras se incubaron a 37 ° C durante 18 horas, tras lo que se midió la absorbancia a 595 nm en el lector de placas CLARIOstar®.

2) Observación mediante microscopía de los cambios morfológicos: se sembraron células A549 en placas de 24 pocillos

(30.000 células/pocillo), y tras 24 horas de incubación a 37 ° C, se les añadió el tratamiento: [RhCl(Cp*)(phbzIm)] (43 µM) y una combinación de ácido aspártico (20 mM) y [RhCl(Cp*)(phbzIm)] (43 µM). Después de otras 24 horas de incubación, se sacaron fotografías de las células tratadas en las diferentes condiciones en el microscopio de fluorescencia Olympus IX51 equipado con cámara Olympus DP72 y el software de adquisición *CellSense* (Olympus). Se escogió una muestra representativa de las mismas.

4.1.13 Análisis de la respiración mitocondrial

Se analizaron los perfiles respiratorios mediante la tasa de consumo de oxígeno (OCR, de sus siglas en inglés), y la tasa de acidificación extracelular (ECAR, de sus siglas en inglés) en células MCF10. Se evaluó la función mitocondrial de células tratadas con el complejo [IrCl(Cp*)(phbzIm)] mediante el Kit *XFp Cell Mito Stress Test* (Agilent Technologies); las medidas se realizaron en el analizador de flujo extracelular *XFp Seahorse* (Bioscience).

Para la realización de este protocolo contamos con dos soportes: unos cartuchos (proporcionados en el kit) que se emplearán para el calibrado del aparato previamente a realizar el análisis, y unas miniplacas de cultivo Seahorse XFp. Se llevó a cabo a lo largo de dos jornadas:

Día 1- Se sembraron células MCF10, a razón de 10.000 células/pocillo, en las miniplacas de cultivo Seahorse XFp, y se dejaron a 37 ° C durante 24 h. Se pusieron a hidratar los cartuchos proporcionados por el kit, necesarios para la realización del ensayo, añadiendo 200 µl de medio XFcalibrant en los pocillos del centro y 400 µl en los laterales, y se dejaron en un incubador sin CO₂ a 37 ° C durante 24 h. Se dejó encendido el analizador de flujo extracelular *XFp Seahorse*.

Día 2- Se preparó el medio XF (Agilent Technologies), suplementándose con glucosa (10 mM), L-glutamina (2 mM), piruvato (1 mM) y FBS (1%), ajustando su pH a 7,4 con una solución de hidróxido sódico 0,1 M (NaOH 0,1N). A continuación, se hicieron dos lavados a los pocillos donde se habían sembrado las células con el medio XF (200 µl/pocillo y por lavado), y se añadió el tratamiento

correspondiente ($[\text{IrCl}(\text{Cp}^*)(\text{phbzIm})] = 16 \mu\text{M}$, y el vehículo, DMSO), que se usará como control), dejándolo durante 1 h en un incubador sin CO_2 a 37°C .

Se prepararon en tubos de 1,5 ml los tratamientos de los efectores empleados durante el análisis: oligomicina ($1 \mu\text{M}$), FCCP ($0,5 \mu\text{M}$) y R&A ($0,5 \mu\text{M}$). A continuación, los cartuchos que se habían dejado en el incubador desde el día anterior, se colocaron en el analizador de flujo *XFp Seahorse*. Se añadieron los efectores y se dejó calibrando el aparato (12-15 min), ajustándose a la hora de tratamiento de las células. Tras este tiempo, se cogió la miniplaca donde se encontraban las células y se colocaron en el analizador de flujo *XFp Seahorse*. Los datos se analizaron usando el *Agilent Seahorse Analytics*.

4.1.14 Cuantificación de la disipación de energía en forma de calor: experimento in vivo

Se trataron ratones con $[\text{IrCl}(\text{Cp}^*)(\text{phbzIm})]$ para analizar los posibles cambios de temperatura provocados por el mismo.

Después de la inyección del tratamiento, $[\text{IrCl}(\text{Cp}^*)(\text{phbzIm})]$ a una concentración de $0,439 \text{ mg/ml}$, los ratones han sido puestos en una sala a 4°C , habiéndoseles retirado la comida. La temperatura corporal se midió por vía rectal con un termómetro rectal (BAT-12 Microprobe-Thermometer, Physitemp, Clifton, NJ) y la temperatura interescapular fue medida mediante el análisis de fotos térmicas realizadas con una cámara termográfica (E60bx: Compact-Infrared-Thermal-Imaging-Camera; FLIR, West Malling, Kent, U.K.) y analizadas mediante el software específico (FLIR-Tools-Software; FLIR). Previamente a la realización de las fotografías se retiró el pelo de la zona interescapular y luego se tomaron tres imágenes por animal, tomando la media para la asignación de un valor de temperatura interescapular.

La temperatura, tanto corporal como interescapular, se midió justo antes de tratar a los animales, y a partir de las 3 horas de la administración, cada hora hasta las 7 horas; por último, se midió a las 24 horas.

Todos los procedimientos realizados con animales se llevaron a cabo conforme a lo establecido en el Real Decreto 53/2013, bajo la autorización de la Conselleria de Medio Rural, con nº 15010/17/002 de

la que es investigadora responsable la Dra. Sulay Tovar. Los experimentos fueron realizados por personal capacitado en el Centro de Biomedicina Experimental CEBEGA, centro usuario autorizado con REGA n° ES150780292901.

4.1.15 Análisis estadístico

Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo en el software GraphPad Prism versión 6.01 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, USA). Las diferencias fueron consideradas significativas para * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$, y muy significativas para *** $p < 0,001$. Los resultados se expresaron como la media \pm la desviación estándar (SD).

4.2 BACTERIAS

Reactivos

- Cepas bacterianas
- Medio *Luria Bertani* (LB)
- Medio M9, con el mínimo de sales 5X (Sigma, Cat. N.º M6030)
- PBS
- Agar
- NaCl (8 g/ml)
- Agua Mili-Q
- Resina (proporcionada por NANOGAP SUB-NM-POWER S.A.)
- [IrCl(Cp*)(phbzIm)] (sintetizado por el Departamento de Química de la Universidad de Burgos, España)
- [RhCl(Cp*)(phbzIm)] (sintetizado por el Departamento de Química de la Universidad de Burgos, España)
- [RuCl(cym)(phbzIm)] (sintetizado por el Departamento de Química de la Universidad de Burgos, España)
- DMSO (Sigma, Cat. N.º D8418)
- Ag-AQCs (proporcionados por NANOGAP SUB-NM-POWER S.A.)
- Sonda HPF, 3'-(*p*-hydroxyphenyl) fluorescein (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Cat. N.º H36004)
- Sonda DHE, indicador de superóxido dihidroetidio (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Cat. N.º D11347)
- Sonda Bis-(1,3-Dibutylbarbituric Acid) Trimethine Oxonol (DiBAC₄) (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Cat. N.º B438)

- Kit *Seahorse XFp Cell Mito Stress Test* (Agilent, Cat. N. ° 103010-100)
- Poly-L-lisina (Sigma, Cat. N.° P4832)
- D-Glucosa (Gibco, Cat. N. ° A24940-01)
- Solución de hidróxido sódico 0,1 M (NaOH 0,1N) (Panreac, Cat. N. ° 1416861211)

Materiales

- Mechero tipo Bunsen (USBECK) para el trabajo en nivel de seguridad 1
- Cámara de flujo laminar para el trabajo en nivel de seguridad 2
- Cámara de hipoxia Ruskin Invivo₂ 200
- Incubador de agitación Minitron
- Espectrofotómetro ThermoSpectronic, modelo BioMate-3
- Incubador Memmert
- Incubador IN30 Memmert (DE 66812464)
- Lector de placas CLARIOstar®
- Microcentrífuga (Centrífuga 5424 Eppendorf)
- Citómetro Guava EasyCyte (Millipore)
- Thermo-Shaker MB100-2A (Lab. Technics Labolan S.L.)
- Baño de agua Fisher Isotemp, modelo 2341
- Cámara óptica
- Micropipetas (Eppendorf)
- Membrana de diálisis *Spectra/Por®7 Dialysis Membrane; Estándar RC Trial Kit* (Spectrum Laboratories)
- Cajas de plástico de 8x8 cm
- Vaso de precipitados
- Cubetas de vidrio para espectrofotómetro
- Asa de siembra de alambre
- Placas de 96 pocillos (BD Falcon)
- Placas de 24 pocillos (Thermo Scientific™ 930186)
- Miniplacas de cultivo Seahorse XFp (Agilent, Cat. N. ° 103025-100)
- Portaobjetos
- Placas Petri de 100 mm de diámetro (BD Falcon) tratadas con agar
- Tubos de 25 ml (BD Falcon)
- Tubos de 1,5 ml (Eppendorf)

Procedimientos

4.2.1 Cepas bacterianas

Se emplearon un total de diez cepas diferentes, diferenciando dos grupos:

- Cepas almacenadas en viales a -80 °C: *Eschirichia coli* DH5α (ATCC 25922), *Eschirichia coli* (ATCC 25929), *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* (ATCC 29213), *Staphylococcus aureus* (ATCC 292135), *Enterococcus hirae* (ATCC 9790), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) y *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853).

- Aislados clínicos recogidos en el Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela (CHUS) y cedidos por el Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, de la Universidad de Santiago de Compostela: *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SARM), *Pseudomonas aeruginosa* 60568 y *Pseudomonas aeruginosa* 66479.

Condiciones de trabajo

La realización de los experimentos con las cepas de *E. coli* y *E. hirae* se llevó a cabo en un laboratorio de nivel de seguridad 1, siempre bajo llave para mantener condiciones de esterilidad.

El trabajo con las cepas de *S. aureus*, *P. aeruginosa* y *E. faecalis* se realizó en cámara de flujo laminar en un laboratorio de nivel de seguridad 2.

4.2.2 Efecto bactericida o bacteriostático

Para el crecimiento inicial de la cepa se llevaron a cabo dos aproximaciones diferentes dependiendo del tipo de muestra a tratar:

1) Las bacterias *Eschirichia coli* DH5α (ATCC 25922), *Eschirichia coli* (ATCC 25929), *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213), *Staphylococcus aureus* (ATCC 292135), *Enterococcus hirae* (ATCC 9790), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) y *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), se picaron a partir de células congeladas almacenadas a -80 °C, y se crecieron a 37 °C en 5 ml de medio *Luria*

Bertani (LB) en un tubo de 25 ml, con una agitación constante de 225 rpm durante toda la noche en un incubador de agitación.

2) Las muestras correspondientes a los aislados clínicos *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina, *Pseudomonas aeruginosa* 60568 y *Pseudomonas aeruginosa* 66479, fueron recibidas en viales, a partir de los que se prepararon diluciones y se crecieron a 37 °C en 5 ml de medio LB en un tubo de 25 ml, con una agitación constante de 225 rpm durante toda la noche en un incubador de agitación.

El crecimiento se monitorizó tomando como base la turbidez de la solución, midiendo su absorbancia en el espectrofotómetro. La absorbancia de la muestra se ajustó para alcanzar el estándar 0,5 McFarland (la DO a 620 nm debe situarse entre 0,08-0,13). A continuación, se llevó a cabo una dilución 1/500 de la solución de bacterias 0,5 McFarland en PBS, y se sembraron en placas de 96 pocillos, testando la actividad antimicrobiana de los complejos siguiendo el siguiente protocolo:

1) Se añadieron 40 µl de PBS en cada pocillo, sobre los que se incorporaron 10 µl de la solución bacteriana.

2) Las bacterias fueron tratadas con las concentraciones de los complejos ([IrCl(Cp*)(phbzIm)] , [RhCl(Cp*)(phbzIm)] o [RuCl(cym)(phbzIm) según corresponda), especificadas a continuación, tomando como control el vehículo en el que se encuentran los mismos (el DMSO): 1,34 mM; 0,67 mM; 0,335 mM; 0,167 mM; 0,084 mM; 0,042 mM; 0,021 mM; 0,011 mM y 0,005 mM (cada una de las condiciones por triplicado). Se dejaron incubando durante 30 minutos protegidas de la luz.

3) Se añadieron 150 µl de LB en cada pocillo, y se incubó la placa protegida de la luz durante toda la noche a 37° C.

4) Se midió la absorbancia obtenida a 600 nm usando el lector de placas CLARIOstar®.

Con el objetivo de diferenciar si los complejos presentan un efecto bactericida o bacteriostático, se llevaron a cabo dos aproximaciones diferentes:

1) Para las cepas provenientes de las muestras almacenadas a -80 °C: *Escherichia coli* DH5α (ATCC 25922), *Escherichia coli* (ATCC

25929), *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213), *Staphylococcus aureus* (ATCC 292135), *Enterococcus hirae* (ATCC 9790), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) y *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), se llevó a cabo la resiembra de bacterias en placas de agar. Se recogieron 10 µl de la solución bacteriana a testar, y se añadieron sobre 50 µl de LB, sembrando la solución resultante en una placa de agar. Se incubaron a 37 °C durante toda la noche para evaluar el crecimiento bacteriano. Se tomaron una serie de fotografías representativas con una cámara óptica.

2) Para las cepas correspondientes con los aislados clínicos: *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina, *Pseudomonas aeruginosa* 60568 y *Pseudomonas aeruginosa* 66479, se llevó a cabo la resiembra de bacterias en una nueva placa de 96 pocillos, seleccionando aquellas concentraciones con las que se producía inhibición del crecimiento. Se añadieron 150 µl de LB sobre los 20 µl de la solución bacteriana resembrada. Se incubó la nueva placa a 37 °C durante toda la noche, tras lo que se mide la absorbancia a 600 nm usando el lector de placas CLARIOstar®.

4.2.3 Crecimiento bajo condiciones de hipoxia

Este ensayo se lleva a cabo en una cámara de hipoxia Ruskin Invivo₂200, con unas condiciones de 0,2% de O₂, 5% de CO₂ y una temperatura de 37 °C.

Las bacterias *E. coli* DH5α (ATCC 25922) se picaron a partir de células congeladas almacenadas a -80 °C, y se crecieron a 37 °C en 5 ml de LB en un tubo de 25 ml, con una agitación constante de 225 rpm durante toda la noche en un incubador de agitación.

Una vez crecidas, las bacterias se introdujeron, junto con todos los reactivos y material que se empleó en el ensayo, en la cámara de hipoxia durante 24 horas.

Tras este período, el crecimiento se monitorizó tomando como base la turbidez de la solución, midiendo su absorbancia en el espectrofotómetro (para ello se retiraron de la cámara las cubetas de vidrio con la solución bacteriana). La absorbancia de la muestra se ajustó para alcanzar el estándar 0,5 McFarland (la DO a 620 nm debe situarse entre 0,08-0,13).

A continuación, se llevó a cabo una dilución 1/500 de la solución de bacterias 0,5 McFarland en PBS, y se sembraron en placas de 96 pocillos, testando la actividad antimicrobiana de los complejos siguiendo el siguiente protocolo:

1) Se añadieron 40 μ l de PBS en cada pocillo, sobre los que se incorporaron 10 μ l de la solución bacteriana.

2) Las bacterias fueron tratadas con las concentraciones de los complejos ([IrCl(Cp*)(phbzIm)] , [RhCl(Cp*)(phbzIm)] o [RuCl(cym)(phbzIm) según corresponda), especificadas a continuación, tomando como control el vehículo en el que se encuentran los mismos (el DMSO): 1,34 mM; 0,67 mM; 0,335 mM; 0,167 mM; 0,084 mM; 0,042 mM; 0,021 mM; 0,011 mM y 0,005 mM (cada una de las condiciones por triplicado). Se dejaron incubando durante 30 minutos protegidas de la luz.

3) Se añadieron 150 μ l de LB en cada pocillo, y se incubó la placa protegida de la luz durante toda la noche.

4) Se retiraron las placas de la cámara de hipoxia y se midió la absorbancia obtenida a 600 nm usando el lector de placas CLARIOstar®.

4.2.4 Determinación de los niveles de ROS

Para medir los niveles de ROS se llevaron a cabo dos aproximaciones diferentes, con el dihidroetidio (DHE), y con la fluoresceína 3'-(p-hidroxifenilo) (HPF). El DHE se emplea para monitorizar los niveles de superóxido en el citosol, y la HPF detecta los radicales hidroxilos. El DHE muestra fluorescencia azul en el citosol, pero una vez que se oxida, se intercala en el ADN mostrando fluorescencia roja; en cambio, la HPF es una molécula no fluorescente hasta que se oxida una vez que reacciona con los radicales hidroxilos, mostrando fluorescencia verde. La oxidación de estas moléculas se monitoriza midiendo el incremento de fluorescencia mediante citometría de flujo usando el citómetro Guava EasyCyte.

Para la realización de este experimento, las bacterias *E. coli* DH5 α (ATCC 25922) se picaron a partir de células congeladas almacenadas a -80 °C, y se crecieron a 37 °C en 5 ml de LB en un tubo de 25 ml, con una agitación constante de 225 rpm durante toda la noche en un

incubador de agitación. El crecimiento se monitorizó tomando como base la turbidez de la solución, midiendo su absorbancia en el espectrofotómetro, ajustando a una DO a 620 nm de 0,3.

1) Se añadió 1 ml de esta solución bacteriana en dos tubos de 1,5 ml que se centrifugaron durante 5 min a 3.500 rpm.

2) Se retiró el sobrenadante y el precipitado de un tubo se volvió a suspender en 1 ml de PBS y el otro en 1 ml de PBS con HPF (5 mM) ó DHE (0,5 μ M), según corresponda. Se incubaron 30 min a 37°C protegidos de la luz.

3) Se prepararon los tratamientos, en tubos de 1,5 ml: control (DMSO), por duplicado, [IrCl(Cp*)(phbzIm)] y [RhCl(Cp*)(phbzIm)] en una concentración de 0,214 mM y 80 μ l de volumen.

3) Se centrifugaron durante 5 min a 3.500 rpm y se retiró el sobrenadante. Se volvieron a suspender en 1 ml de PBS y se añadieron 20 μ l de bacterias teñidas en los tubos de 1,5 ml preparados con los diferentes tratamientos, y 20 μ l de las bacterias sin teñir como control (negativo).

4) Se incubaron durante hora y media a RT protegidos de la luz.

5) Se centrifugaron durante 5 min a 3.500 rpm, se retiró el sobrenadante y se volvieron a suspender en 100 μ l de PBS.

6) Se evaluó la fluorescencia presente en las bacterias mediante citometría de flujo (Guava EasyCyte, Millipore)

4.2.5 Determinación del potencial de membrana

El ácido 1,3-dibutilbarbitúrico trimetino oxonol (DiBAC4) se emplea para medir los cambios en el potencial de membrana, gracias a su capacidad de entrada en células despolarizadas, donde se une a las proteínas o membranas intracelulares, exhibiendo una fluorescencia mayor y un cambio espectral rojo. El aumento de la despolarización dará lugar a un incremento de fluorescencia debido a una entrada del colorante aniónico, mientras que la hiperpolarización se mostrará como una disminución de la fluorescencia. Estos cambios de fluorescencia se monitorizaron mediante citometría de flujo empleando el citómetro Guava EasyCyte.

El primer paso fue la obtención de las bacterias: *E. coli* DH5 α (ATCC 25922) se picaron a partir de células congeladas almacenadas a

-80 °C, y se crecieron a 37 °C en 5 ml de LB en un tubo de 25 ml con una agitación constante de 225 rpm durante toda la noche en un incubador de agitación. El crecimiento se monitorizó tomando como base la turbidez de la solución, midiendo su absorbancia en el espectrofotómetro, ajustando a una DO a 620 nm de 0,3.

1) Se añadió 1 ml de esta solución bacteriana en dos tubos de 1,5 ml que se centrifugaron durante 5 min a 3.500 rpm.

2) Se retiró el sobrenadante y un tubo se volvió a suspender en 1 ml de PBS y el otro en 1 ml de PBS con DiBAC₄ (10 µg/ml). Se incubaron 30 min a 37°C protegidos de la luz.

3) Se prepararon los tratamientos, en tubos de 1,5 ml: DMSO, [IrCl(Cp*)(phbzIm)], [RhCl(Cp*)(phbzIm)] y [RuCl(cym)(phbzIm)] en una concentración de 0,214 mM y 80 µl de volumen.

3) Se centrifugaron durante 5 min a 3.500 rpm y se retiró el sobrenadante. Se vuelven a suspender en 1 ml de PBS y se añadieron 20 µl de bacterias teñidas en los tubos de 1,5 ml preparados con los diferentes tratamientos, y 20 µl de bacterias sin teñir como control negativo.

4) Se incubaron durante 1 h a RT protegidos de la luz.

5) Se centrifugaron durante 5 min a 3.500 rpm, se retiró el sobrenadante y se volvieron a suspender en 100 µl de PBS.

6) Se evaluó la fluorescencia presente en las bacterias mediante citometría de flujo (Guava EasyCyte, Millipore)

4.2.6 Estudio del estado de la respiración mitocondrial

Se evaluó la función mitocondrial de bacterias *E. coli* tratadas con el complejo [RhCl(Cp*)(phbzIm)] mediante el Kit *XFp Cell Mito Stress Test* (Agilent Technologies); las medidas se realizaron en el analizador de flujo extracelular *XFp Seahorse* (Bioscience).

Para la realización de este protocolo contamos con dos soportes: unos cartuchos (proporcionados en el kit) que se emplearán para el calibrado del aparato previamente a realizar el análisis, y unas miniplacas de cultivo Seahorse XFp. Se llevó a cabo a lo largo de dos jornadas:

Día 1- Las bacterias *E. coli* DH5α (ATCC 25922) se picaron a partir de células congeladas almacenadas a -80 °C, y se crecieron a 37 °C en

5 ml de medio M9 (suplementado con glucosa 10 mM) en un tubo de 25 ml, con una agitación constante de 225 rpm durante toda la noche en un incubador de agitación. Se pusieron a hidratar los cartuchos proporcionados por el kit, necesarios para la realización del ensayo, añadiendo 200 μ l de medio XFcalibrant en los pocillos del centro y 400 μ l en los laterales, y se dejaron en un incubador sin CO₂ a 37 ° C durante 24 h. Se dejó encendido el analizador de flujo extracelular *XFp Seahorse*.

Día 2- El crecimiento de las bacterias se monitorizó tomando como base la turbidez de la solución, midiendo su absorbancia en el espectrofotómetro. La absorbancia de la muestra se ajustó para alcanzar el estándar 0,5 McFarland (la DO a 620 nm debe situarse entre 0,08-0,13). A continuación, se llevó a cabo una dilución 1/500 de la solución de bacterias 0,5 McFarland en PBS, y se sembraron con el medio M9 en la miniplaca de cultivo Seahorse XFp (cuyos pocillos se habían lavado previamente con poly-lisina), y se dejaron a 37 ° C durante 4 h. Al medio M9 (suplementado con glucosa 10 mM) se le ajustó el pH a 7,4 con una solución de hidróxido sódico 0,1 M (NaOH 0,1N).

Tras la incubación de 4 h, se prepararon en tubos de 1,5 ml los tratamientos: [RhCl(Cp*)(phbzIm9)] = 2,142 mM, 0,428 mM, 0,214 mM, 0,107 mM y 0,0535 mM y el vehículo, DMSO, que se usará como control. A continuación, los cartuchos que se habían dejado en el incubador desde el día anterior, se colocaron en el analizador de flujo *XFp Seahorse* para calibrarlo, tras lo que se colocó la miniplaca con las bacterias y se inyectaron los tratamientos que se habían preparado. Los datos se analizaron usando el *Agilent Seahorse Analytics*.

4.2.7 Ensayos de eficiencia biocida en placas tratadas con AQC

Se nos facilitaron placas de 24 pocillos cuyo contenido sigue el esquema general mostrado en la Fig. 1, donde los pocillos están recubiertos con una formulación que contiene diferentes concentraciones de AQC de las que se quiere conocer la capacidad biocida.

La preparación del recubrimiento de las mismas se llevó por el personal de NANOGAP SUB-NM-POWER S.A, y el ensayo microbiológico desarrollado fue el siguiente:

Las bacterias *E. coli* DH5 α (ATCC 25922) se picaron a partir de células congeladas almacenadas a -80 °C, y se crecieron a 37 °C en 5 ml de LB en un tubo de 25 ml, con una agitación constante de 225 rpm durante toda la noche en un incubador de agitación. El crecimiento se monitorizó tomando como base la turbidez de la solución, midiendo su absorbancia en el espectrofotómetro. La absorbancia de la muestra se ajustó para alcanzar el estándar 0,5 McFarland (la DO a 620 nm debe situarse entre 0,08-0,13).

A continuación, se llevó a cabo una dilución 1/500 de la solución de bacterias 0,5 McFarland en PBS, y se sembraron en las placas de 24 pocillos ya tratadas, testando la actividad antimicrobiana de los recubrimientos siguiendo el siguiente protocolo:

1) Se añadieron 40 μ l de PBS en cada pocillo, sobre los que se incorporaron 10 μ l de la solución bacteriana. Se dejaron incubando a 37 °C y 500 rpm en un agitador de microplacas durante 10 o 60 minutos, diferenciando de esta manera dos tiempos de exposición. Se dejaron pocillos como blanco, en los que no se sembraron bacterias y se añadieron 50 μ l de PBS.

2) Se añadieron 2 ml de LB en cada pocillo, y se incubó la placa protegida de la luz durante 6 horas a 37° C y 150 rpm.

3) Se recogieron 10 μ l de la solución bacteriana de los diferentes pocillos, y se hicieron diluciones 1/5 en LB, sembrando la solución resultante en una placa Petri con agar.

4) Se incubaron durante toda la noche, las placas de 24 pocillos a 37 °C y 150 rpm y las placas de agar en una estufa a 37 °C.

5) Se midió la absorbancia obtenida en las placas de 24 pocillos a 600 nm usando el lector de placas CLARIOstar®, y se tomaron una serie de fotografías representativas de las placas de agar con una cámara óptica.

Este protocolo general sufrió modificaciones con el objetivo de conocer la influencia de la temperatura en la capacidad biocida: las exposiciones de 10 o 60 minutos se llevaron a cabo a 5 y 15 °C.

0	0	0	714	714	714
2.000	2.000	2.000	2.857	2.857	2.857
3.937	3.937	3.937	x	x	x
x	x	x	x	x	x

Figura 1. Contenido de las placas de 24 pocillos mostrándose la cantidad de plata (en ppm) presente en el revestimiento de cada uno de los pocillos. La “x” representa pocillos sin revestimiento que se usaron como control negativo y blanco.

4.2.8 Influencia del NaCl en la capacidad biocida

Las placas de 24 pocillos proporcionadas por NANOGAP SUB-NM-POWER S.A, cuyos pocillos están recubiertos con una formulación que contiene diferentes concentraciones de Ag-AQCs, se incubaron con una solución de NaCl y con agua Mili-Q para determinar si la primera presentaba algún efecto sobre la capacidad biocida de esta formulación.

Se añadieron 1,5 ml de solución de NaCl (80 g/L) o de agua Mili-Q, según corresponda, en cada pocillo y se dejaron incubando a 37 o 60 °C y 150 rpm durante 72 horas. Tras esta incubación previa, se retiraron las soluciones de las placas, se realizaron dos lavados consecutivos con 500 µl de PBS por pocillo y se continuó con el protocolo especificado en el apartado “Ensayos de eficiencia biocida en placas”.

4.2.9 Ensayos de eficiencia biocida en soportes con AQCs

Se nos facilitaron portaobjetos de microscopía sobre los que se depositó, mediante *spin-coating*, una resina conteniendo Ag-AQC, de la que se quiere conocer la capacidad biocida. Las concentraciones de Ag-AQC testadas fueron 355 ppm, 410 ppm y 2.840 ppm.

La preparación del recubrimiento de los mismos se llevó por el personal de NANOGAP SUB-NM-POWER S.A, y el ensayo microbiológico desarrollado fue el siguiente:

Las bacterias *E. coli* DH5α (ATCC 25922) se picaron a partir de células congeladas almacenadas a -80 °C, y se crecieron a 37 °C en 5 ml de LB en un tubo de 25 ml, con una agitación constante de 225 rpm durante toda la noche en un incubador de agitación. El crecimiento se monitorizó tomando como base la turbidez de la solución, midiendo su absorbancia en el espectrofotómetro. La absorbancia de la muestra se

ajustó para alcanzar el estándar 0,5 McFarland (la DO a 620 nm debe situarse entre 0,08-0,13).

A continuación, se llevó a cabo una dilución 1/500 de la solución de bacterias 0,5 McFarland en PBS, y se sembraron en los soportes tratados, testando la actividad antimicrobiana de los recubrimientos siguiendo el siguiente protocolo:

1) En un tubo de 1,5 ml se añadieron 100 μ l de la solución bacteriana, a los que se incorporaron 900 μ l de una mezcla de PBS+Agar 0,5%, previamente autoclavada y atemperada a 37 °C. Se mezcló pipeteando arriba y abajo sin llegar a formar burbujas.

2) Se añadió el ml de la mezcla bacteriana sobre los soportes y se dejó incubando durante 30 min a RT.

3) Se añadieron 2 ml de una mezcla de LB+Agar 0,5%, previamente autoclavada y atemperada a 37 °C, sobre cada uno de los soportes, gota a gota, cubriendo bien la mezcla añadida con anterioridad.

4) Se incubaron los soportes protegidos de la luz a 37 °C durante toda la noche.

5) Se tomaron fotografías representativas con una cámara óptica.

4.2.10 Migración de AQCs

Para observar el fenómeno de migración de los Ag-AQCs se emplearon membranas de diálisis Spectra/Por[®] 7 y piezas sólidas de polímero que contienen Ag-AQC (control, con [Ag]=0, y [Ag]= 3937 ppm).

Se usaron 4 membranas diferentes, dos para muestras control [Ag]=0 ppm y tiempos de incubación de 10 y 60 minutos, y otras dos para muestras de [Ag]= 3937 ppm con los mismos tiempos de incubación (Fig. 2A).

1) Preparación de las membranas: se recortaron 4 membranas de 10 cm de largo, y se pusieron en un vaso de precipitados cubiertas de agua destilada en agitación durante 30 minutos para eliminar el buffer azida. A continuación, se colocaron las pinzas en ambos extremos de la membrana y se colocaron en unas cajas de plástico de 8x8 cm.

2) Preparación de las bacterias: las bacterias *E. coli* DH5 α (ATCC 25922) se picaron a partir de células congeladas almacenadas a -80 °C, y se crecieron a 37 °C en 5 ml de LB en un tubo de 25 ml, con una

agitación constante de 225 rpm durante toda la noche en un incubador de agitación. El crecimiento se monitorizó tomando como base la turbidez de la solución, midiendo su absorbancia en el espectrofotómetro. La absorbancia de la muestra se ajustó para alcanzar el estándar 0,5 McFarland (la DO a 620 nm debe situarse entre 0,08-0,13) y se hizo una dilución 1/500 en PBS.

3) Montaje: en el interior de las membranas se colocaron las muestras sólidas de AQC's, según correspondiera, así como 8 ml de la solución bacteriana. En el soporte exterior se añadieron 16 ml de solución bacteriana, cubriendo completamente el fondo (Fig. 2B).

4) Las membranas se dejaron incubando a 37 °C y 500 rpm durante el tiempo de exposición correspondiente (10 o 60 minutos).

5) Se pipetearon 244 µl de cada condición, por triplicado, en una placa de 6 pocillos, y se añadieron 10 ml de LB por pocillo.

6) Se dejaron incubando las placas de 6 pocillos a 37° durante toda la noche.

7) Se midió la absorbancia obtenida a 600 nm usando el lector de placas CLARIOstar®, y se tomaron una serie de fotografías representativas con una cámara óptica.

A

Exposición durante 10 minutos			
Control ([Ag]=0)		Muestra ([Ag]= 3937 ppm)	
En el exterior de la membrana	En el interior de la membrana	En el exterior de la membrana	En el interior de la membrana

Exposición durante 60 minutos			
Control ([Ag]=0)		Muestra ([Ag]= 3937 ppm)	
En el exterior de la membrana	En el interior de la membrana	En el exterior de la membrana	En el interior de la membrana

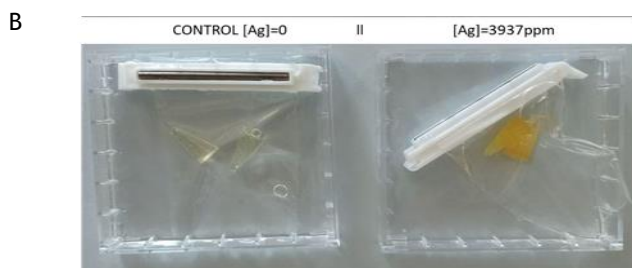


Figura 2. A) Condiciones del experimento de migración. Se establecieron un total de 8 condiciones que dependieron del tiempo de contacto entre las bacterias y los tratamientos, del tipo de muestra con el que estén en contacto ([Ag] de 0 o 3937 ppm), y de si provienen del interior o del exterior de la membrana de diálisis. **B) Montaje del experimento de migración.** Se muestran dos membranas de diálisis con las muestras sólidas de tratamiento, así como la solución bacteriana tanto en el interior de las mismas como en el exterior, recubriendo el fondo de la caja que las alberga (Nota: fotografía tomada una vez que se habían retirados las pinzas que cerraban la parte inferior de las membranas para poder recoger las muestras).

4.2.11 Análisis estadístico

Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo en el software GraphPad Prism versión 6.01 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, USA). Las diferencias fueron consideradas significativas para * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$, y muy significativas para *** $p < 0,001$. Los resultados se expresaron como la media \pm la desviación estándar (SD).

5 RESULTADOS





Se han empleado tres compuestos metálicos derivados del rutenio, rodio e iridio. Su selección se realizó, como se dijo en la introducción, en un trabajo previo de cribado de una biblioteca de compuestos con estos centros metálicos, presentando variaciones en sus ligandos. La evaluación de su actividad citotóxica se hizo a través del cálculo de la dosis IC_{50} , definida por la FDA como la concentración de un fármaco que se requiere in vitro para una inhibición del crecimiento celular del 50%. De esta manera, el criterio que se siguió fue que presentaran un valor de la misma, igual o inferior a $50 \mu M$, fueran estables y solubles, habiéndose testado en la línea celular A549.

De acuerdo con lo postulado por Sadler y colab., la naturaleza de los ligandos, más allá de su centro metálico, proporcionará al complejo unas propiedades específicas, y las diferencias de citotoxicidad encontradas en este primer cribado así lo corroboran. Los tres compuestos seleccionados presentan una estructura “half-sandwich” o “taburete de piano”, donde el grupo saliente es decisivo en la activación del complejo, el ligando quelante determina su estabilidad y cinética, y el ligando areno resulta clave en su absorción celular e interacción con posibles dianas.

Estos compuestos son: el $RuCl(cym)(phbzIm)$, al que nos referiremos también a lo largo de este trabajo como compuesto de rutenio, con una IC_{50} de $50 \mu M$; el $RhCl(Cp^*)(phbzIm)$, que también nombraremos como compuesto de rodio, con una IC_{50} de $43 \mu M$; y el $IrCl(Cp^*)(phbzIm)$ o compuesto de iridio, con una IC_{50} de $16 \mu M$. Se trata de compuestos derivados, respectivamente, de rutenio (II), rodio (III) e iridio (III), tres metales que se han ido ganando protagonismo en la búsqueda de compuestos con propiedades anticancerígenas.³³



5.1 ESTUDIO DEL MECANISMO DE ACCIÓN DEL COMPLEJO DE RUTENIO





Los complejos de rutenio representan una de las clases más prometedoras de agentes anticancerosos con base metálica, situándose la primera evidencia de las propiedades potenciales de un compuesto con esta base en la década de 1970, con el descubrimiento de la actividad anticancerígena del rojo de rutenio. El mecanismo de acción de este tipo de compuestos parece que no se correspondía con la forma clásica de unión al ADN, mostrándose como buenas alternativas al cisplatino.⁷⁹ Con la finalidad de dilucidar el posible mecanismo de acción del compuesto RuCl(cym)(phbzIm) (Fig. 1) investigamos su implicación en diferentes vías de muerte celular.

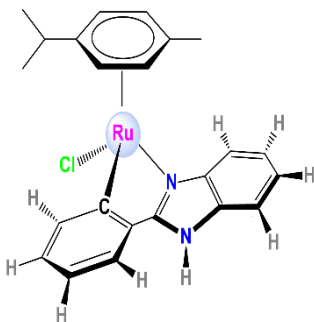


Figura 1. Estructura química del compuesto de rutenio. El complejo RuCl(cym)(phbzIm) con estructura “half-sandwich” presenta como asiento del taburete un ligando areno en forma de grupo cimeno (cym), y como patas del taburete el grupo saliente, Cl, y el ligando quelante, el phbzIm.

5.1.1 Eventos generales

Con la finalidad de aproximarnos al mecanismo de acción desencadenado por este compuesto, decidimos estudiar su efecto sobre tres parámetros bien establecidos en los procesos de muerte celular: la distribución del ciclo celular, la síntesis de proteínas, y los niveles del anión superóxido (O_2^-).

Variaciones en el ciclo celular pueden derivar en la activación de mecanismos de muerte, estando descrito el arresto del ciclo celular como uno de los eventos apoptóticos.⁸⁰ De esta manera, estudiamos el impacto del RuCl(cym)(phbzIm) en el ciclo celular de dos líneas diferentes: A549 y MCF-7. Analizamos el ciclo 24 y 48 h después de haber añadido el tratamiento (25 μ M), usando la tinción de IP y cuantificando los resultados mediante citometría de flujo. Tras 48h, el porcentaje de células A549 tratadas que se encuentran en fase G0/G1 es superior al de las células control, mientras que las células MCF-7 tratadas, tanto a las 24 como a las 48 h, el arresto se produce en la fase

G2/M. (Fig. 2) Esta diferencia puede deberse a que las células MFC-7 carecen de la caspasa 3, cuya inhibición se ha demostrado que provoca el arresto en la fase G2/M.⁸¹ De esta forma obtenemos una alteración en el ciclo celular, característica común en los procesos de muerte celular.

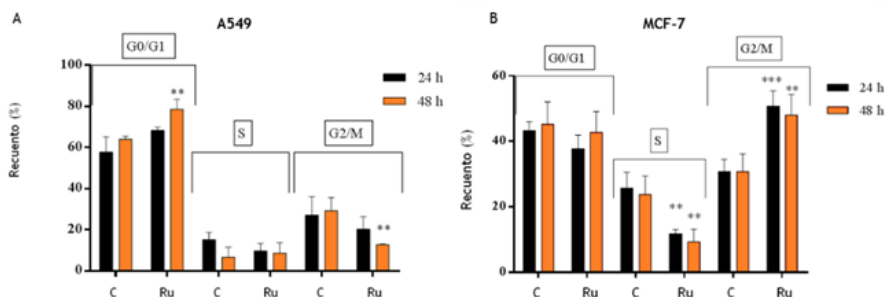


Figura 2. Perturbaciones en el ciclo celular con Ru. Células A549 y MCF-7 fueron tratadas durante 24 y 48 horas con [RuCl(cym)(phbzIm)] a 25 μ M y analizadas por citometría de flujo usando una tinción de yoduro de propidio (IP). Se muestran las distribuciones del ciclo celular con el promedio y SD de al menos tres experimentos independientes (** p < 0,01, *** p < 0,001).

Se ha encontrado que la disminución en la síntesis global de las proteínas puede ocasionarse como respuesta al aumento del estrés en las células, por lo que se evaluó el efecto del RuCl(cym)(phbzIm) (50 μ M), sobre la síntesis de proteínas tras 6 h de tratamiento. Para ello se empleó el *Click-iT OPP Protein Synthesis Assay*, con el que se cuantifica de fluorescencia ligada a proteínas nacientes. Se empleó la cicloheximida (CHX) como control positivo^{82,83} y obtuvimos una ligera inhibición de las células tratadas respecto a las células control, pero no tan marcada como la obtenida con el control positivo (Fig. 3A), por lo que esta inhibición no será el principal efector del mecanismo de muerte desencadenado por el compuesto.

Los niveles de las especies reactivas de oxígeno (ROS) juegan un papel fundamental en el desarrollo del proceso tumoral: por un lado, son indispensables para la proliferación descontrolada de las células, por lo que sus niveles se encuentran elevados respecto a los de las células normales,⁶⁷ pero por otro, una elevación demasiado pronunciada

de los mismos desencadena una respuesta a estrés oxidativo que acaba provocando la muerte. De esta manera, la importancia del mantenimiento de la homeostasis redox en las células tumorales convierte a las ROS en una interesante diana sobre la que actuar. Las células tumorales presentan una capacidad antioxidante mejorada respecto a la de las células normales que mantienen los niveles de ROS por debajo del límite que los convertiría en tóxicos, pero su aumento por la acción de factores exógenos puede superar esta capacidad antioxidante, desencadenando el proceso de muerte celular.^{68,69} Debido a que entre las ROS se encuentra el O_2^- , medimos la capacidad del $RuCl(cym)(phbzIm)$ para elevar sus niveles en la célula. Su generación se midió usando la sonda fluorescente DHE, cuantificándose mediante citometría de flujo tras 4 horas de tratamiento con $RuCl(cym)(phbzIm)$ 50 μM . Se usó el H_2O_2 (200 μM) como control positivo, y obtuvimos que los niveles del O_2^- no sufrían un incremento cuando tratábamos a las células A549 con este complejo (Fig. 3B). De esta manera, con estas aproximaciones iniciales no podemos establecer el mecanismo de muerte desencadenado por este compuesto, por lo que otras posibles vías debían ser exploradas.

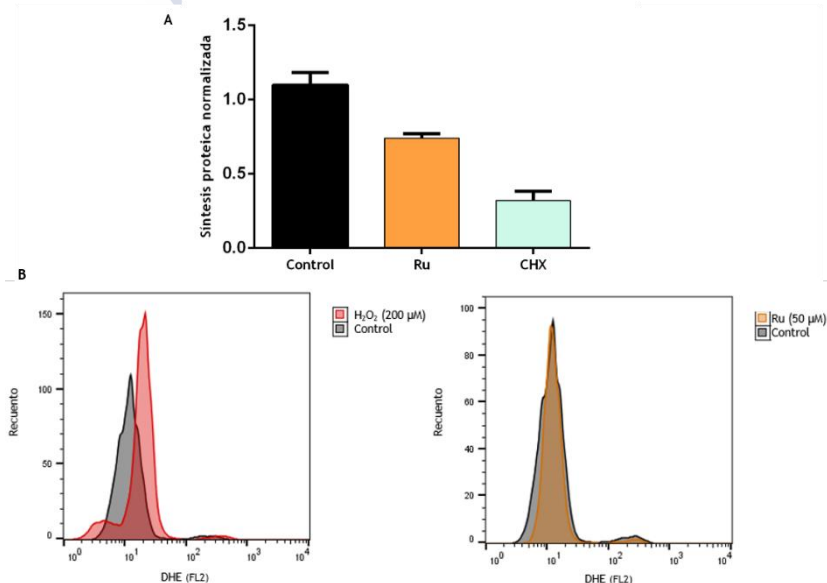


Figura 3. A) Efecto de [RuCl(cym)(phbzIm)] a 50 μM sobre la **síntesis de proteínas** emergentes de células A549 después de 6 horas de tratamiento, medido con *el Kit Click-iT Plus OPP Protein Synthesis Assay* (Invitrogen™). Se usó la cicloheximida (CHX= 500 μM) como control positivo para la inhibición de la síntesis de proteínas. Los datos mostrados se corresponden a las medias y SD de tres experimentos independientes. B) Se analizaron los niveles de **ROS** determinando la intensidad de la fluorescencia de células A549 se determinó usando citometría de flujo basada en fluorescencia. El DHE (0,5 μM) estaba presente en el medio para detectar los niveles intracelulares del ion superóxido, habiéndose tratado las células con el control positivo de peróxido de hidrógeno a 200 μM (H_2O_2) (derecha) o [RuCl(cym)(phbzIm)] (izquierda) a 50 μM durante 4 horas. Los perfiles mostrados son representativos de al menos tres experimentos independientes. No se detectaron variaciones en los niveles de ROS.

5.1.2 Ferroptosis y necroptosis

Dos procesos de muerte celular programada que pueden tener lugar en las células son la ferroptosis y la necroptosis, por lo que se exploró si el mecanismo de RuCl(cym)(phbzIm) estaba ligado a alguno de ellos. Se emplearon una serie de compuestos inhibidores de diferentes partes de estas vías que nos podrían dar una idea de su implicación.

Estos procesos ayudaron a esclarecer dos principios básicos claves en la determinación de las dianas para el tratamiento de enfermedades: que la muerte celular programada no se limita solamente a la apoptosis, y que las vías de muerte celular pueden estar conectadas. La necroptosis se trata de una muerte celular necrótica regulada⁸⁴ caracterizada por una granulación citoplasmática e hinchazón celular que culminan en la fuga del contenido intracelular de la célula. Este mecanismo de muerte está inducido por el factor de necrosis tumoral (TNF) (Fig. 4) que, dependiendo de las condiciones, también puede inducir la apoptosis. Conlleva la activación de la proteína que interactúa con el receptor de serina-treonina quinasa 1 (RIP1).⁸⁵ Este mecanismo está inhibido por una serie de moléculas que se han ido empleando para investigar el papel de la necroptosis en numerosas fisiopatologías, y en este trabajo hemos seleccionado tres: la necrostatina-1 (nec-1), la necrosulfonamida (NSA) y el hidroxianisol butilado (BHA). Se ha probado que el receptor que interactúa con la serina/treonina-proteína quinasa 1 (RIPK1), juega un papel clave en el proceso necroptótico, tratándose la nec-1 de un inhibidor del mismo, por lo que su uso será específico del estudio de

esta vía. Además, la formación del necrosoma consecuente de la vía iniciada por el TNF es un paso clave en este mecanismo de acción, ocurriendo a través de la asociación de RIPK1 y RIPK3, quedando activada esta última, siendo así capaz de fosforilar a la pseudoquinasa de linaje mixto (MLKL), activándola y desencadenando la necroptosis. Aquí se sitúa el efecto de otro de los inhibidores que hemos seleccionado, la NSA, que consigue prevenir la translocación de la membrana de (MLKL) deteniendo la necroptosis.⁸⁶ Por último, el antioxidante BHA se ha mostrado que inhibe eficazmente la muerte celular necrótica por TNF, completando con él los inhibidores empleados (Fig. 4).^{85,87}

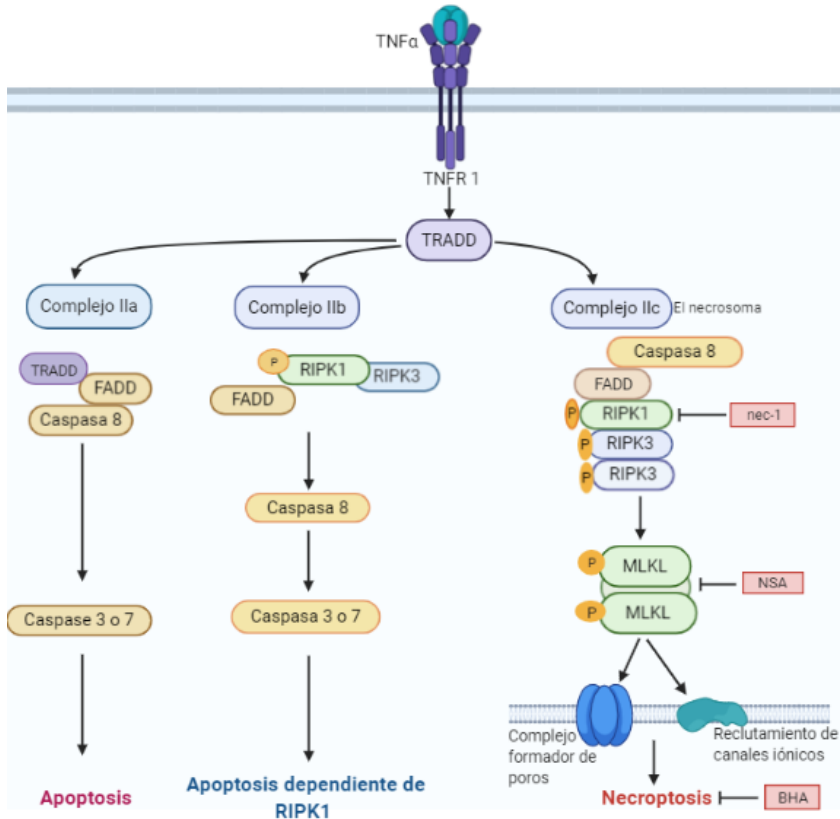


Figura 4. Cadena de señalización desencadenada por la activación de TNFR. La unión del factor de necrosis tumoral (TNF) a su receptor desencadena el ensamblaje del complejo I, donde se encuentra el dominio de muerte asociado a TNFR1 (TRADD). Se pueden formar tres complejos citosólicos dependiendo de las condiciones de la

célula: el complejo IIa, donde la interacción entre TRADD y el dominio de muerte asociado a FAS (FADD) conduce a la activación de caspasa 8 y termina desencadenando la apoptosis; el complejo IIb favorece la apoptosis dependiente de RIPK1, constando de RIPK1, RIPK3 y FADD; el complejo IIc implica la asociación de RIPK1 y RIPK3 seguida de una serie de eventos de autofosforilación y transfosforilación de RIPK1 y RIPK3, reclutando esta última a la proteína similar al dominio quinasa de linaje mixto (MLKL), lo que conduce a la formación de un complejo proteico supramolecular en la membrana plasmática y termina produciendo la necroptosis. El inhibidor nec-1 activa selectivamente sobre RIPK1, mientras que NSA lo hace sobre MLKL,^{84,86,87} y BHA es un captador de ROS que funciona como una molécula antinecrotótica debido a que la activación de TNF induce producción de ROS.⁸⁷ Imagen creada en BioRender.com.

Células A549 fueron tratadas durante 1 hora con los inhibidores BHA (100 μ M), nec-1 (20 μ M) y NSA (5 μ M), y tratadas posteriormente con RuCl(cym)(phbzIm) (50 μ M). Su viabilidad se determinó mediante el ensayo del MTT. Se empleó el erastin⁸⁸ (5 μ M) como control positivo, y en la Fig. 5 podemos ver que no se ha obtenido ninguna diferencia entre las células tratadas previamente con los inhibidores frente a otras sin tratar, por lo que se descartaría que el mecanismo de muerte desencadenado por el compuesto de rutenio sea la necroptosis.

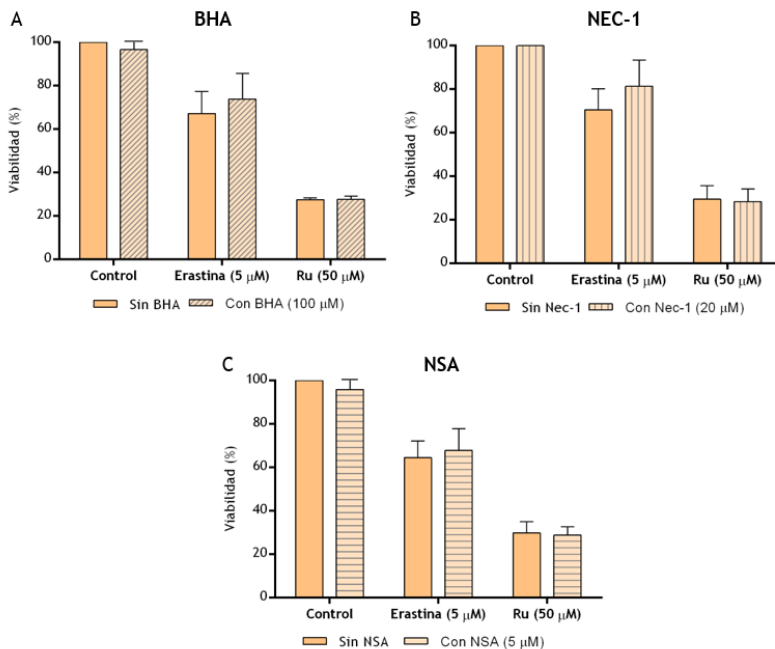


Figura 5. Células A549 se trataron durante 1 h con BHA (100 μM) (A), nec-1 (20 μM) (B) y NSA (5 μM) (C), inhibidores de la **necroptosis**, y tratadas a continuación con [RuCl(cym)(phbzIm)] (50 μM) durante 24 h. Se usó el erastin (5 μM) como control positivo. La viabilidad se determinó mediante el ensayo MTT 24 h después. Los datos mostrados se corresponden a las medias y SD de tres experimentos independientes. No se observa ningún efecto sobre la acción del compuesto de rutenio.

La ferroptosis es otro mecanismo de muerte celular programada, en este caso dependiente de hierro, identificado por el Dr. Brent R. Stockwell en el año 2012.⁸⁹ Se inicia por el agotamiento del glutatión (GSH) o la inactivación de la actividad de la glutatión peroxidasa (GPX4). La presencia de hierro libre es indispensable en el proceso, siendo la acumulación de peroxidación lipídica la principal efectora del proceso ferroptótico, por lo que los antioxidantes lipofílicos y los quelantes de hierro pueden prevenir este tipo de muerte.^{90,91} Se seleccionaron 5 inhibidores dirigidos a distintas partes de la ruta para tratar de definir si el compuesto de rutenio veía mermado su efecto. Estos fueron la ferrostatina 1 (fer-1), un antioxidante lipofílico que atrapa radicales peroxilo; la BHA, otra molécula antioxidante; el ácido nordihidroguaiarético (NDGA), un antioxidante que actúa como inhibidor de lipoxigenasas (LOX);⁹¹ UO126, inhibidor de MEK1, que actúa como inhibidor de este tipo de muerte porque la vía RAS-RAF-MEK determina la sensibilidad que presentan las células a la misma, y la deferoxamina (DFO), un agente quelante de hierro libre.⁸⁸ En la Fig. 6 se muestra el efecto específico que produce cada uno de ellos en el mecanismo de ferroptosis.

Para investigar este mecanismo de muerte con el RuCl(cym)(phbzIm), se emplearon células HEK293. El motivo por el cual se cambió de línea celular es que las células A549 no se presentan como un modelo adecuado para estudiar la ferroptosis, debido a que presentan una expresión constitutiva del factor 2 relacionado con NF-E2 (Nrf2), el principal regulador de la ferroptosis.⁹² Se trataron las células con los inhibidores durante 1 h: BHA (100 μM), DFO (5 μM), fer-1 (40 μM), NSA (5 μM), NDGA (5 μM) y UO126 (10 μM); se empleó el erastin⁸⁸ (5 μM), como control positivo. Tras este tratamiento, se añadió RuCl(cym)(phbzIm) (50 μM) durante 24 h, determinándose la viabilidad celular mediante el ensayo MTT. Como se observa en la Fig.

7, no se obtuvo ningún efecto significativo si comparamos las células tratadas previamente con estos inhibidores frente a las células tratadas solamente con RuCl(cym)(phbzIm), por lo que no parece que el mecanismo de muerte que desencadene sea la ferroptosis.

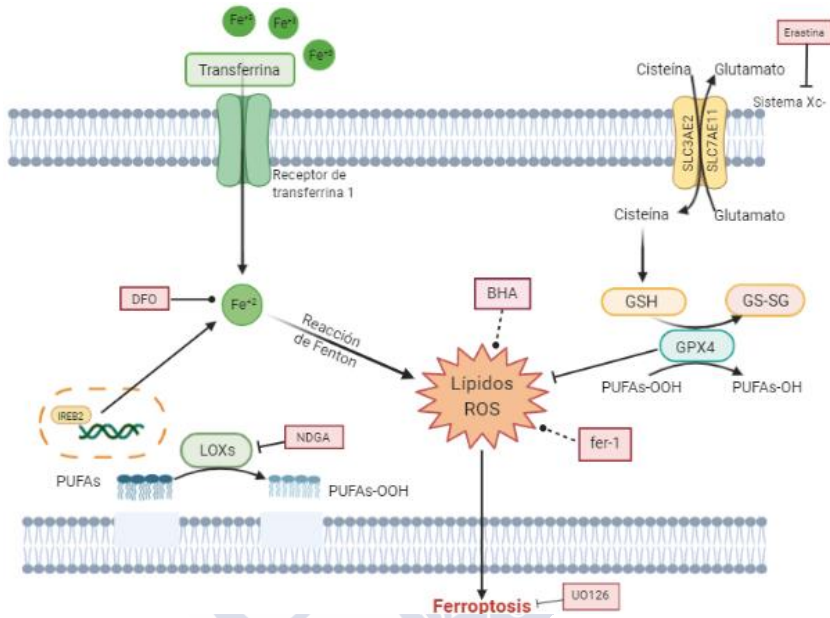


Figura 6. Vías que controlan la ferroptosis. Dos mecanismos principales regulan este proceso de muerte: su activación tiene lugar por la presencia de hierro libre, mientras que se inhibe a través del fosfolípido glutatión peroxidasa 4 (GPX4). La activación de GPX4 ocurre cuando la cisteína se encuentra disponible, convirtiendo ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) potencialmente tóxicos (PUFAs-OOH) en ácidos grasos poliinsaturados no tóxicos (PUFAs-OH). Las lipoxigenasas (LOXs) son las responsables de la formación de estos (PUFAs-OOH), siendo la NDGA una inhibidora de las mismas. En cuanto a la regulación del hierro libre, son múltiples los factores que intervienen, destacando la transferrina y el regulador principal del metabolismo del hierro (IREBP2); la transferrina (TF) es una proteína sérica que se une al hierro y que se transporta a la célula mediante endocitosis mediada por TfR1, siendo un factor esencial para la inducción de la ferroptosis, ya que el Fe²⁺ está libre para la reacción de Fenton, inductora de la ferroptosis; la DFO es un agente quelante del Fe, y la BHA y fer-1 agentes antioxidantes que atraen radicales peroxilo. Dado que la sensibilidad a la ferroptosis podría estar determinada por la vía RAS-RAF-MEK, U0126, inhibidor de MEK1, inhibe este proceso de muerte.^{88,90,91,93} Imagen creada en BioRender.com.

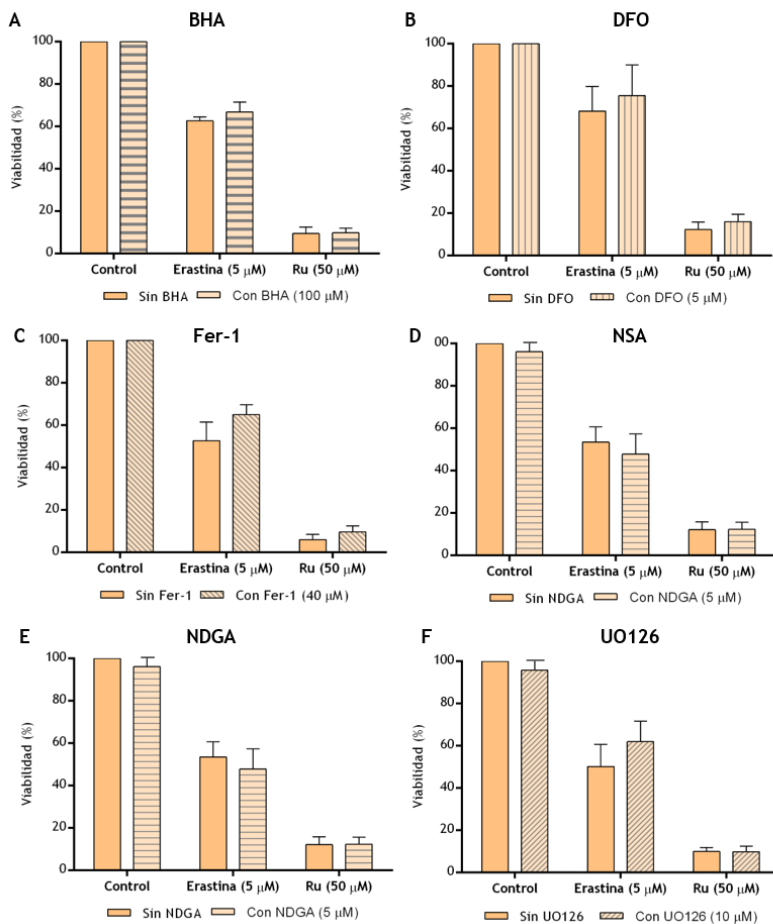


Figura 7. Células HEK293 se trataron durante 1 h con BHA (100 μ M) (A), DFO (5 μ M) (B), Fer-1 (40 μ M) (C), NDGA (5 μ M) (D) y UO126 (10 μ M) (E), inhibidores de la **ferroptosis**, y tratadas a continuación con [RuCl(cym)(phbzIm)] (50 μ M) durante 24 h. Se usó el erastin (5 μ M) como control positivo. La viabilidad se determinó mediante el ensayo MTT 24 h después. Los datos mostrados se corresponden a las medias y SD de tres experimentos independientes. No se observa ningún efecto sobre la acción del compuesto de rutenio.

5.1.3 Respuesta a estrés de retículo endoplásmico

La apoptosis es una forma de muerte celular programada que se inicia por una variedad de perturbaciones celulares, entre las que encontramos daños en el ADN, estrés del retículo endoplásmico (RE) o niveles de ROS elevados.

Debido a que el estrés al RE puede ser el mecanismo que desencadene la apoptosis, decidimos estudiar si la perturbación en los mecanismos que lo regulan generaba algún cambio al tratar a las células con RuCl(cym)(phbzIm). El RE es el orgánulo responsable de la correcta translocación de proteínas, su plegamiento y las modificaciones post- traduccionales que le permiten su transporte al aparato de Golgi y finalmente a vesículas para su secreción o exhibición en la superficie del plasma.⁹⁴ Perturbaciones en estas funciones, conocidas como el estrés del RE, desencadena la respuesta a proteínas desplegadas (UPR, por sus siglas en inglés), que es un mecanismo altamente conservado que permite a la célula responder y resolver este estrés. La UPR está desencadenada por la acción de tres proteínas de señalización: IRE1 α (proteína que requiere inositol-1 α), PERK (proteína quinasa ARN como-PKR) y ATF6 (factor de transcripción activador 6), cuya activación induce eventos de transducción de señales que alivian la acumulación de proteínas mal plegadas en el RE, inhibiéndose la entrada de proteínas en el mismo al detener la traducción del ARNm y estimulando el transporte de las proteínas mal plegadas al citosol para su ubiquitinización y destrucción. El estudio de los niveles de alguna de estas proteínas podría indicarnos si este mecanismo se ve activado por la acción del rutenio, por lo que se decidió estudiar el ATF6,⁹⁴⁻⁹⁶ para ello, células HEK293 fueron transfectadas con el plásmido p5xATF6-GL3 y posteriormente se trataron con RuCl(cym)(phbzIm) (50 μ M) durante 2,4 y 6 horas. Se empleó la tunicamicina⁹⁷ (1,2 μ M) como control positivo, y la actividad de dicho gen se determinó midiendo la fluorescencia. Observamos que tras 2 h de tratamiento se produce una fuerte elevación en los niveles de ATF6 (Fig. 8), por lo que el RuCl(cym)(phbzIm) podría estar activando esta vía de forma temprana.

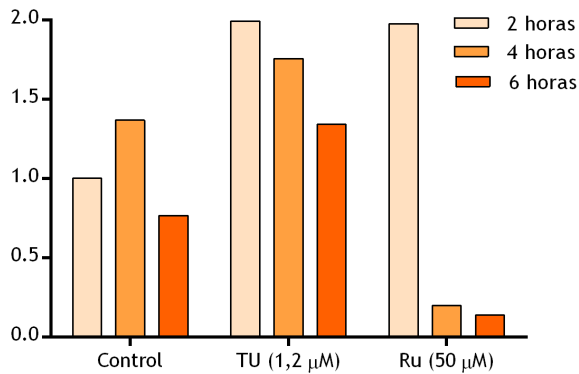


Figura 8. Cuantificación de ATF6. Las células HEK293 fueron transfectadas con el plásmido p5xATF6-GL3, empleando el reactivo de transfección Dreamfect™ Gold (OZ Bioscience). Posteriormente se trataron con [RuCl(cym)(phbzIm)] (50 μM) durante 2,4 y 6 horas. Se empleó la tunicamicina (1,2 μM) como control positivo. La actividad de dicho gen se determinó midiendo la fluorescencia a 488 nm. Los resultados se expresaron comparándolos con los valores obtenidos en el control de 2 horas. Se observa una marcada elevación en los niveles de ATF6 después de 2 h de tratamiento.

Para comprobar si la sobreexpresión de este factor de transcripción terminaba desencadenando la respuesta apoptótica, o bien el estrés producido por este tratamiento era contrarrestado, se decidió investigar otro factor que nos encontramos más adelante en esta vía: el gen proapoptótico CHOP. El ATF6 activado se traslada al Golgi, donde se escinde, translocándose el fragmento resultante al núcleo, donde inicia la expresión de una serie de genes diana, como chaperonas, genes implicados en la degradación asociada al RE (ERAD) y CHOP (Fig. 9).⁹⁸⁻¹⁰⁰

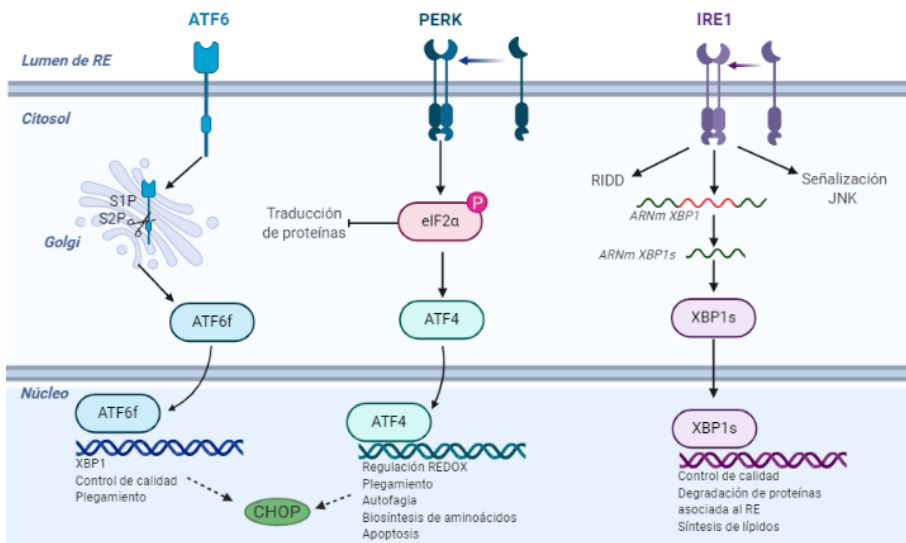


Figura 9. Respuesta a estrés del retículo endoplásmico. La cascada de señalización de respuesta a proteínas mal plegadas (UPR) está mediada por tres sensores del estrés del RE: IRE1, PERK y ATF6. IRE1 se dimeriza y autofosforila, activándose para su actividad endoribonucleasa en el citosol: procesa el ARNm que codifica para el factor de transcripción XBP1, que regulará genes relacionados con el control de calidad, plegamiento de proteínas y degradación asociada al estrés de RE. IRE1 también degrada ciertos ARNm (RIDD). La activación de PERK disminuye el ratio de la síntesis de proteínas a través de la fosforilación del factor de traducción eIF2 α , incrementando la traducción del ARNm que codifica para el factor de transcripción ATF4, que induce la expresión de genes relacionados con el metabolismo de aa, respuestas antioxidantes, apoptosis, autofagia... ATF6 codifica para un factor de transcripción en su dominio citosólico que se localiza en el RE, pero tras la inducción del estrés, se procesa en el aparato de Golgi, liberando su dominio citosólico que se translocará al núcleo donde aumenta la expresión de chaperonas del RE, control de calidad, XBP1. La regulación transcripcional del promotor CHOP ocurre tanto a través de la ruta de PERK como de ATF6. Imagen creada en BioRender.com.

Para determinar la activación de CHOP, se transfectaron células HEK293 con el plásmido CHOP:GFP, y se trataron con RuCl(cym)(phbzIm) (50 μ M), añadiendo la tunicamicina (0,5 μ M) como control positivo. La activación de este gen se monitorizó mediante microscopía de fluorescencia empleando la técnica time-lapse (vídeo_1_C; vídeo_2_TU; vídeo_3_Ru). Mientras que la activación de CHOP (señal verde) al tratar a las células con TU (vídeo_2_TU) comenzaba a aparecer 2 h después de haberlas tratado, y se siguió

detectando 24 h después, con el tratamiento de rutenio no se detectó ninguna activación (Fig. 10). En cambio, mediante la tinción con IP, pudimos observar que las células sí se estaban muriendo (señal roja). De esta manera, esta parece que tampoco es la vía desencadenada por el RuCl(cym)(phbzIm) para producir la muerte celular.

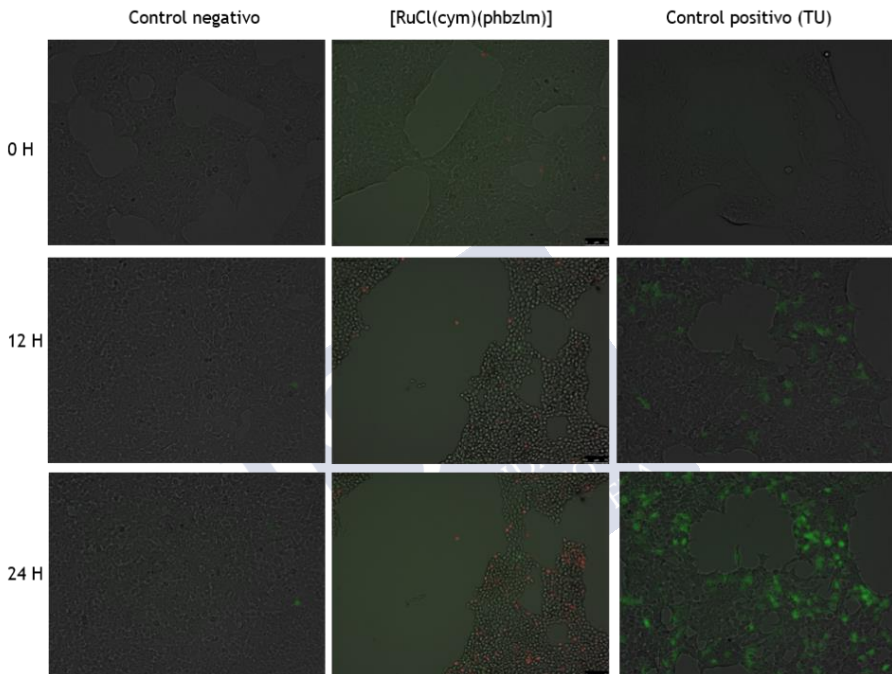


Figura 10. Detección de CHOP. Las células HEK293 fueron transfectadas con el plásmido CHOP:GFP, empleando el reactivo de transfección Dreamfect™ Gold (OZ Bioscience). Posteriormente se trataron con [RuCl(cym)(phbzIm)] (50 μ M). Se empleó la tunicamicina (0,5 μ M) como control positivo. Las células se tiñeron con IP (1 μ g/ml) para detectar si hay muerte (señal roja). La actividad de dicho gen (señal verde) se monitorizó mediante microscopía de fluorescencia. La emisión de verde fluorescente indica la activación del gen, que no se detectó en las células tratadas con el complejo.

Después de todas estas aproximaciones no llegamos a definir el principal mecanismo de muerte desencadenado por RuCl(cym)(phbzIm).



5.2 ESTUDIO DEL MECANISMO DE ACCIÓN DEL COMPLEJO DE RODIO





La primera mención de las propiedades antitumorales de un complejo de rodio (III), $\text{RhCl}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, data del año 1953, más de una década antes del descubrimiento de la actividad del cisplatino, pero hasta el inicio del siglo XX no se comenzaron a estudiar de manera sistemática los efectos citotóxicos y mecanismo de acción de esta clase de complejos.¹⁰¹ Las mayores contribuciones a este campo se han llevado a cabo por el grupo de Sadler, mostrándose mecanismos de acción que pueden resultar de interés en el tratamiento de cáncer.¹⁰² Investigamos el posible mecanismo de acción desencadenado por el compuesto $\text{RhCl}(\text{Cp}^*)(\text{phbzIm})$ (Fig. 11) con la finalidad de definir si se presenta como una buena alternativa a los tratamientos actuales con los que están surgiendo resistencias, y para ello lo primero que hacemos son una serie de medidas del estado general en el que se encuentran las células una vez que se tratan con este compuesto.

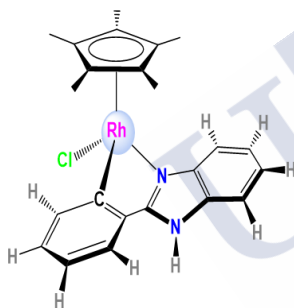


Figura 11. Estructura química del compuesto de rodio. El complejo $\text{RhCl}(\text{Cp}^*)(\text{phbzIm})$ con estructura “half-sandwich” presenta como asiento del taburete un ligando areno ciclopentadieno (Cp^*), y como patas del taburete el grupo saliente, Cl, y el ligando quelante, el phbzIm .

5.2.1 Eventos generales

Los efectos que pueda provocar este tratamiento sobre las células pueden ocasionar una modificación de su ciclo celular, lo que nos estaría indicando que los requerimientos metabólicos necesarios para su proliferación normal se encuentran alterados. Para comprobarlo, células A549 fueron tratadas durante 24 h con una concentración de $43 \mu\text{M}$ del $\text{RhCl}(\text{Cp}^*)(\text{phbzIm})$, tras lo que se fijaron y se midió su distribución en las distintas fases del ciclo celular a través de citometría de flujo. Se obtuvo que en las células tratadas se producía un arresto en la fase G_0/G_1 (Fig. 12), lo que podría indicarnos que las células no son capaces de generar la energía necesaria requerida para su correcta proliferación. Numerosos estudios indican que una característica

habitual del proceso apoptótico es el arresto del ciclo celular.⁸⁰ En este proceso de muerte programada se suele producir también daño en el ADN,^{103,104} habitualmente relacionado con una elevación en los niveles de ROS, por lo que estos parámetros fueron cuantificados. El daño en el ADN se midió en células A549 tratadas con RhCl(Cp*)(phbzIm) (43 μ M) durante 4 h, tras lo que se extrajo el ADN de las mismas mediante el kit *NucleoSpin Tissue* (Macherey-Nagel), y se cuantificó el daño en el ADN mediante el kit *EpiQuik 8-OHdG* (Epigentek). Esta técnica se basa en cuantificar colorimétricamente los niveles de 8-OHdG, un derivado oxidado de la desoxiguanosina generado por radicales hidroxilos en el ADN celular, por lo que se considera un marcador sensible del daño oxidativo del ADN.¹⁰⁵ Se usó el H₂O₂ (200 μ M) como control positivo, con el que se obtuvieron unos niveles de daño en el ADN muy elevados, mientras que en las células tratadas con RhCl(Cp*)(phbzIm) no se observó un incremento significativo del mismo respecto a las células sin tratar (Fig. 13B).

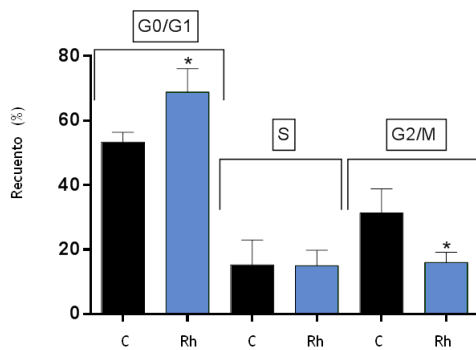


Figura 12. Distribución del ciclo celular. Células A549 fueron tratadas durante 24 horas con [RhCl(Cp*)(phbzIm)] a 43 μ M y analizadas por citometría de flujo usando una tinción de yoduro de propidio (IP). Se muestran las distribuciones del ciclo celular con el promedio y SD de al menos tres experimentos independientes (* $p < 0,05$).

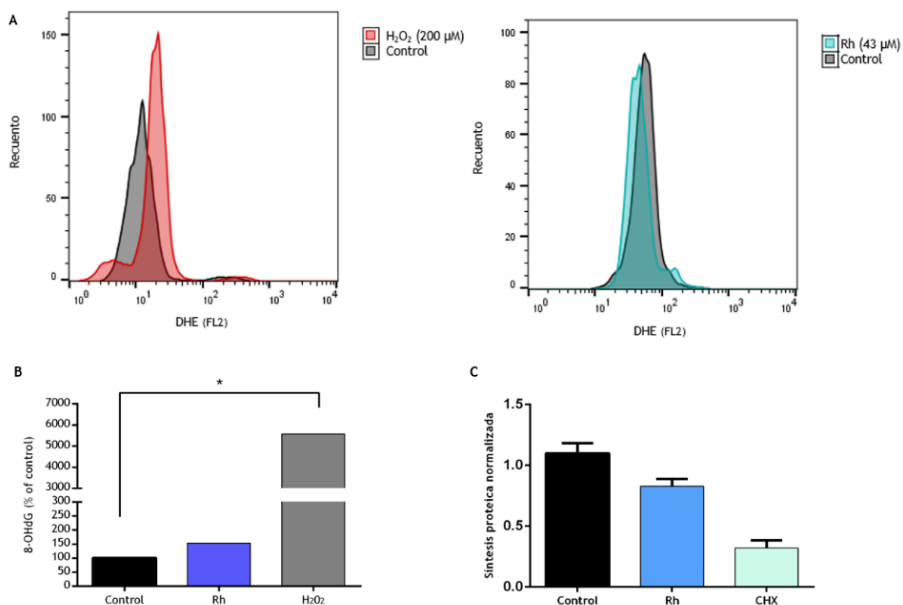


Figura 13. A) Cuantificación de los niveles de O_2^- . La intensidad de la fluorescencia de células A549 se determinó usando citometría de flujo basada en fluorescencia. El DHE ($0,5 \mu M$) estaba presente en el medio para detectar los niveles intracelulares del O_2^- , habiéndose tratado las bacterias con el control positivo de peróxido de hidrógeno a $200 \mu M$ (H_2O_2) (izquierda) o $[RhCl(Cp^*)(phbzIm)]$ a $43 \mu M$ (derecha) durante 4 horas. Los perfiles mostrados son representativos de al menos tres experimentos independientes. **B) Determinación del daño en el ADN.** Se cuantificó el daño directo sobre el ADN provocado por el tratamiento con el complejo $[RhCl(Cp^*)(phbzIm)]$ ($43 \mu M$) en células A549 tratadas durante 4 horas, mediante el Kit *EpiQuik 8-OHdG DNA Damage Quantification Direct* (Epigentek). Se trata de un ensayo colorimétrico mediante el que se detectan los niveles de 8-OHdG, marcador del daño oxidativo del ADN. Se usó el peróxido de hidrógeno ($H_2O_2= 200 \mu M$) como control positivo. (* $p < 0,01$). **C) Observación del estado de síntesis de proteínas.** Efecto del complejo $[RhCl(Cp^*)(phbzIm)]$ ($43 \mu M$) sobre la síntesis de proteínas emergentes de células A549 después de 6 horas de tratamiento, medido con el Kit *Click-iT Plus OPP Protein Synthesis Assay* (Invitrogen™). Se usó la cicloheximida (CHX= $500 \mu M$) como control positivo para la inhibición de la síntesis de proteínas.

Otra característica habitual que encontramos en los procesos de muerte celular son niveles elevados de ROS, que pueden desencadenarla cuando pasan cierto umbral, elevado en las células cancerígenas respecto a las células normales.^{68,69} Se comprobaron los niveles del anión O_2^- en células A549 tratadas con $RhCl(Cp^*)(phbzIm)$ ($43 \mu M$) durante 4 h, añadiendo en el medio DHE ($0,5 \mu M$), que sirve para

cuantificar los niveles de esta ROS, midiéndose la fluorescencia a través de citometría de flujo. Se usó el H_2O_2 (200 μM) como control positivo. No se obtuvo ninguna elevación en los niveles del O_2^- en las células tratadas en comparación con las células sin tratar (Fig. 13A), coincidiendo este resultado con la ausencia de daño en el ADN (Fig. 13B), por lo que se tienen que seguir investigando otros marcadores de muerte que nos den más pistas acerca del mecanismo desencadenado por este compuesto. Es por ello que se determinó si la síntesis de nuevas proteínas se encontraba inhibida al tratar a las células con este complejo, siendo este otro signo del estrés al que son sometidas. Se trataron células A549 durante 6 h con $\text{RhCl}(\text{Cp}^*)(\text{phbzIm})$ (43 μM) y con el *Click-iT OPP Protein Synthesis Assay*, se cuantificó de fluorescencia ligada a proteínas nacientes. Se empleó la cicloheximida (CHX) como control positivo.^{82,83} No se obtuvo una inhibición marcada en la síntesis de proteínas de las células tratadas respecto a las células control (Fig. 13C), por lo que se necesitan explorar nuevas vías.

5.2.2 Respuesta al estrés de retículo endoplásmico

Se investigaron más eventos que pueden ser los desencadenantes de la apoptosis, un tipo de muerte celular programada. Entre ellos encontramos el estrés del RE, que activa la vía de respuesta a proteínas mal plegadas (UPR). Al final de la misma se encuentra la activación del factor de transcripción proapoptótico CHOP (Fig. 9),⁹⁹ por lo que se decidió estudiar la activación de dicho gen cuando tratamos a las células con $\text{RhCl}(\text{Cp}^*)(\text{phbzIm})$ y ver si estaba implicado en su mecanismo de muerte. Para ello, se transfectaron células HEK293 con el plásmido CHOP::GFP, y se trataron con $\text{RhCl}(\text{Cp}^*)(\text{phbzIm})$ (29 μM). Se empleó la tunicamicina (0,5 μM) como control positivo, y la activación de este gen se monitorizó mediante microscopía de fluorescencia empleando la técnica time-lapse (vídeo_1_C; vídeo_2_TU; vídeo_4_Rh). La activación de CHOP (señal verde) al tratar a las células con TU (vídeo_2_TU) comenzó a aparecer 2 h después de haberlas tratado, y se siguió detectando 24 h después; con el tratamiento de $\text{RhCl}(\text{Cp}^*)(\text{phbzIm})$ se detectó también una activación a las 2-3 h de tratamiento (vídeo_4_Rh), continuando a las 24 h. (Fig. 14). De esta

manera, este factor podría estar desencadenando la apoptosis en las células tratadas con $\text{RhCl}(\text{Cp}^*)(\text{phbzIm})$, pero son necesarios más experimentos para corroborar que se trata del mecanismo principal.

Por otro lado, cuando la activación de CHOP ocurre a través de la repuesta a estrés del RE, puede tener lugar mediante dos vías diferentes: PERK y ATF6 (Fig. 9),^{96,100} y se estudió cuál de ellas sería la que se activa principalmente con $\text{RhCl}(\text{Cp}^*)(\text{phbzIm})$. Para ello, células HEK293 fueron transfectadas con el plásmido p5xATF6-GL3 y posteriormente se trataron con $\text{RhCl}(\text{Cp}^*)(\text{phbzIm})$ ($43 \mu\text{M}$) durante 2,4 y 6 horas. Se empleó la tunicamicina ($1,2 \mu\text{M}$) como control positivo,⁹⁷ y la actividad de dicho gen se determinó midiendo la fluorescencia. Se obtuvo que los niveles de este gen, en lugar de verse aumentados en las células tratadas con $\text{RhCl}(\text{Cp}^*)(\text{phbzIm})$, se veían disminuidos respecto a los niveles de las células sin tratar (Fig. 15). De esta manera, la vía responsable de la activación de CHOP que se había observado (Fig. 14) debe ser la de PERK (Fig. 9).

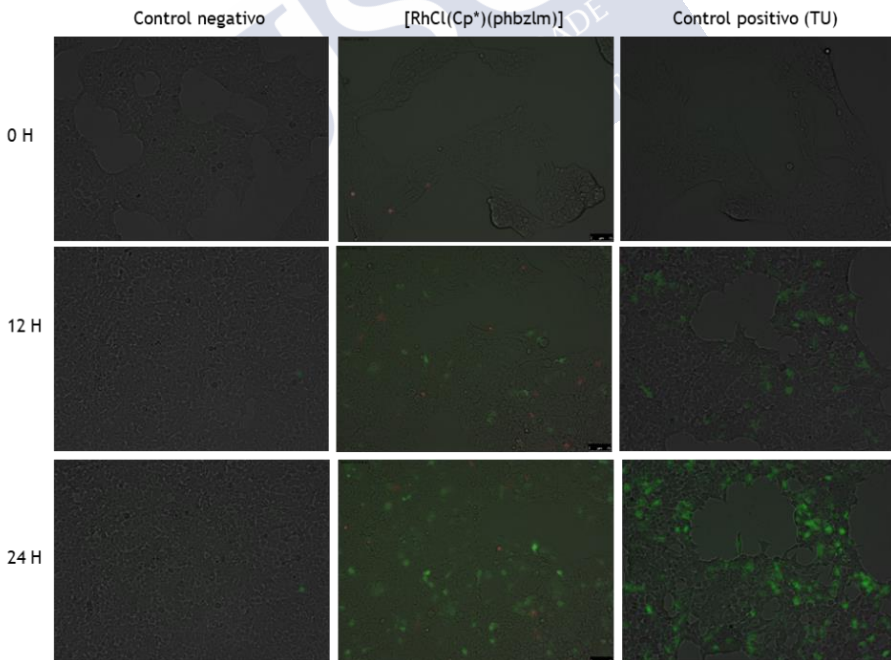


Figura 14. Visualización de la activación de CHOP. Las células HEK293 fueron transfectadas con el plásmido CHOP:GFP, empleando el reactivo de transfección

Dreamfect™ Gold (OZ Bioscience). Posteriormente se trataron con [RhCl(Cp*)(phbzIm)] (29 μM). Se empleó la tunicamicina (0,5 μM) como control positivo. Las células se tiñeron con IP (1 μg/ml) para detectar si hay muerte (señal roja). La actividad de dicho gen (señal verde) se monitorizó mediante microscopía de fluorescencia. La emisión de verde fluorescente indica la activación del gen, que no se detectó en las células tratadas con el complejo.

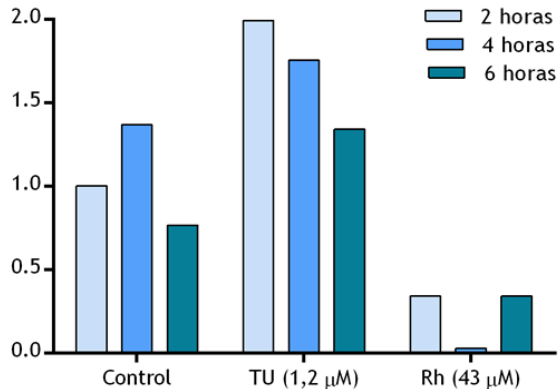


Figura 15. Cuantificación de ATF6. Las células HEK293 fueron transfectadas con el plásmido p5xATF6-GL3, empleando el reactivo de transfección Dreamfect™ Gold (OZ Bioscience). Posteriormente se trataron con [RhCl(Cp*)(phbzIm)] (43 μM) durante 2, 4 y 6 horas. Se empleó la tunicamicina (1,2 μM) como control positivo. La actividad de dicho gen se determinó midiendo la fluorescencia a 488 nm. Los resultados se expresaron comparándolos con los valores obtenidos en el control de 2 horas.

5.2.3 Exploración de otras vías

Con la activación de CHOP se ha visto que la respuesta a proteínas mal plegadas (UPR) se había activado, por lo que se decidieron explorar modificaciones que pudieran afectar a las proteínas y que desencadenasen esta respuesta. Para ello se emplearon agentes que pueden afectar al proceso de plegamiento de las proteínas, alterándolas. En el proceso de plegamiento tienen un papel fundamental la formación de puentes disulfuro entre cisteínas específicas, por lo que la oxidación generalizada de tioles libres le afectaría.

El β-mercaptoetanol es un antioxidante que actúa como catalizador durante el proceso de reorganización de las proteínas, permitiendo la conversión de las especies con tres puentes disulfuro de la proteína a la

conformación nativa. Reduce sus puentes disulfuro. Se trataron células A549 con RhCl(Cp^{*})(phbzIm) (43 μ M) solo o en combinación con β -mercaptoetanol (25 μ M), y mediante el ensayo del MTT se midió su viabilidad a las 24 y 48 h, obteniéndose un rescate parcial cuando se combinan ambos compuestos (Fig. 16b). Se tomaron fotografías después de 6 h de tratamiento, tiñéndose las células con Hoechts e IP, y se observa una menor mortalidad cuando el compuesto de rodio se combina con el β -mercaptoetanol (Fig. 16a). De esta manera, el RhCl(Cp^{*})(phbzIm) podría estar actuando sobre la oxidación de grupos tiol en las proteínas.

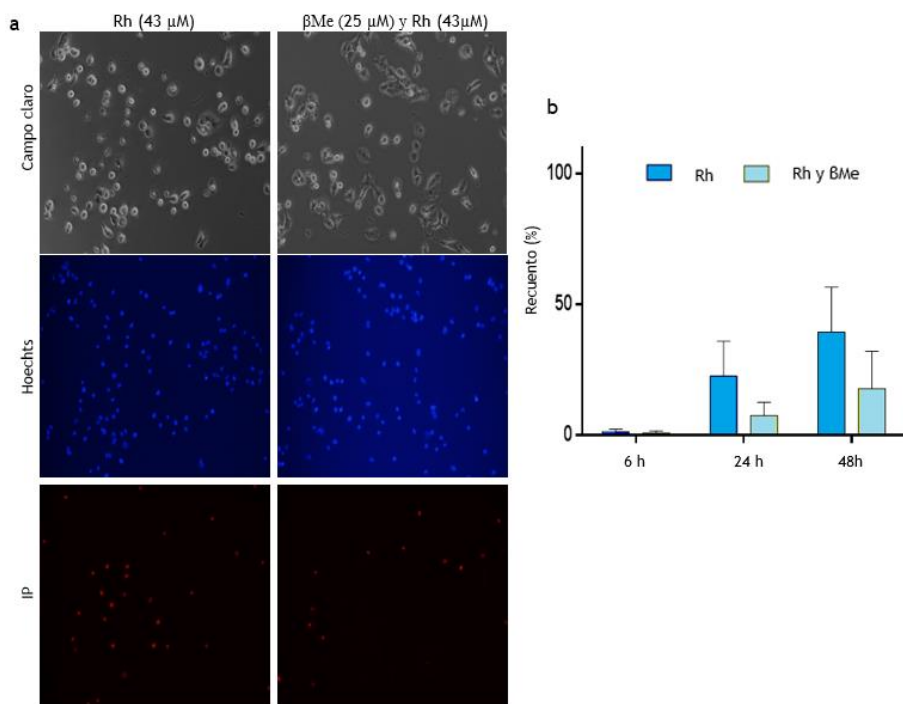


Figura 16. Células A549 fueron tratadas con el complejo de [RhCl(Cp^{*})(phbzIm)]: 43 μ M solo o en combinación con β -mercaptoetanol: 25 μ M. **a)** Imágenes representativas de células A549 tratadas durante 6 h y teñidas con Hoechts (1 μ g/ml) e IP (1 μ g/ml). Se observa menor mortalidad en las células tratadas con la combinación de los compuestos, rescatando parcialmente el β -mercaptoetanol el efecto del rodio. **b)** Viabilidad de células A549 tratadas durante 6, 24 y 48 h. Se determinó mediante el ensayo del MTT 24 h después. Los datos mostrados se corresponden a las medias y SD de tres experimentos independientes. Se observa un rescate parcial a las 24 y 48 h.

Se trataron células A549 simultáneamente con $\text{RhCl}(\text{Cp}^*)(\text{phbzIm})$ ($64 \mu\text{M}$) y 4-Dithiothreitol (DTT) ($0,5 \text{ mM}$), o sin combinar, durante 24h. Se tomaron fotografías después de 6 h de tratamiento y se pudo comprobar cómo se rescata la morfología normal (Fig. 17a), y mediante el ensayo MTT se midió su viabilidad, que también se ve incrementada (Fig. 17b), rescatando de esta manera parcialmente el DTT el efecto producido por $\text{RhCl}(\text{Cp}^*)(\text{phbzIm})$ tal y como ocurría cuando se combinó con el β -mercaptoetanol.

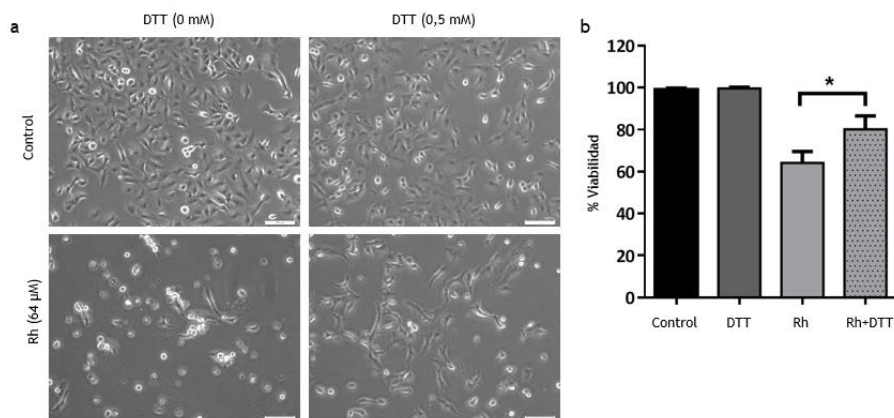


Figura 17. Células A549 fueron tratadas simultáneamente con $[\text{RhCl}(\text{Cp}^*)(\text{phbzIm})]$: $64 \mu\text{M}$ y ,4-Dithiothreitol (DTT): $0,5 \text{ mM}$, o sin combinar, durante 24h. a) Se muestran imágenes representativas tomadas con el microscopio de fluorescencia Olympus IX5. b) La viabilidad se determinó mediante en el ensayo MTT 24 h después del tratamiento. Los datos mostrados se corresponden a las medias y SD de tres experimentos independientes. (* $p < 0,01$). Se observa que el DTT rescata parcialmente el efecto producido por el rodio.

De esta manera, parece que cuando las células se tratan con $\text{RhCl}(\text{Cp}^*)(\text{phbzIm})$ sufren un aumento en la oxidación de los grupos tioles de las proteínas, lo que juega un papel crítico en el plegamiento de las mismas, pero también en la defensa del estrés oxidativo general de la célula. Otro compuesto que presenta un potencial efecto antioxidante y que podría revertir el efecto que observamos con el $\text{RhCl}(\text{Cp}^*)(\text{phbzIm})$, es la N-acetil-L-cisteína (NAC); actúa restaurando la acción de los tioles.^{106,107} Células A549 se incubaron previamente con NAC (10 mM) durante 2 h, y posteriormente con diferentes dosis ($21,5 \mu\text{M}$, $43 \mu\text{M}$ y $64,5 \mu\text{M}$) de $\text{RhCl}(\text{Cp}^*)(\text{phbzIm})$ y se determinó la

viabilidad de las células mediante el ensayo de MTT. Se observó un rescate significativo de las células tratadas con NAC (Fig. 18).

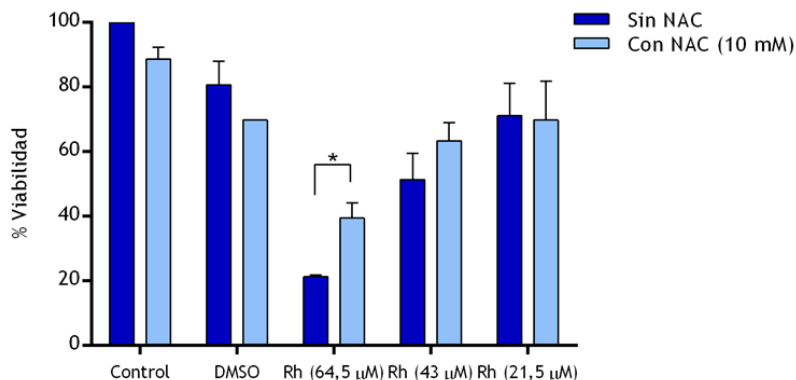


Figura 18. Células A549 fueron tratadas con N-acetil-L-cisteína (NAC) 10 mM durante 2 h, y posteriormente se trataron con $[\text{RhCl}(\text{Cp}^*)(\text{phbzIm})]$: 21,5 μM , 43 μM y 64,5 μM durante 24 h. La viabilidad se determinó mediante el ensayo MTT 24 h después. Los datos mostrados se corresponden a las medias y SD de tres experimentos independientes. Se observa un rescate en las células tratadas con 64,5 μM del compuesto de rodio (* $p < 0,01$).

Tras estas tres aproximaciones experimentales se puede afirmar que el $\text{RhCl}(\text{Cp}^*)(\text{phbzIm})$ ejerce un efecto mediado a través de la oxidación de los tioles; esto afecta tanto al plegamiento de las proteínas como al estado redox general de la células. En el mantenimiento del adecuado estado redox requerido en las células juegan un papel fundamental las mitocondrias. En experimentos previos llevados a cabo por la Dra. Mabel Acuña, se vio que la respiración de las mitocondrias de las células tratadas con el complejo de rodio estaba afectada. La cadena de transporte de electrones mitocondrial (ETC) también sirve para regenerar NAD. Las células usan NAD para eliminar electrones de los nutrientes que consumen, como azúcares y lípidos, que se reducen dando lugar a muchos intermediarios metabólicos necesarios para la proliferación celular. La síntesis de aspartato depende del suministro de NAD y este aminoácido se vuelve limitante cuando se inhibe la respiración.¹⁰⁸ Con esta inhibición, se encuentra inhibido el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA), que presenta un papel esencial en el apoyo al anabolismo de las células tumorales.¹⁰⁹ De esta manera las

rutas biosintéticas necesarias para el mantenimiento de la proliferación celular se encontrarán inhibidas (Fig. 19).

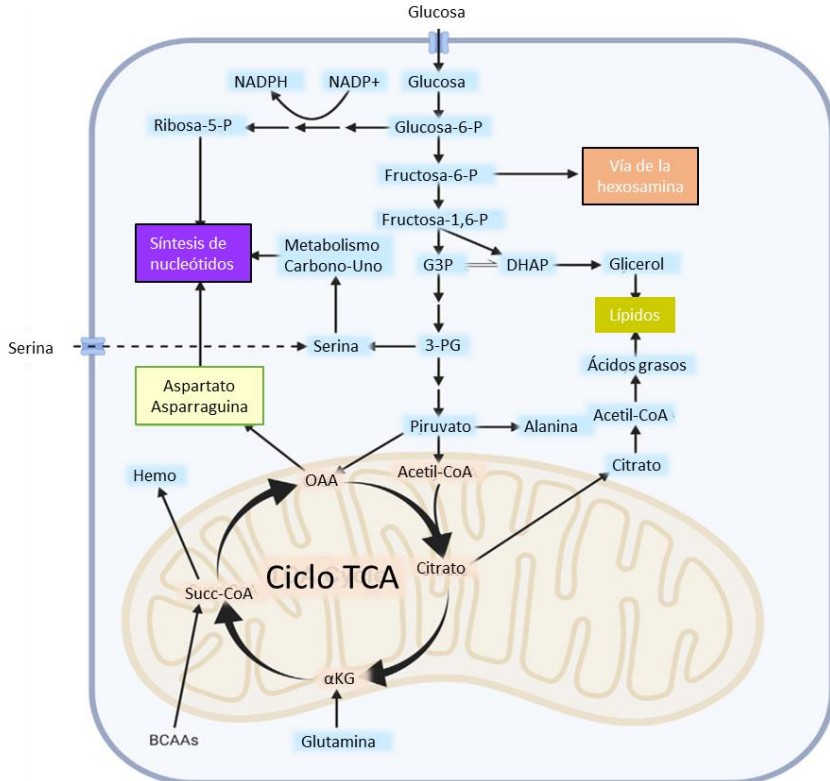


Figura 19. Vías que apoyan la síntesis de macromoléculas para el crecimiento. Para conseguir el sustrato necesario para la síntesis de macromoléculas, lípidos y nucleótidos necesarios para la proliferación celular, las células cancerígenas regulan tanto el ciclo de los ácidos tricarbónicos (TCA) como la glucólisis. Estas vías de biosíntesis están alimentadas por múltiples sustratos, proporcionándole a las células cancerígenas flexibilidad para el crecimiento tumoral. (Adaptado de K. Vasan, M. Werner, N. C. Handel, Cell Metabolism, 2020; con permiso de Elsevier, licencia de uso número 4970191183992)

Para corroborar que el $\text{RhCl}(\text{Cp}^*)(\text{phbzIm})$ estaba afectando a estas vías, se decidió usar en combinación con ácido aspártico, proporcionando así sustrato necesario para la síntesis de nucleótidos que permita a las células seguir proliferando (Fig. 19). De esta forma, células A549 fueron tratadas con diferentes dosis de $\text{RhCl}(\text{Cp}^*)(\text{phbzIm})$ (43 μM y 64,5 μM) solo o en combinación con

ácido aspártico (20 mM). Se midió su viabilidad a las 24 h mediante el ensayo MTT (Fig. 20a), y se observó en el microscopio cómo se encontraban las células después del tratamiento (Fig. 20b), y a través de ambas aproximaciones se comprobó que con el tratamiento combinado de ácido aspártico y $\text{RhCl}(\text{Cp}^*)(\text{phbzIm})$ se obtenía una viabilidad mayor (Fig. 20).

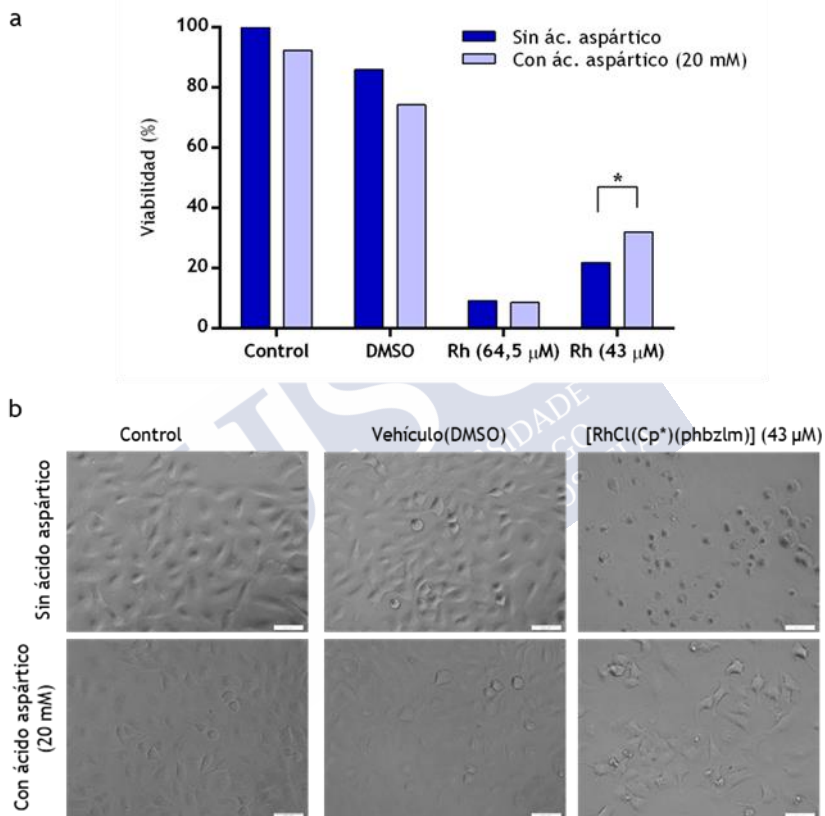


Figura 20. Células A549 fueron tratadas con $[\text{RhCl}(\text{Cp}^*)(\text{phbzIm})]$: 43 μM y 64,5 μM solo o en combinación con ácido aspártico 20 mM. **a)** Viabilidad de células A549 determinada mediante el ensayo MTT 24 h después de haberlas tratado. Se observa recuperación en las células tratadas con 64,5 μM del compuesto de rodio (* $p < 0,05$). **b)** Imágenes representativas de células A549 después del tratamiento con rodio y ácido aspártico durante 24 h.

Se puede afirmar que el $\text{RhCl}(\text{Cp}^*)(\text{phbzIm})$ ejerce su efecto sobre los grupos tioles, lo que altera el estado redox de las células, afectándose el

funcionamiento normal de las mitocondrias. Esto nos sirvió como base para testar la actividad antibiótica de este compuesto, ya que según la hipótesis de Kohanski y Collins,⁷¹ la mayoría de los compuestos con efecto bactericida alteran el estado redox de las bacterias, lo que en último lugar desencadena la muerte de las mismas.



5.3 ESTUDIO DEL MECANISMO DE ACCIÓN DEL COMPLEJO DE IRIDIO





La mayoría de los complejos half-sandwich de iridio empleados en investigaciones biológicas incluyen ligandos de diimina o el cliplopentadienilo, especialmente el ligando Cp* que presenta nuestro compuesto (Fig. 21). En todos ellos el metal se encuentra en el estado de oxidación +III debido a que se trata de uno de los iones metálicos cinéticamente más inertes que existen en condiciones fisiológicas.¹¹⁰ Estudiamos el efecto que el compuesto IrCl(Cp*)(phbzIm) provoca sobre líneas celulares cultivadas *in vitro* con el objetivo de establecer su mecanismo de acción y determinar su potencialidad como alternativa a los compuestos anticancerígenos empleados en la actualidad.

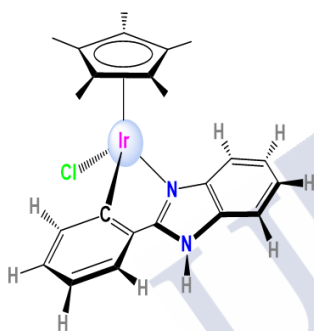


Figura 21. Estructura química del compuesto de iridio. El complejo IrCl(Cp*)(phbzIm) con estructura “half-sandwich” presenta como asiente del taburete un ligando areno ciclopentadieno (Cp*), y como patas del taburete el grupo saliente, Cl, y el ligando quelante, el phbzIm.

5.3.1 Análisis del estado general de las células

Se estudió el impacto del IrCl(Cp*)(phbzIm) en el ciclo celular de células A459. Se analizó 24 h después de haber añadido el tratamiento usando la tinción de IP, cuantificando los resultados mediante citometría de flujo. El porcentaje de células tratadas en fase G0/G1 es superior al de las células control, mientras que las células tratadas en fase G2/M están disminuidas (Fig. 22a). Se observa así un arresto en la fase G0/G1.

Se estudió si el tratamiento con el compuesto de iridio producía una inhibición de la síntesis de proteínas. Se trataron células A549 con IrCl(Cp*)(phbzIm) (16μM) durante 6 h. Se obtuvo una marcada inhibición de la síntesis de las proteínas, siendo equivalente la de las células tratadas con CHX y con el compuesto de iridio (Fig. 22b).

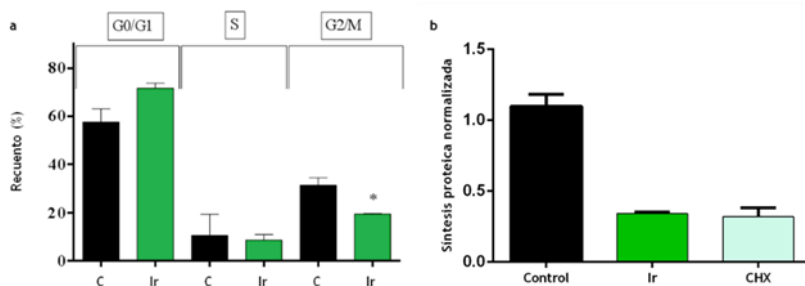


Figura 22. a) Distribución del ciclo celular de células tratadas con el compuesto de iridio. Células A549 fueron tratadas durante 24 horas con $[\text{IrCl}(\text{Cp}^*)(\text{phbzIm})]$ a $16 \mu\text{M}$ y analizadas por citometría de flujo usando una tinción de yoduro de propidio (IP). Se muestran las distribuciones del ciclo celular con el promedio y SD de al menos tres experimentos independientes (* $p < 0.05$). **b) Inhibición de la síntesis proteica.** Efecto del complejo de $[\text{IrCl}(\text{Cp}^*)(\text{phbzIm})]$ ($16 \mu\text{M}$) sobre la síntesis de proteínas emergentes de células A549 después de 6 horas de tratamiento, medido con *el Kit Click-iT Plus OPP Protein Synthesis Assay* (Invitrogen™). Se usó la cicloheximida (CHX) como control positivo ($500 \mu\text{M}$) para la inhibición de la síntesis de proteínas. Se muestran las distribuciones del ciclo celular con el promedio y SD de al menos tres experimentos independientes.

El mantenimiento de los niveles redox en las células es fundamental para su correcta proliferación, y su alteración puede provocar que se desencadene un mecanismo de muerte.

Para determinar la importancia que tiene la oxidación en la muerte celular provocada por el $\text{IrCl}(\text{Cp}^*)(\text{phbzIm})$, se empleó en combinación con NAC, que se trata de un compuesto antioxidante que modula el daño oxidativo que se produce sobre el ADN.¹⁰⁶ Se incubaron células A459 con NAC (10 mM) durante 2 h, y posteriormente con concentraciones crecientes de $\text{IrCl}(\text{Cp}^*)(\text{phbzIm})$ ($8 \mu\text{M}$, $16 \mu\text{M}$ y $24 \mu\text{M}$). La viabilidad se determinó mediante el ensayo MTT, obteniéndose una recuperación con las dosis de $\text{IrCl}(\text{Cp}^*)(\text{phbzIm})$ más elevadas (Fig. 23). De esta manera, la afectación del ADN es una vía importante en el mecanismo de muerte desencadenado por el $\text{IrCl}(\text{Cp}^*)(\text{phbzIm})$.

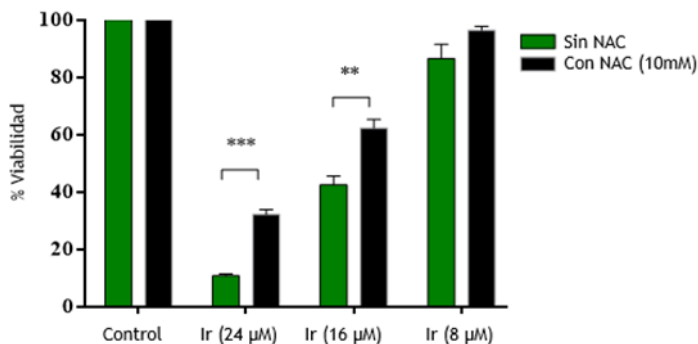


Figura 23. Células A549 fueron tratadas con N-acetil-L-cisteína (NAC) 10 mM durante 2 h, y posteriormente con $[\text{IrCl}(\text{Cp}^*)(\text{phbzIm})]$: 8 μM , 16 μM y 24 μM . La viabilidad se determinó mediante el ensayo MTT 24 h después. Los datos mostrados se corresponden a las medias y SD de tres experimentos independientes. Se observa un rescate en las células tratadas con 16 μM y 24 μM del compuesto de iridio. (** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

Es por ello que se decidieron medir los niveles del O_2^- en células A549 tratadas con $[\text{IrCl}(\text{Cp}^*)(\text{phbzIm})]$ (16 μM) durante 4 h, añadiendo en el medio DHE (0,5 μM), midiéndose la fluorescencia a través de citometría de flujo. Se usó el H_2O_2 (200 μM) como control positivo. En las células tratadas con $[\text{IrCl}(\text{Cp}^*)(\text{phbzIm})]$ se observó una disminución de los niveles del O_2^- (Fig. 24a), que bien podría ser resultado de una producción disminuida, o bien de un catabolismo acelerado si está dismutando a H_2O_2 y como resultado de la reacción de Fenton para producir el radical hidroxilo ($\bullet\text{OH}$). Por ello decidimos medir los niveles de $\bullet\text{OH}$ siguiendo el protocolo que amablemente nos facilitó el Prof. James Collins del MIT. Se trataron *E. coli* con 0,214 mM de $[\text{IrCl}(\text{Cp}^*)(\text{phbzIm})]$, añadiéndose la fluoresceína 3'-(p-hidroxifenilo) (HPF), que detecta $\bullet\text{OH}$; es una molécula no fluorescente hasta que se oxida una vez que reacciona con $\bullet\text{OH}$, mostrando fluorescencia verde. La oxidación de estas moléculas se monitorizó midiendo el incremento de fluorescencia mediante citometría de flujo usando el citómetro Guava EasyCyte. Cuando se analiza el perfil correspondiente a las tratadas, se ve un aumento en los niveles de $\bullet\text{OH}$ (Fig. 24b), por lo que el $[\text{IrCl}(\text{Cp}^*)(\text{phbzIm})]$ está alterando los niveles $\bullet\text{OH}$ de las células. El mecanismo propuesto por la acción del $\bullet\text{OH}$ sobre el ADN es la oxidación de nucleótidos de guanina (8-OHdG).¹¹¹

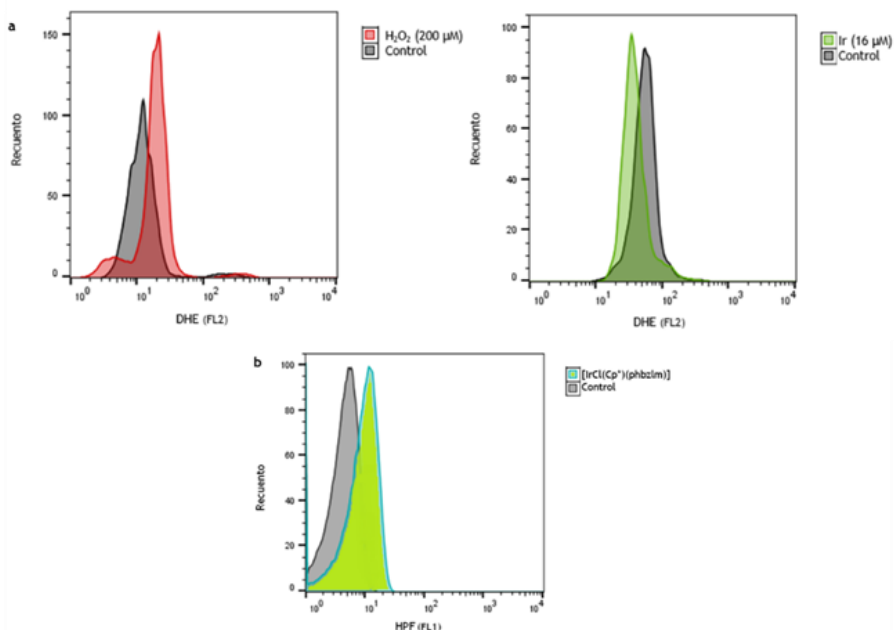


Figura 24. Análisis del estado de ROS. a) La intensidad de la fluorescencia de células A549 se determinó usando citometría de flujo basada en fluorescencia. El DHE (0,5 μM) estaba presente en el medio para detectar los niveles intracelulares del O₂⁻, habiéndose tratado las bacterias con el control positivo de H₂O₂ a 200 μM (izquierda) o [IrCl(Cp*)(phbzIm)] (derecha) a 16 μM durante 4 horas. En las células tratadas con el complejo se detectó una disminución de los niveles del O₂⁻. b) La intensidad de la fluorescencia de bacterias *E. coli* se determinó usando citometría de flujo basada en fluorescencia. HPF (5 mM) estaba presente en el medio para detectar los niveles intracelulares del •OH, habiéndose tratado las bacterias con [IrCl(Cp*)(phbzIm)] a una concentración de 0,214 mM. Las imágenes son representativas de al menos tres experimentos independientes. Todos los datos se recopilaron usando el citómetro de flujo Guava EasyCyte. Los datos se analizaron empleando el software InCyte.

Por ello se midió la oxidación de 8-OHdG en células A549 tratadas con IrCl(Cp*)(phbzIm) (16 μM) durante 4 h, tras lo que se extrajo el ADN de las mismas mediante el kit *NucleoSpin Tissue* (Macherey-Nagel), y se cuantificó mediante el kit *EpiQuik 8-OHdG* (Epigentek) la presencia de 8-OHdG. Esta técnica se basa en cuantificar colorimétricamente los niveles de 8-OHdG. Se usó el H₂O₂ (200 μM) como control positivo, y se obtuvo que en las células tratadas con IrCl(Cp*)(phbzIm) se producía la oxidación de 8-OHdG (Fig. 25).

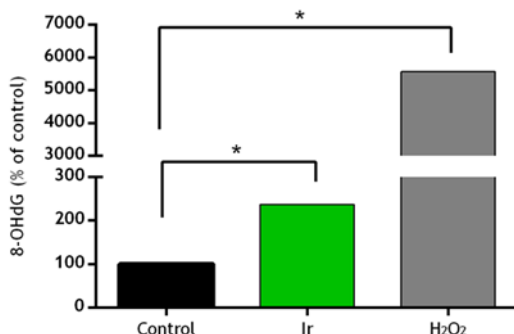


Figura 25. Cuantificación de la oxidación de 8-OHdG. Se cuantificó la oxidación de 8-OHdG provocado por el tratamiento con el complejo $[\text{IrCl}(\text{Cp}^*)(\text{phbzIm})]$ ($16 \mu\text{M}$) en células A459 tratadas durante 4 horas, mediante el Kit EpiQuik 8-OHdG DNA Damage Quantification Direct (Epigentek). Se trata de un ensayo colorimétrico mediante el que se detectan los niveles de 8-OHdG, marcador del daño oxidativo del ADN. Se usó el peróxido de hidrógeno ($\text{H}_2\text{O}_2 = 200 \mu\text{M}$) como control positivo. (* $p < 0,01$).

El efecto del compuesto a la IC_{50} sobre la oxidación de 8-OHdG, aunque significativo, es modesto, por lo que parece excluir que el daño al ADN sea el causante principal de la muerte celular.

5.3.2 Valoración del estado del retículo endoplasmático

El compuesto de iridio afecta a la síntesis de proteínas, reduciéndola significativamente (Fig. 22b), por lo que decidimos estudiar si alguno de los genes activados en esta cascada UPR se activaba con este tratamiento y desencadenada el mecanismo de muerte. Se escogió el factor de transcripción proapoptótico CHOP, para lo cual se transfectaron células HEK293 con el plásmido CHOP:GFP, y se trataron con $\text{IrCl}(\text{Cp}^*)(\text{phbzIm})$ en una concentración de $9,7 \mu\text{M}$. Se usó la TU⁹⁷ ($1,2 \mu\text{M}$) como control positivo, y la activación de dicho gen se observó mediante la emisión de fluorescencia observándola mediante la técnica time-lapse, monitorizándola durante 24 h en el microscopio invertido de campo claro Leica DMI 6000B.

Se monitorizó la activación de CHOP sacando fotografías cada 30 minutos, y se obtuvo que su señal de activación cuando las células se trataban con $\text{IrCl}(\text{Cp}^*)(\text{phbzIm})$ (vídeo_5_Ir) era similar a la señal obtenida con la TU (vídeo_2_TU). La activación de CHOP (señal verde) al tratar a las células con TU (vídeo_2_TU) comenzó a aparecer

a las 2 h después de haberlas tratado, y se siguió detectando 24 h después, al igual que con el tratamiento iridio, que se comenzó a detectar la señal en torno a las 2-3 h de tratamiento (vídeo_5_Ir), continuando a las 24 h. (Fig. 26).

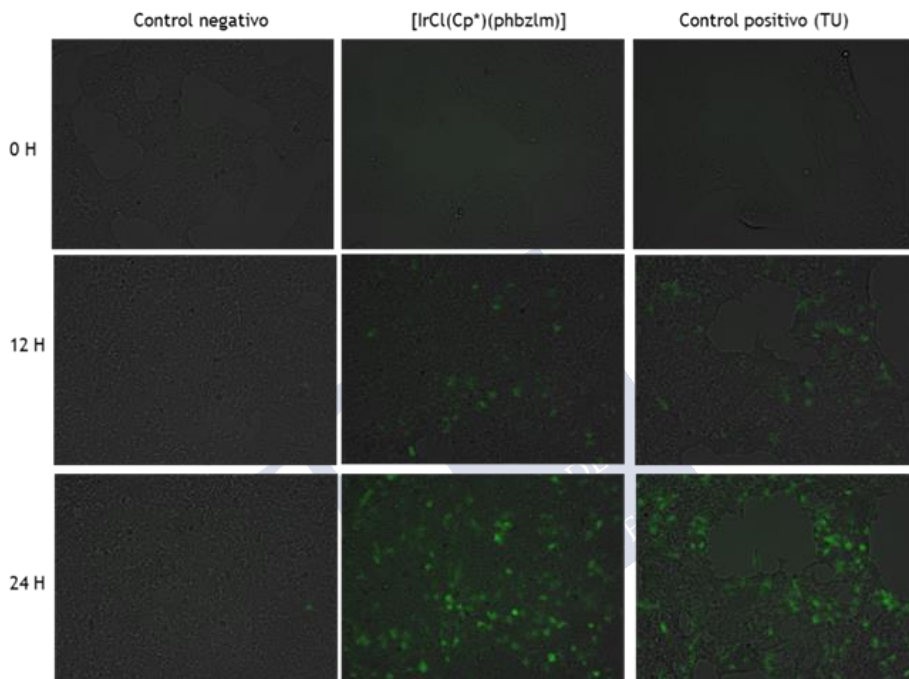


Figura 26. Cuantificación de CHOP. Las células HEK293 fueron transfectadas con el plásmido CHOP::GFP, empleando el reactivo de transfección Dreamfect™ Gold (OZ Bioscience). Posteriormente se trataron con $[\text{IrCl}(\text{Cp}^*)(\text{phbzIm})]$ ($9,7 \mu\text{M}$). Se empleó la tunicamicina ($0,5 \mu\text{M}$) como control positivo. Las células se tiñeron con IP ($1\mu\text{g}/\text{ml}$) para detectar si hay muerte (señal roja). La actividad de dicho gen (señal verde) se monitorizó mediante microscopía de fluorescencia. La emisión de verde fluorescente indica la activación del gen, que no se detectó en las células tratadas con el complejo.

La activación de este factor de transcripción se produce en la cascada de señalización UPR a través de dos vías diferentes (Fig. 9): la activación de PERK, que incrementa los niveles de ATF4, y la de ATF6, provocando ambos factores de transcripción la regulación transcripcional de CHOP. Para ver cuál de estas vías era la que se activaba con el $\text{IrCl}(\text{Cp}^*)(\text{phbzIm})$, se decidió estudiar los niveles de

ATF6 que nos encontrábamos en las células, para lo que se transfectoron células HEK293 con el plásmido p5xATF6-GL3. Se trataron con IrCl(Cp*)(phbzIm) (16 μ M) durante 2,4 y 6 horas. Se empleó la tunicamicina⁹⁷ (1,2 μ M) como control positivo, y la actividad de dicho gen se determinó midiendo la fluorescencia. No se obtuvo un aumento de los niveles de ATF6 a ninguna de las horas analizadas (Fig. 27), por lo que la vía que se está activando en la cascada UPR deber ser la de PERK (Fig. 9).

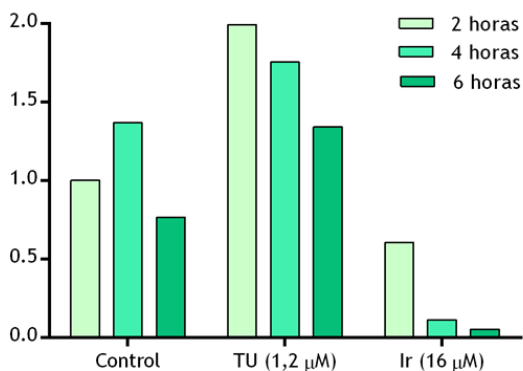


Figura 27. Cuantificación de ATF6. Las células HEK293 fueron transfectadas con el plásmido p5xATF6-GL3, empleando el reactivo de transfección Dreamfect™ Gold (OZ Bioscience). Posteriormente se trataron con [IrCl(Cp*)(phbzIm)] (16 μ M) durante 2,4 y 6 horas. Se empleó la tunicamicina (1,2 μ M) como control positivo. La actividad de dicho gen se determinó midiendo la fluorescencia a 488 nm. Los resultados se expresaron comparándolos con los valores obtenidos en el control de 2 horas.

5.3.3 Efectos sobre las mitocondrias

Las mitocondrias, además de ver sus funciones alteradas por variaciones en la homeostasis del calcio llevada a cabo a través del RE, también se ven afectadas por los cambios en los niveles de ROS y por el daño en el ADN, aumentando ambas la fuga de protones hacia las mitocondrias, pudiendo activarse la vía apoptótica a través de este orgánulo. Dado que cuando tratamos a las células con IrCl(Cp*)(phbzIm) se alteran los niveles de ROS (Fig. 24) y se produce daño en el ADN (Fig. 25), se decidió estudiar el efecto ejercido por este compuesto sobre las mitocondrias.^{62,69} En estudios previos realizados con la Dra. Mabel Acuña, se pudo comprobar el efecto que la administración del compuesto tiene sobre la respiración en células

tumorales. La conclusión de dichos estudios es que el compuesto de iridio podría actuar desacoplando la respiración (Fig. 28).

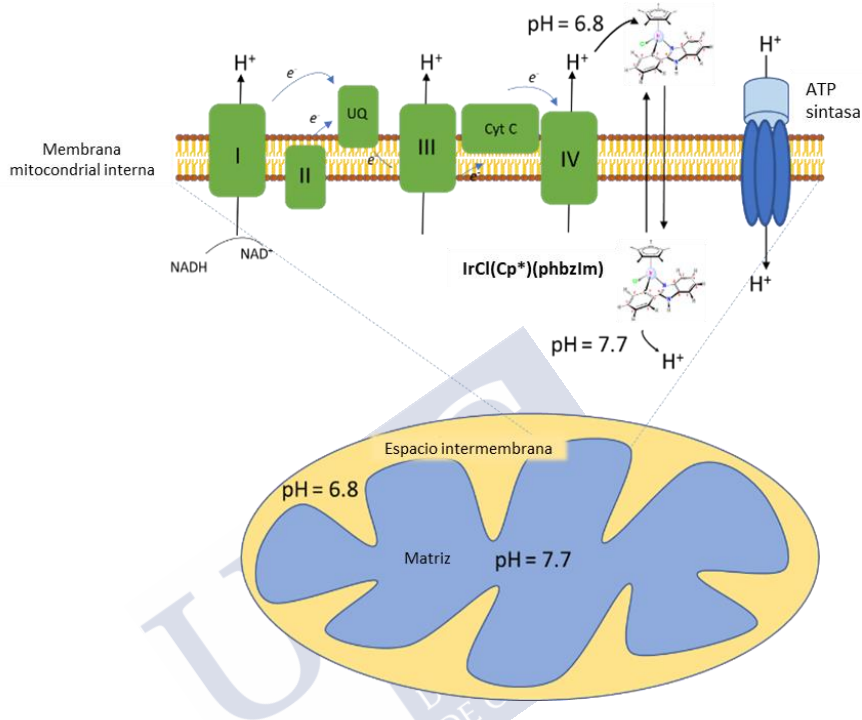


Figura 28. Efecto del compuesto de iridio sobre la respiración. Actúa como agente desacoplante de la respiración mitocondrial, actuando como un protonóforo.

Para comprobar si este efecto también se produce en células no tumorales, se midió la respiración en la línea celular MCF10A, una línea celular epitelial no tumorigénica. Esta línea cubrirá sus requerimientos metabólicos de una manera diferente a la que nos encontramos en las líneas celulares tumorales, ya que estas últimas sufren una serie de modificaciones para adaptarse a su necesidad de proliferación continuada.⁵⁵

La tasa de consumo de oxígeno (OCR, por sus siglas en inglés) sirve para medir la respiración mitocondrial, indicándonos si se producen alteraciones en el metabolismo general de estos orgánulos. Mediante el uso de moduladores específicos de la respiración mitocondrial que proporcionan información con la que se pueden establecer parámetros

del estado de la respiración, podemos evaluar las alteraciones en la misma. Los moduladores seleccionados los encontramos en el kit *XFp Cell Mito Stress Test* (Agilent Technologies), con el que mediremos tanto la OCR como la tasa de acidificación extracelular (ECAR): la rotenona, la antimicina A, la oligomicina y la carbonilcianida-4-trifluorometoxifenilhidrazona (FCCP). La rotenona y la antimicina A son inhibidores de los complejos I y III de la ETC, mientras que la oligomicina lo es de la ATP sintasa, y la FCCP es un desacoplante que actúa como un agente protonofórico disipando el gradiente electroquímico formado durante la respiración (Fig. 29a). Se trataron células A549 con $\text{IrCl}(\text{Cp}^*)(\text{phbzIm})$ (4 y 8 μM) y se midió la OCR a través del analizador de flujo extracelular *XFp Seahorse* (Bioscience). Se observó que cuando se añadía la oligomicina se producía un descenso de OCR similar al de las células sin tratar (Fig. 29b), por lo que en este caso la ATP sintasa representará una mayor importancia en la obtención del ATP global de la célula que en el caso de la línea tumoral donde se había testado. A pesar de esto, cuando nos fijamos en la producción de ATP, está disminuida en las células tratadas respecto a las control, encontrándose que es dependiente de dosis (Tabla 1), al mismo tiempo que encontramos un aumento en la fuga de protones. De esta manera, el $\text{IrCl}(\text{Cp}^*)(\text{phbzIm})$ está afectando a la respiración, pero sus efectos sobre la mitocondria no son tan marcados como en la línea tumoral. Tanto la respiración basal como la respiración máxima están disminuidas con el tratamiento de $\text{IrCl}(\text{Cp}^*)(\text{phbzIm})$, así como la capacidad de reserva respiratoria, observándose una dependencia de dosis: a más concentración de tratamiento, mayor perturbación (Tabla 1).

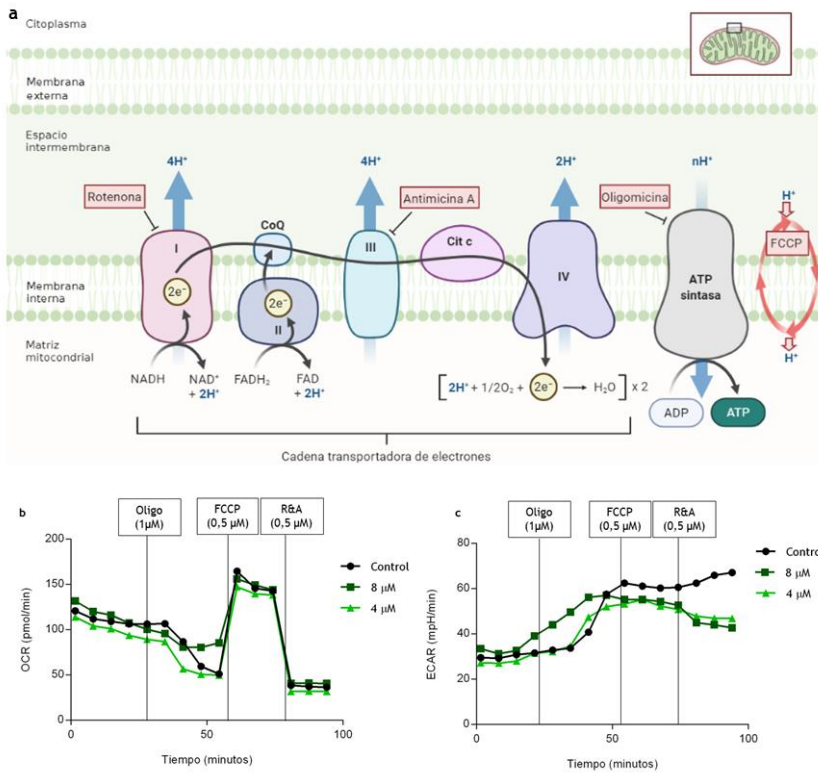


Figura 29. a) Cadena transportadora de electrones (ETC). Flujo electrónico a través de la ETC, mostrándose el lugar donde actúan los inhibidores específicos de la respiración mitocondrial: la rotenona inhibe el complejo I, la antimicina A inhibe el complejo III, la oligomicina inhibe la ATP sintasa, y la FCCP es un agente desacoplador de la cadena respiratoria. **b y c) Perfiles respiratorios de OCR y ECAR.** Células MCF10 fueron tratadas durante 1 h con $[\text{IrCl}(\text{Cp}^*)(\text{phbzIm})]$ (4 y 8 μM), y empleando el kit *XFp Cell Mito Stress Test* se midieron estos parámetros en el analizador de flujo extracelular *XFp Seahorse*.

	Control		Ir (4 μ M)		Ir (8 μ M)	
	Promedio	SD	Promedio	SD	Promedio	SD
Respiración no mitocondrial	35,65	2,19	31,71	1,70	40,02	1,95
Respiración basal	84,30	9,20	78,77	6,03	78,60	5,84
Respiración máxima	180,63	13,75	136,81	14,54	113,93	12,61
Fuga de protones	12,78	1,39	19,00	2,37	39,35	0,10
Producción de ATP	66,65	6,37	45,81	3,19	16,92	5,46
Capacidad de reserva respiratoria	101,20	5,99	72,00	8,98	57,65	7,05
Reserva respiratoria (%)	227,65	4,92	210,91	4,35	202,32	2,42
Eficiencia de acoplamiento (%)	83,91	0,18	70,73	1,15	29,74	6,76

Tabla 1. Parámetros de la respiración mitocondrial. Se muestran los resultados de las mediciones de células MCF10 que se trataron o no con [IrCl(Cp*)(phbzIm)] (4 y 8 μ M). Se realizaron en el analizador de flujo extracelular *XFp Seahorse*.

De esta manera se demostró que el compuesto de iridio produce una disfunción en la mitocondria que se ve compensada con un aumento en la capacidad glucolítica de las células para mantener los niveles de ATP. El papel desempeñado por el IrCl(Cp*)(phbzIm) como agente protonóforo hace que nos preguntásemos si se producía un aumento de la disipación de la energía en forma de calor, por lo que se decidió hacer un experimento *in vivo* con la colaboración de la Dra. Sulay Tovar para comprobarlo. Se trataron ratones con una concentración de IrCl(Cp*)(phbzIm) de 0,439 mg/ml, y manteniéndolos a 4 ° C se les midió la temperatura corporal (Fig. 30a) e interescapular (Fig. 30b), observándose un ligero aumento de la disipación de la energía en forma de calor (Fig. 30). Aunque éste no es significativo, sí nos abre un nuevo enfoque terapéutico con este complejo, siendo necesarios más experimentos que nos ayuden a determinar si presenta potencial para tratamientos relacionados con la obesidad.

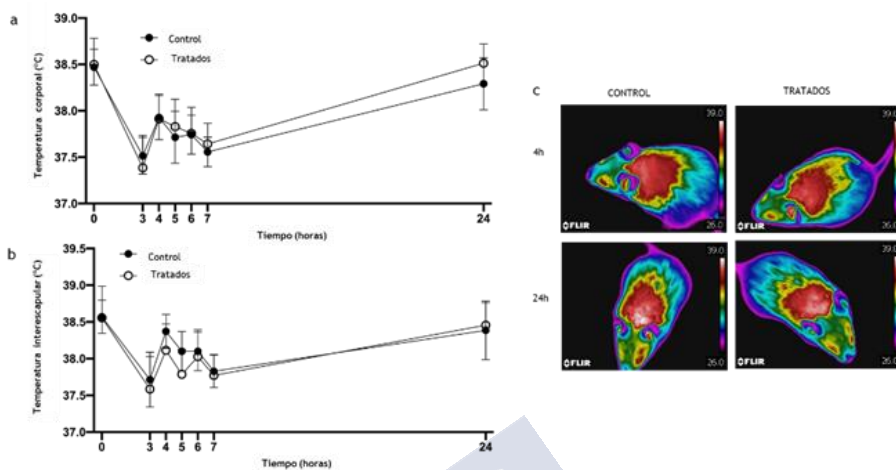


Figura 30. Ratones fueron administrados con una dosis de $[\text{IrCl}(\text{Cp}^*)(\text{phbzIm})]$ a una concentración de 0,439 mg/ml, manteniéndolos a una temperatura de 4°C . Se les midió la temperatura corporal (a) y la temperatura interescapular (b) justo antes del tratamiento, y a partir de las 3 horas de la administración, cada hora hasta las 7 horas; por último, se midió a las 24 horas. c) Se muestran imágenes representativas de la toma de temperatura. Se observa un ligero aumento de la disipación de energía en forma de calor.

5.4 ESTUDIO DE COMPUESTOS BACTERICIDAS





5.4.1 Evaluación de la actividad antibiótica de los compuestos organometálicos

Se ha analizado la actividad de los complejos $\text{IrCl}(\text{Cp}^*)(\text{phbzIm})$, $\text{RhCl}(\text{Cp}^*)(\text{phbzIm})$ y $\text{RuCl}(\text{cym})(\text{phbzIm})$ en la cepa *Escherichia coli* DH5 α , obteniéndose con los tres inhibiciones del crecimiento bacteriano, siendo en el caso de las bacterias tratadas con el compuesto de rodio (Fig. 31B) mucho más pronunciado que las tratadas con iridio (Fig. 31A) y rutenio (Fig. 32A). Se descartó el seguir estudiando el compuesto $\text{RuCl}(\text{cym})(\text{phbzIm})$ debido a su baja actividad (Fig. 32).

El efecto antibiótico puede ser bacteriostático, si provoca una inhibición del crecimiento cuando las bacterias se encuentran en contacto con el tratamiento, permaneciendo viables y pudiendo volver a proliferar una vez se retira el mismo, o bactericida, produciéndose la muerte en el momento del tratamiento y no recuperándose la viabilidad, aunque se retire el tratamiento. En la Fig. 33 vemos como las bacterias de las cepas mostradas, *E. faecalis*, *E. coli* (ATCC 25922) y *E. hirae*, mueren con $\text{RhCl}(\text{Cp}^*)(\text{phbzIm})$, mientras que las tratadas con $\text{IrCl}(\text{Cp}^*)(\text{phbzIm})$ sí crecen en ausencia el compuesto (a las concentraciones testadas, en presencia del compuesto, se produjo inhibición del crecimiento, Fig. 34 y 35).

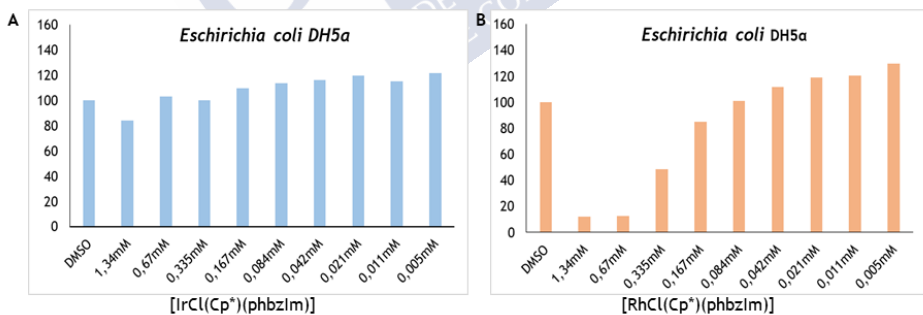


Figura 31. La cepa *E. coli* DH5 α se trató durante 1 h con concentraciones decrecientes de cada uno de los compuestos de estudio [$\text{IrCl}(\text{Cp}^*)(\text{phbzIm})$] (A), [$\text{RhCl}(\text{Cp}^*)(\text{phbzIm})$] (B): 1,34 mM; 0,67 mM; 0,335 mM; 0,167 mM; 0,084 mM; 0,042 mM; 0,021 mM; 0,011 mM y 0,005 mM. Se dejaron crecer durante 24 h a 37 °C. Se midió el crecimiento espectrofotométricamente a 600 nm, y el porcentaje de viabilidad se evaluó como el porcentaje de absorbancia de las bacterias tratadas frente al control (vehículo). Los valores mostrados se corresponden con las medias de tres experimentos independientes (tres réplicas por experimento).

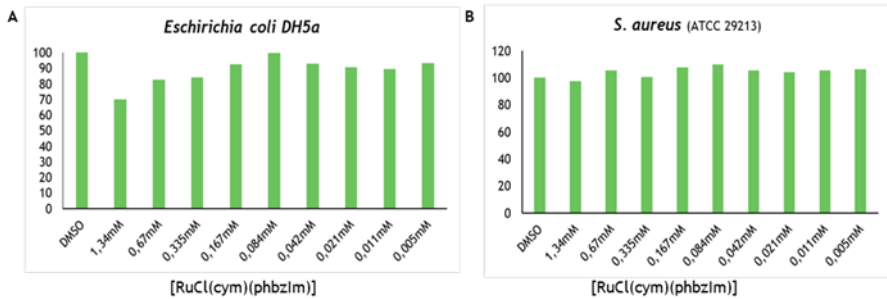


Figura 32. Las cepas *E. coli* DH5 α (A) y *S. aureus* (ATCC 29213) (B) se trataron durante 1 h con concentraciones decrecientes de cada uno del compuesto [RuCl(cym)(phbzIm)]: 1,34 mM; 0,67 mM; 0,335 mM; 0,167 mM; 0,084 mM; 0,042 mM; 0,021 mM; 0,011 mM y 0,005 mM. Se dejaron crecer durante 24 h a 37 °C. Se midió el crecimiento espectrofotométricamente a 600 nm, y el porcentaje de viabilidad se evaluó como el porcentaje de absorbancia de las bacterias tratadas frente al control (vehículo). Los valores mostrados se corresponden con las medias de tres experimentos independientes (tres réplicas por experimento).

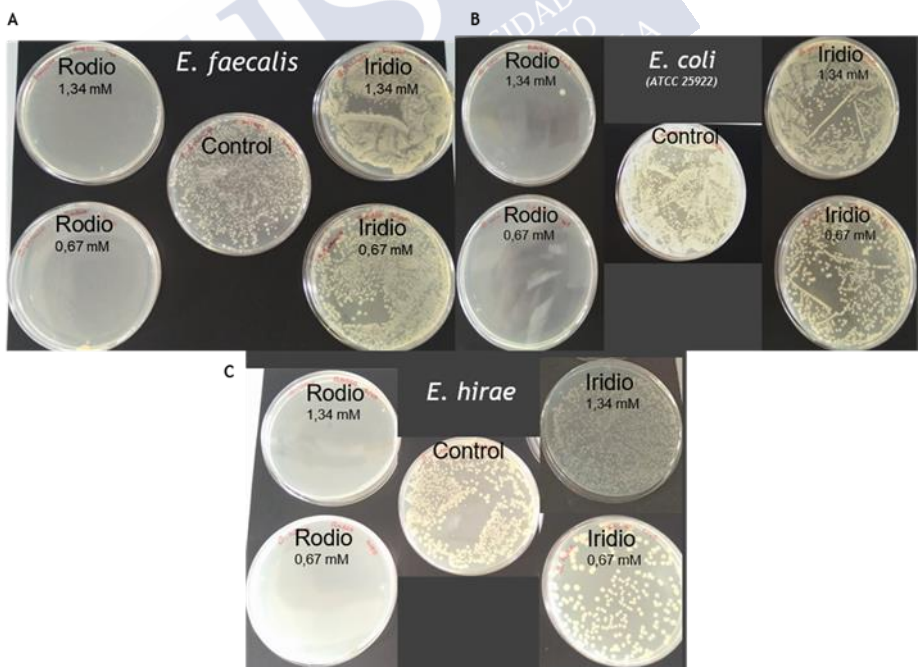


Figura 33. Las cepas *E. faecalis* (izquierda), *E. coli* (ATCC 25922) (B) y *E. hirae* (C) se sembraron en placa a partir de muestras sembradas en placas de 96 pocillos que se habían dejado crecer durante 24 h tras un tratamiento de 1 h con $[\text{IrCl}(\text{Cp}^*)(\text{phbzIm})]$ o $[\text{RhCl}(\text{Cp}^*)(\text{phbzIm})]$ (1,34 mM y 0,67 mM).

El potencial de estos compuestos como tratamiento antibiótico se comprobó testando su actividad en diferentes cepas bacterianas, tanto GRAM (+) como GRAM (-), obtenidas comercialmente, así como procedentes de aislados clínicos. Con $\text{IrCl}(\text{Cp}^*)(\text{phbzIm})$ y $\text{RhCl}(\text{Cp}^*)(\text{phbzIm})$ se obtuvo una inhibición del crecimiento en las bacterias GRAM positivas testadas: *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SARM), *Enterococcus hirae* y *Enterococcus faecalis*, así como con las de *Escherichia coli*, GRAM negativas (Fig. 34 y 35). En cambio, en las cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, también GRAM (-) (Fig. 36), no produjeron ningún efecto sobre el crecimiento. El grado de inhibición obtenido fue en general más pronunciado con el compuesto $\text{RhCl}(\text{Cp}^*)(\text{phbzIm})$ (Fig. 35) que con el compuesto $\text{IrCl}(\text{Cp}^*)(\text{phbzIm})$ (Fig. 34). En aquellas cepas donde se observó una inhibición del crecimiento bacteriano, se comprobó que el efecto producido por el compuesto $\text{IrCl}(\text{Cp}^*)(\text{phbzIm})$ era bacteriostático, mientras que en el caso del $\text{RhCl}(\text{Cp}^*)(\text{phbzIm})$, era bactericida, corroborándose la tendencia mostrada en la aproximación inicial con *E. coli* DH5 α .

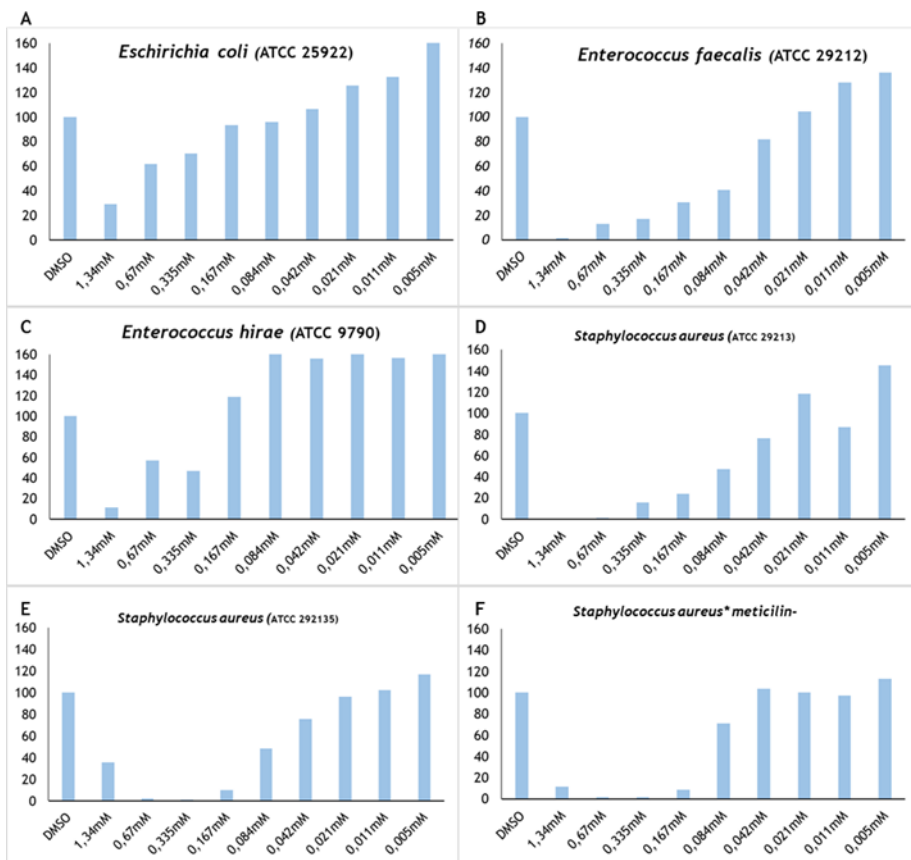


Figura 34. Efecto del compuesto de iridio en el crecimiento bacteriano. Diferentes cepas de bacterias: *E. coli* (A), *S. aureus subsp. aureus* (B), *S. aureus* (C), *S. aureus resistente a metilicina* * (D), *E. hirae* (E), *E. faecalis* (F), se trataron durante 1 h con concentraciones decrecientes de [IrCl(Cp*)(phbzlm)]: 1,34 mM; 0,67 mM; 0,335 mM; 0,167 mM; 0,084 mM; 0,042 mM; 0,021 mM; 0,011 mM y 0,005 mM. Se dejaron crecer durante 24 h a 37 °C. Se midió el crecimiento espectrofotométricamente a 600 nm, y el porcentaje de viabilidad se evaluó como el porcentaje de absorbancia de las bacterias tratadas frente al control (vehículo). Los valores mostrados se corresponden con las medias de tres experimentos independientes (tres réplicas por experimento). Las cepas marcadas con * se corresponden con bacterias aisladas de muestras clínicas.

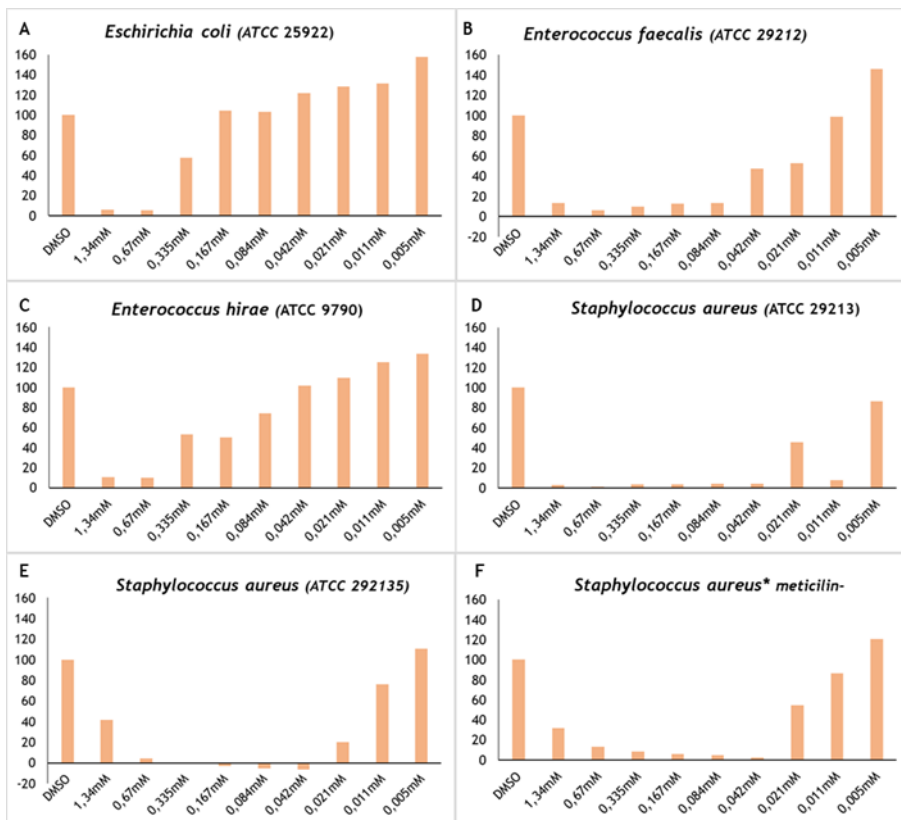


Figura 35. Efecto del compuesto de rodio en el crecimiento bacteriano. Diferentes cepas de bacterias: *E. coli* (A), *S. aureus* subsp. *aureus* (B), *S. aureus* (C), *S. aureus* resistente a metilicina* (D), *E. hirae* (E), *E. faecalis* (F), se trataron durante 1 h con concentraciones decrecientes de [RhCl(Cp*)(phbzIm)]: 1,34 mM; 0,67 mM; 0,335 mM; 0,167 mM; 0,084 mM; 0,042 mM; 0,021 mM; 0,011 mM y 0,005 mM. Se dejaron crecer durante 24 h a 37 °C. Se midió el crecimiento espectrofotométricamente a 600 nm, y el porcentaje de viabilidad se evaluó como el porcentaje de absorbancia de las bacterias tratadas frente al control (vehículo). Los valores mostrados se corresponden con las medias de tres experimentos independientes (tres réplicas por experimento). Las cepas marcadas con * se corresponden con bacterias aisladas de muestras clínicas.

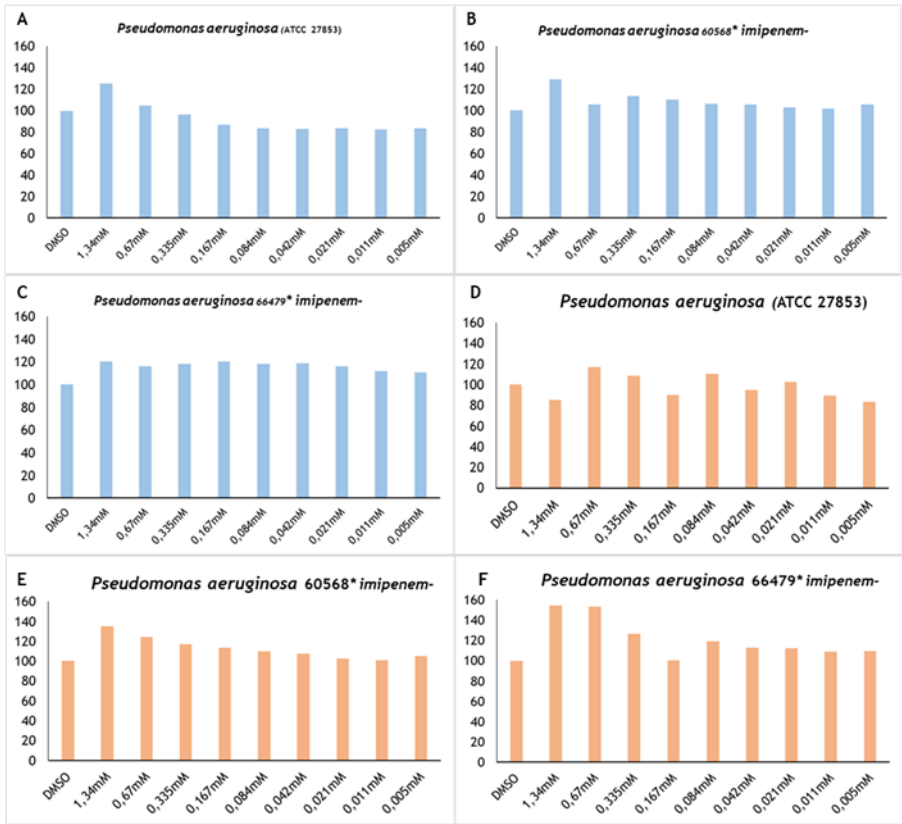


Figura 36. Efecto de los compuestos de iridio y rodio en el crecimiento bacteriano. Diferentes cepas de bacterias: *P. aeruginosa* (A, E), *P. aeruginosa* 60568* (B, D) y *P. aeruginosa* 66479* (C, F), se trataron durante 1 h con concentraciones decrecientes de [[IrCl(Cp*)(phbzIm)] o RhCl(Cp*)(phbzIm)]: 1,34 mM; 0,67 mM; 0,335 mM; 0,167 mM; 0,084 mM; 0,042 mM; 0,021 mM; 0,011 mM y 0,005 mM. Se dejaron crecer durante 24 h a 37 °C. Se midió el crecimiento espectrofotométricamente a 600 nm, y el porcentaje de viabilidad se evaluó como el porcentaje de absorbancia de las bacterias tratadas frente al control (vehículo). Los valores mostrados se corresponden con las medias de tres experimentos independientes (tres réplicas por experimento). Las cepas marcadas con * se corresponden con bacterias aisladas de muestras clínicas.

5.4.1.1 Mecanismo de acción

Los mecanismos de acción desencadenados por ambos compuestos parecen ser diferentes, y se determinó si eran dependientes o independientes de los niveles de ROS que podrían inducir.

Mientras que $\text{RhCl}(\text{Cp}^*)(\text{phbzIm})$ incrementa los niveles de O_2^- (Fig. 37B) tal como es esperable de un compuesto que interfiere en la cadena respiratoria (ver más adelante), el $\text{IrCl}(\text{Cp}^*)(\text{phbzIm})$ aumenta los niveles de $\bullet\text{OH}$ (Fig. 37C), lo que es chocante con un efecto bacteriostático, ya que el daño al DNA debería producir la muerte bacteriana. Posiblemente ello sea debido a un efecto de concentración, los niveles de $\bullet\text{OH}$ producidos por $\text{IrCl}(\text{Cp}^*)(\text{phbzIm})$ no son suficientes para la muerte de las bacterias. Para comprobarlo, decidimos establecer si la acción de los compuestos está mediada por el incremento de ROS o si su aumento es solo un producto secundario de la acción del compuesto, como en el caso de $\text{RhCl}(\text{Cp}^*)(\text{phbzIm})$ al interferir con la ETC. Para aclararlo, se redujeron los niveles de O_2 presentes en el medio de cultivo de las bacterias, que es la principal fuente de ROS.

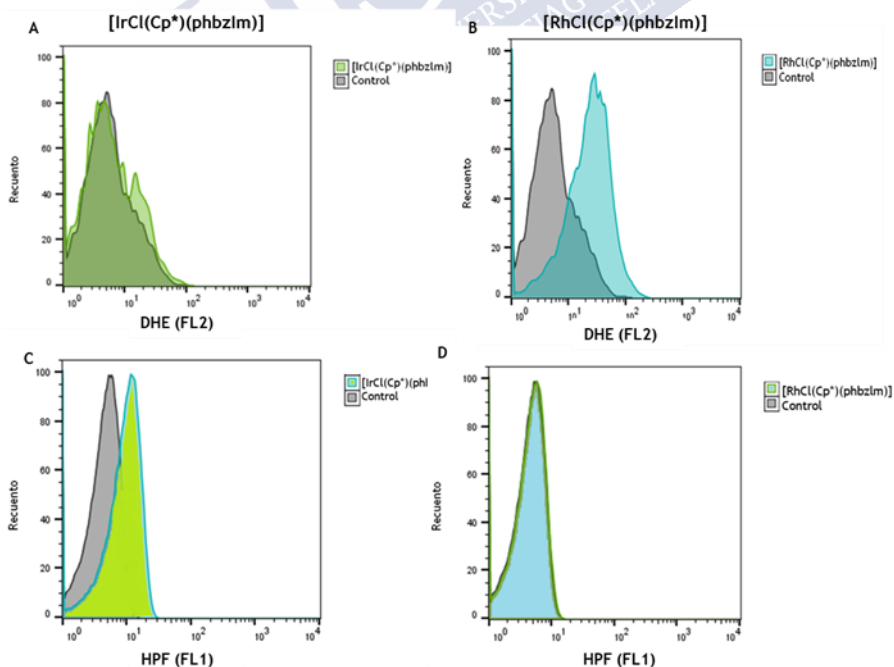


Figura 37. Determinación de los niveles de ROS. Niveles intracelulares del O_2^- tras tratamiento con $[IrCl(Cp^*)(phbzIm)]$ (A) o $[RhCl(Cp^*)(phbzIm)]$ (B) a una concentración de 0,214 mM. C y D) niveles intracelulares del $\bullet OH$ tras tratamiento con $[IrCl(Cp^*)(phbzIm)]$ (C) o $[RhCl(Cp^*)(phbzIm)]$ (D) a una concentración de 0,214 mM. Las imágenes son representativas de al menos tres experimentos independientes. Todos los datos se recopilaron usando el citómetro de flujo Guava EasyCyte. Los datos se analizaron empleando el software InCyte.

Se trataron bacterias *E. coli* en condiciones de hipoxia (0,2 % de O_2). Con el $[IrCl(Cp^*)(phbzIm)]$ se obtuvo una inhibición del crecimiento similar a la obtenida en condiciones de normoxia (Fig. 38), lo que parece descartar que el $\bullet OH$ sea el mediador final de la acción de $[IrCl(Cp^*)(phbzIm)]$. Resulta de interés, que con $[RhCl(Cp^*)(phbzIm)]$ la inhibición obtenida en condiciones de hipoxia es mayor que en normoxia (Fig. 38), lo que incrementa su interés terapéutico. Por ello decidimos caracterizar mejor su mecanismo de acción. Teniendo en cuenta que el $[RhCl(Cp^*)(phbzIm)]$ deprime la respiración en células tumorales (Mabel Acuña, tesis doctoral) se decidió estudiar su efecto sobre el metabolismo bacteriano.

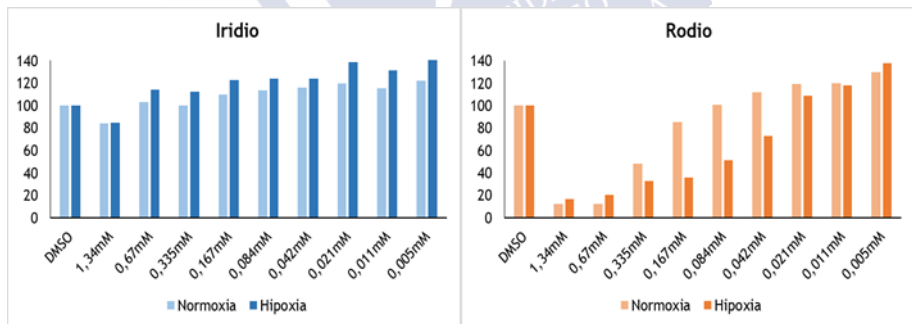


Figura 38. Efecto de los niveles de O_2 sobre la acción antibiótica. Bacterias *E. coli* se trataron durante 1 h con concentraciones decrecientes de $[IrCl(Cp^*)(phbzIm)]$ (izquierda) o $[RhCl(Cp^*)(phbzIm)]$ (derecha): 1,34 mM; 0,67 mM; 0,335 mM; 0,167 mM; 0,084 mM; 0,042 mM; 0,021 mM; 0,011 mM y 0,005 mM, usando como control el vehículo en el que se encuentran (DMSO), poniendo tres réplicas por condición. Se dejaron crecer durante 24 h a 37 °C y se midió su crecimiento espectrofotométricamente a 600 nm. Se diferencian dos condiciones experimentales: hipoxia (0,2 % de O_2) y normoxia (21% de O_2). Los resultados mostrados son las medias de tres réplicas experimentales.

Se estudiaron los efectos de $\text{RhCl}(\text{Cp}^*)(\text{phbzIm})$ sobre el consumo de oxígeno (OCR) y la glucólisis, medida esta última a través de la acidificación del medio (ECAR) (Fig. 39). Se trataron bacterias *E. coli* con $\text{RhCl}(\text{Cp}^*)(\text{phbzIm})$, siendo la concentración inhibitoria mínima (MIC) 0,214 mM, y testando diferentes dosis a partir de la misma. Se comprobó que el compuesto de rodio tiene un efecto marcado, tanto sobre la OCR (Fig. 39A), como sobre la ECAR (Fig. 39B) que se eleva para compensar el efecto depresor sobre la respiración.

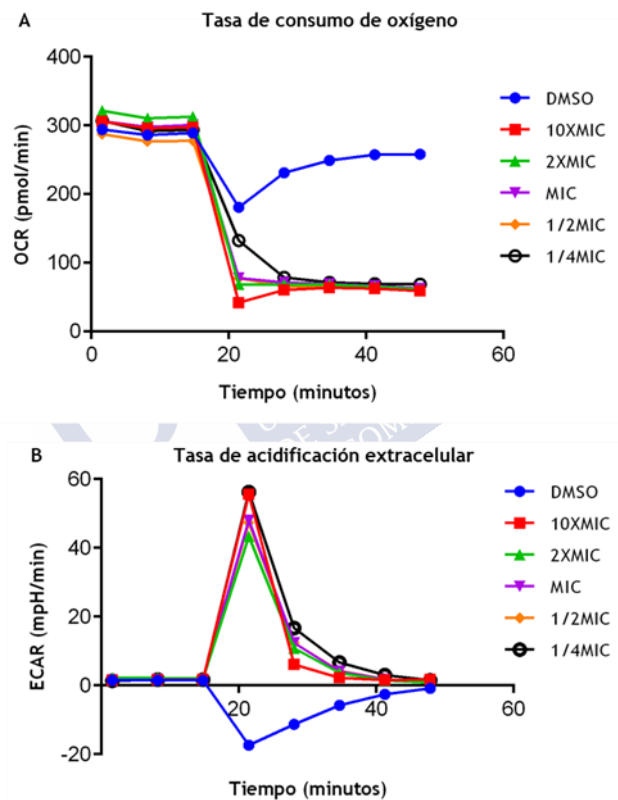


Figura 39. Valoración de la afectación del metabolismo. Se evaluó la función mitocondrial de bacterias *E. coli* tratadas con el complejo $[\text{RhCl}(\text{Cp}^*)(\text{phbzIm})]$ mediante el Kit *XFp Cell Mito Stress Test*. Los tratamientos añadidos fueron concentraciones superiores e inferiores de la concentración inhibitoria mínima (0,214 mM). A) Modificación de la OCR en respuesta al tratamiento. B) Modificación de la ECAR en respuesta al tratamiento.

Dado que $\text{RhCl}(\text{Cp}^*)(\text{phbzIm})$ está afectando a la respiración, debiera afectar también al potencial de membrana. El potencial de la membrana bacteriana es dinámico: puede actuar como una herramienta para la señalización y el procesamiento de la información. El potencial de membrana regula una amplia gama de comportamientos bacterianos, como por ejemplo, la homeostasis del pH, el transporte de membrana, motilidad, la resistencia a antibióticos o la división celular.¹¹² Es fundamental para la proliferación bacteriana, ya que proporciona la fuerza impulsora esencial para la síntesis de ATP y es crucial para la división celular. Una estimación cuantitativa basada en el consumo de energía medido de *Escherichia coli* sugiere que el mantenimiento del potencial de membrana representa aproximadamente la mitad del consumo total de energía y, por lo tanto, está intrínsecamente relacionado con la capacidad proliferativa.¹¹³

Para valorar el efecto de $\text{RhCl}(\text{Cp}^*)(\text{phbzIm})$ sobre el potencial de membrana se empleó el ácido 1,3-dibutilbarbitúrico trimetino oxonol (DiBAC_4), que actúa como un fluoróforo que entra en las células despolarizadas provocando un cambio de color, detectándose el cambio de fluorescencia a través de citometría de flujo. Con las bacterias tratadas con $\text{IrCl}(\text{Cp}^*)(\text{phbzIm})$ no se detectó ningún cambio en la fluorescencia en comparación con las muestras control (Fig. 40A), lo que confirma su falta de efecto sobre la viabilidad bacteriana;¹¹⁴ cuando se trataron con $\text{RhCl}(\text{Cp}^*)(\text{phbzIm})$ se observó una disminución de la misma (Fig. 40B). Esto se corresponde con una hiperpolarización de la membrana, que hace que entre menos cantidad del colorante aniónico. Esto se puede explicar con los datos obtenidos en las células eucariotas, donde se vio que el compuesto de rodio afecta al metabolismo energético, alterando el estado redox de las células a través de su efecto sobre los grupos tioles, así como las variaciones en los niveles redox detectados en bacterias y la afectación en la respiración mitocondrial. Todo esto va acompañado de un incremento en el potencial de membrana para contrarrestarlo.

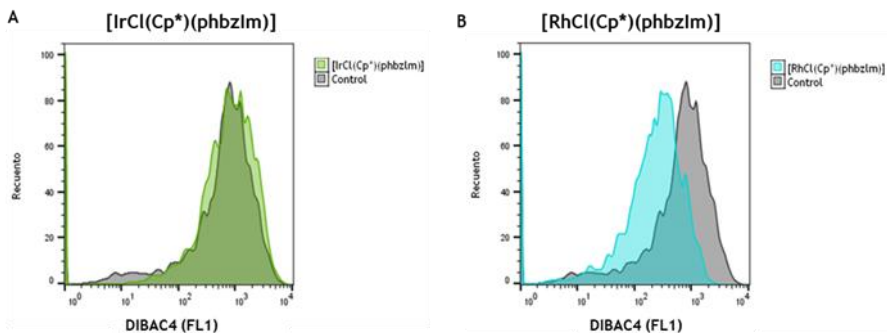


Figura 40. Determinación de cambios en el potencial de membrana. La intensidad de la fluorescencia de bacterias *E. coli* se determinó usando citometría de flujo basada en fluorescencia. DiBAC₄ (10 µg/ml) estaba presente en el medio de crecimiento para detectar cambios en el potencial de membrana tras haber tratado a las bacterias con [IrCl(Cp*)(phbzIm)] (izquierda) o [RhCl(Cp*)(phbzIm)] (derecha) a una concentración de 0,214 mM. Las imágenes son representativas de al menos tres experimentos independientes. Todos los datos se recopilaron usando el citómetro de flujo Guava EasyCyte. Los datos se analizaron empleando el software InCyte.



5.4.2 Clústeres atómicos cuánticos depositados sobre superficies de interés industrial

La plata (Ag) es un conocido metal con propiedades bactericidas empleado desde la antigüedad, aunque los mecanismos subyacentes a su efectividad todavía no son bien conocidos, encontrándose bajo debate si su citotoxicidad se debe a las nanopartículas de Ag, a los iones de Ag, o a la combinación de ambos. Además, Neissa y col.^{77,78} han demostrado la capacidad bactericida de clústeres atómicos cuánticos de plata (Ag-AQCs). Como posible aplicación industrial de los mismos, se evaluó la capacidad biocida de diferentes formulaciones de Ag-AQCs empleadas como recubrimiento de superficies. Para ello se llevó a cabo el estudio en dos superficies físicas diferentes que se adaptarían a distintas realidades industriales: portaobjetos y placas de 24 pocillos. Ambas se habrían recubierto con un revestimiento de resina conteniendo AQCs, con varias concentraciones de Ag, depositado mediante diferentes técnicas por el personal de NANOGAP SUB-NM-POWER S.A.

5.4.2.1 Efecto bactericida de AQCs depositados sobre portaobjetos

Sobre los portaobjetos, donde se habían depositado mediante *spin-coating* diversas resinas cuya eficacia se va a valorar conteniendo Ag-AQCs, se sembraron bacterias *E. coli* DH5 α y 24 horas después se estimó el efecto del revestimiento sobre el crecimiento bacteriano mediante la observación de las mismas a simple vista. En todos los casos, en aquellas zonas donde las bacterias estaban en contacto con los Ag-AQCs se obtuvo una inhibición del crecimiento bacteriano, quedando patente el efecto bactericida de los mismos, como se muestra en la Fig. 41, que se corresponde con una muestra representativa de las pruebas de esta aproximación experimental, habiéndose estudiado un total de 75 muestras.

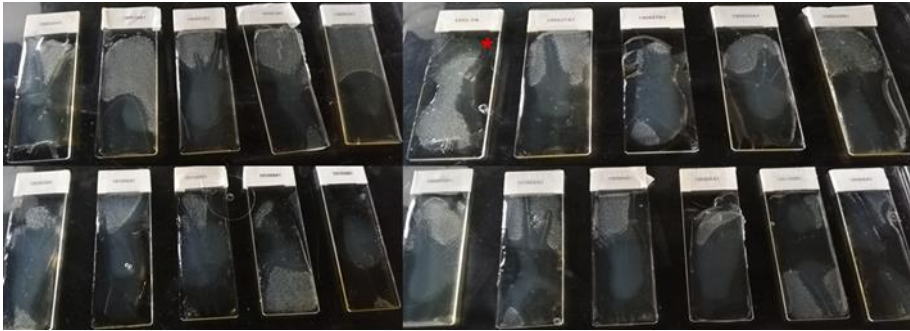


Figura 41. Estudio del efecto de Ag-AQCs sobre portaobjetos. *E. coli* sembradas en portaobjetos de revestidos con Ag-AQCs, expuestas durante 1 h y crecidas durante 24 h a 37 °C. Se observa crecimiento (zonas con mayor turbidez y aspecto punteado (*)) correspondiente con la presencia de colonias en aquellas zonas donde las bacterias no entraron en contacto con el tratamiento.

5.4.2.2 Efecto bactericida de AQCs sobre placas de cultivo

Se prepararon resinas con concentraciones crecientes de plata (0 ppm, 714 ppm, 2.000 ppm, 2.857 ppm y 3.937 ppm) que fueron depositadas en placas de 24 pocillos para medir su posible efecto sobre el crecimiento bacteriano bajo diferentes condiciones. Se sembraron bacterias *E. coli* que se expusieron al tratamiento durante 10 o 60 minutos y se dejaron creciendo durante 24 h, cuantificando su crecimiento espectrofotométricamente. A mayores, tras esta incubación, se sembraron las bacterias en placas sin Ag-AQCs durante otras 24 h para diferenciar si el efecto obtenido se correspondía con una actividad bactericida o bacteriostática. La exposición al tratamiento se realizó a diferentes temperaturas, obteniendo que a 37 °C el crecimiento bacteriano sobre las placas de 24 pocillos sufría una inhibición cercana al 100% independientemente de la dosis de plata testada. No se detectó crecimiento en las placas donde se volvieron a sembrar las bacterias, indicando que se trata de un efecto bactericida (Fig. 42). Para corroborarlo se llevó a cabo otra aproximación experimental, en la que tras la exposición al tratamiento de las bacterias *E. coli* durante 10 o 60 minutos, se realizaba un cambio de las mismas a otra placa de 24 pocillos donde se crecieron durante 24 h, tras lo que se midió su crecimiento espectrofotométricamente y se volvieron a sembrar en placas Petri incubándose durante otras 24 h. En este caso se obtuvo una

inhibición dependiente de dosis de plata cuando la exposición fue de 10 minutos: con 714 ppm de Ag, la inhibición obtenida fue del 12,34%, mientras que, con el resto de dosis, tanto con una exposición de 10 como de 60 minutos, la inhibición fue cercana al 100%; no se observó crecimiento en las placas donde se volvieron a sembrar las bacterias (Fig. 43), corroborando mediante estas dos aproximaciones que la actividad producida por estos Ag-AQCs es bactericida. Con las dosis más bajas, la capacidad bactericida está determinada por el tiempo de exposición al tratamiento.

La temperatura a la que se encuentran las superficies recubiertas por estos Ag-AQCs, podría ser determinante para su efecto, con lo que se llevaron a cabo exposiciones a 5 y 15 °C para estudiarlo. Como se muestra en la Fig. 44A, el crecimiento bacteriano es menor a 5 °C; además, las propiedades bactericidas son menores, observándose crecimiento en las placas donde se volvieron a sembrar las mismas (Fig. 44A). En cambio, cuando la exposición se realiza a 15 °C, el crecimiento bacteriano se ve inhibido de la misma forma que cuando la temperatura del proceso era de 37 °C, determinándose también que la actividad de estos Ag-AQCs es bactericida (Fig. 44B).

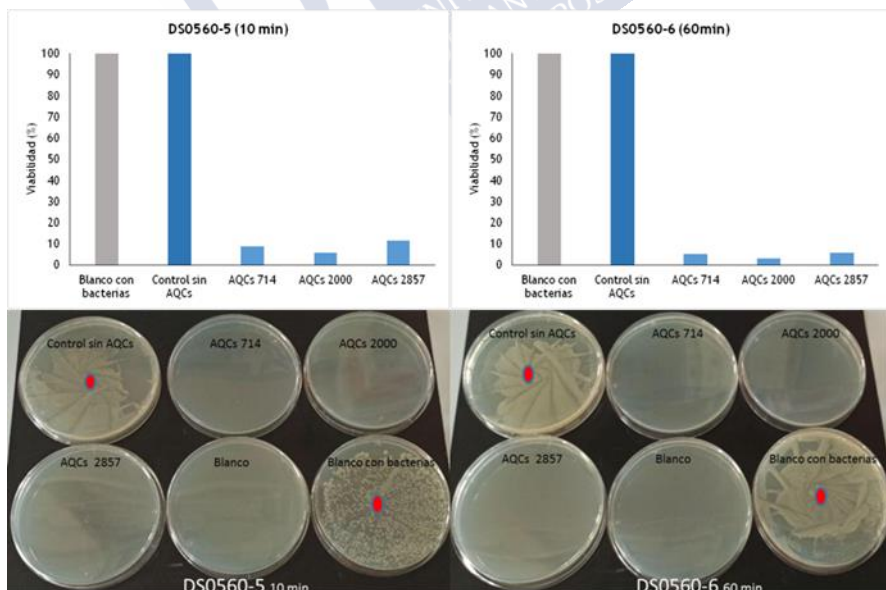


Figura 42. Viabilidad de *E. coli DH5a* sembradas en placas de 24 pocillos revestidas con diferentes concentraciones de Ag (0 ppm, 714 ppm, 2.000 ppm y 2.857 ppm) tras 10 y 60 minutos de exposición al tratamiento. Se resembraron en placas Petri sin Ag-AQCs y se dejaron crecer durante 24 h a 37 °C.

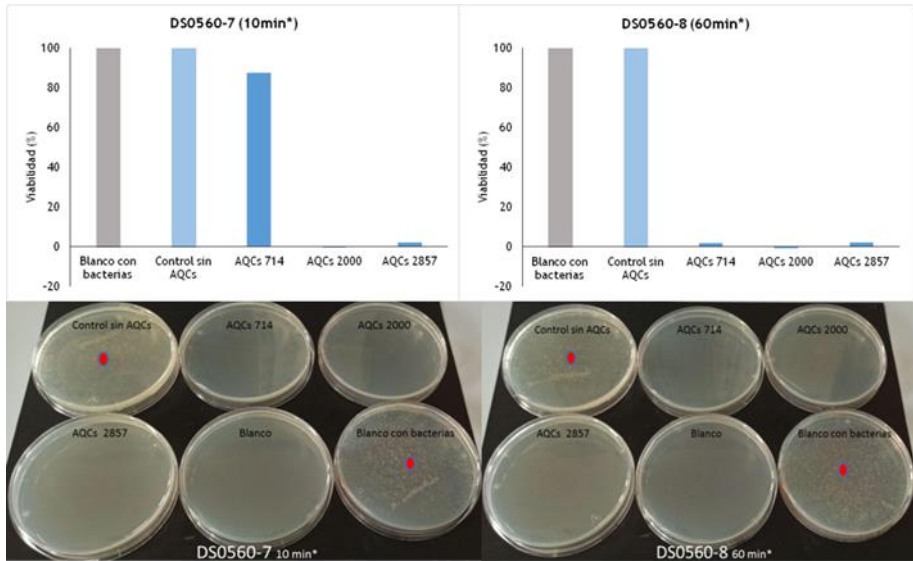


Figura 43. Viabilidad de *E. coli DH5a* sembradas en placas de 24 pocillos revestidas con diferentes concentraciones de Ag (0 ppm, 714 ppm, 2.000 ppm y 2.857 ppm) tras 10 y 60 minutos de exposición al tratamiento. Se realizó un cambio a placas de 24 pocillos sin Ag-AQCs y se dejaron creciendo durante 24 h. Se resembraron en placas Petri sin Ag-AQCs y se dejaron crecer durante 24 h a 37 °C.

De esta manera, el efecto de los clústeres de plata estudiados sobre el crecimiento bacteriano es bactericida y dependiente de la temperatura a la que se encuentren. Estos datos corroboran el mecanismo de acción de los AQCs ya que catalizan irreversiblemente la oxidación de tioles presentes en cisteínas de proteínas sensores de la homeostasis redox. La oxidación de tioles es dependiente de la temperatura y, por tanto, a temperaturas bajas (5 °C) la eficacia de los AQCs disminuye.

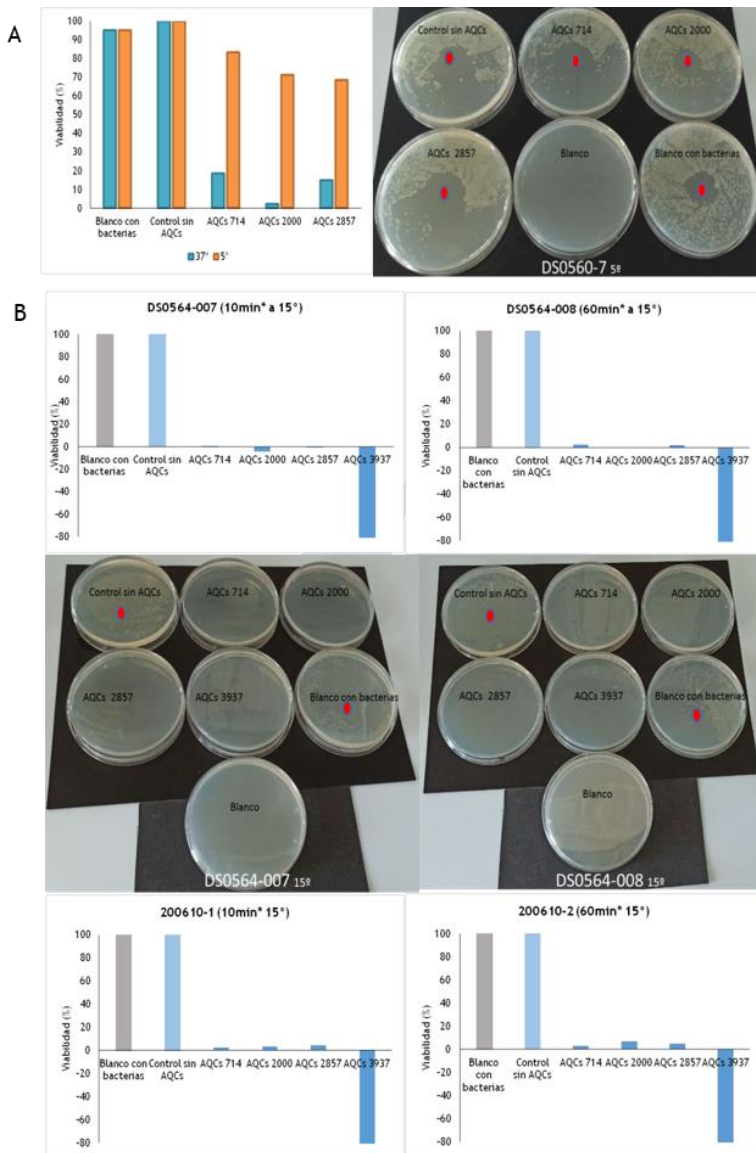


Figura 44. A) Viabilidad de *E. coli* DH5a sembradas en placas de 24 pocillos revestidas con diferentes concentraciones de Ag (0 ppm, 714 ppm, 2.000 ppm y 2.857 ppm) tras 60 minutos de exposición al tratamiento a 5 °C y 37 °C. Las muestras provenientes de la incubación a 5 °C se resembraron en placas Petri sin Ag-AQCs y se dejaron crecer durante 24 h a 37 °C. **B)** Viabilidad de *E. coli* DH5a sembradas en placas de 24 pocillos revestidas con diferentes concentraciones de Ag (0 ppm, 714 ppm, 2.000

ppm, 2.857 ppm y 3.937 ppm) tras 10 y 60 minutos de exposición al tratamiento a 15 °C. Se realizó un cambio a placas de 24 pocillos sin Ag-AQCs y se dejaron creciendo durante 24 h. Se resembraron en placas Petri sin Ag-AQCs y se dejaron crecer durante 24 h a 37 °C.

5.4.2.3 Liberación de Ag-AQCs de las resinas

Para establecer el grado de liberación de AQCs desde la resina, ya que de ser elevada va a afectar a la vida efectiva del filtro, se llevó a cabo un experimento en el que se emplearon unas membranas de diálisis *Spectra/Por*[®]7. Se introdujeron muestras de diversas resinas con Ag-AQCs con una concentración de plata de 3.937 ppm en una membrana de diálisis junto a bacterias *E. coli* DH5 α , como control positivo de la eficacia bactericida de la resina; las resinas en el interior del cartucho de diálisis, que es permeable al paso de los Ag-AQCs, pero no de las bacterias, se depositó sobre una superficie que albergaba también una solución con *E. coli* (Fig. 45); pudiendo valorar así si se liberan los Ag-AQCs, ya que de ser así migran a través de la membrana y van a afectar a las bacterias que se encuentran al otro lado de la misma. Tras el tiempo de exposición de 10 y 60 minutos, se recogieron muestras de las soluciones bacterianas y se sembraron en placas de 6 pocillos, dejándolas crecer durante 24 h; valorando espectrofotométricamente el crecimiento obtenido. Se pudo observar que la inhibición del crecimiento se produce únicamente en el interior de las membranas de diálisis donde se encontraba el tratamiento con $[Ag] = 3.937$ ppm (Fig. 46). Esto demostró que los Ag-AQCs no se liberan de forma apreciable de los revestimientos bajo estudio. Resultados similares se obtuvieron cuantificando Ag en el medio por ICP.

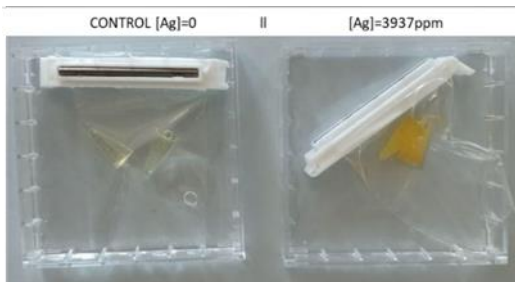


Figura 45. Montaje del experimento de migración. Cuatro condiciones diferenciadas: bacterias en el exterior y en el interior de la membrana, en contacto con muestras control o con AQCs.

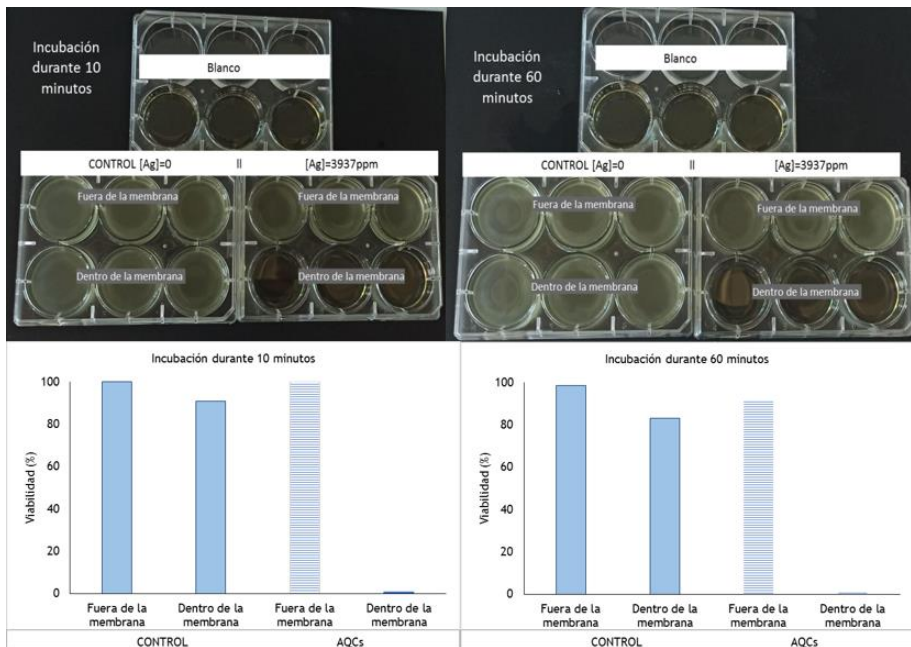


Figura 46. Experimento de migración. *E. coli DH5a* sembradas en placas de 6 pocillos que se habían expuesto a una muestra sólida de Ag-AQCs ($[Ag]=0$ ppm y $[Ag]=3.937$ ppm) durante 10 o 60 minutos: se diferencian 4 grupos, según la muestra con la que hayan estado en contacto y según su disposición espacial en las membranas de diálisis *Spectra/Por®7* (en el interior o en el exterior de la membrana). Se dejaron creciendo durante 24 h y se determinó su crecimiento espectrofotométricamente a 600 nm. El porcentaje mostrado se corresponde a los valores medios de las muestras sembradas por triplicado.

Debido a las grandes exigencias que a las que están sometidos los recubrimientos en las condiciones industriales, se decidió continuar estudiando la liberación de los Ag-AQCs bajo otros supuestos. Se estudió si su incubación previa con ciertas disoluciones podría influir; concretamente se seleccionó una solución de cloruro de sodio con una concentración de 80 g/L. Se prepararon resinas con concentraciones crecientes de plata (0 ppm, 714 ppm, 2.000 ppm, 2.857 ppm y 3.937 ppm) que fueron depositadas en placas de 24 pocillos, y se pusieron en contacto con una solución de NaCl (80 g/L) durante 72 h a 150 rpm y 60 °C, usando como control placas expuestas a agua Mili-Q. A continuación, se sembraron bacterias *E. coli* que se incubaron al durante

10 o 60 minutos a 37 °C. Después se valoró el efecto dejándolas crecer durante 24 h. Se cuantificó su crecimiento espectrofotométricamente y los resultados confirman la inhibición del crecimiento independientemente de la dosis testada (Fig. 47A). Esto nos indicó que los revestimientos de Ag-AQCs no perdieron actividad a pesar de haber estado en contacto con la solución de NaCl. Sin embargo, cuando en vez de una se realizan tres incubaciones seriadas, de 72 horas cada una, con la solución de NaCl (80 g/L) a 60 °C y 150 rpm, se obtuvo una inhibición dependiente de dosis y del tiempo de exposición: con la concentración más baja de plata (714 ppm), tras 10 minutos de tratamiento se obtuvo una inhibición del 31%, y del 71% tras 60 minutos, mientras que con las dosis más concentradas (2.000 ppm, 2.857 ppm y 3.937 ppm), la inhibición obtenida fue del 100% (Fig. 47B). Esto parece indicar que los revestimientos sí se ven afectados por haber estado en contacto prolongado con otra solución iónica, lo que habrá que tener en cuenta una vez que se estudien las posibles aplicaciones que pueden tener los mismos.

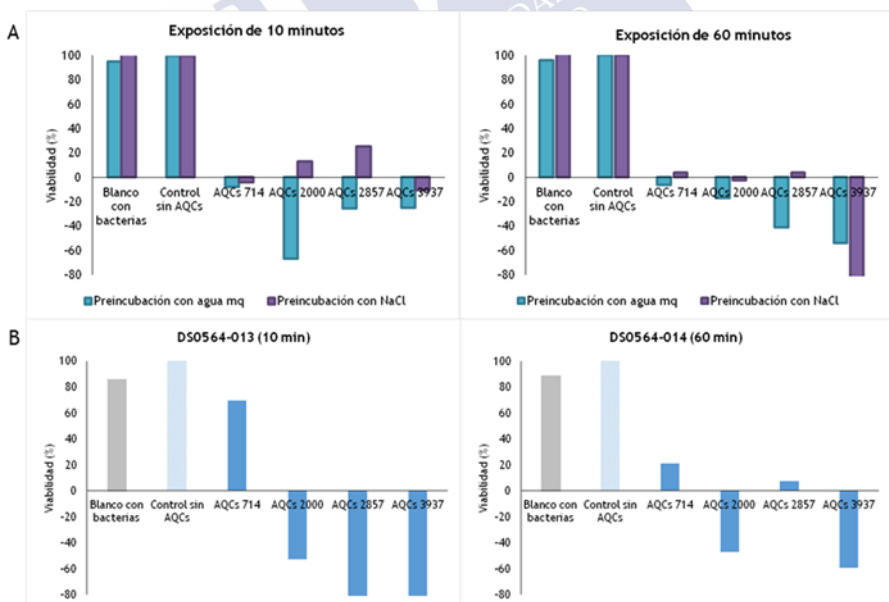


Figura 47. A) Viabilidad de *E. coli DH5a* sembradas en placas de 24 pocillos revestidas con diferentes concentraciones de Ag (0 ppm, 714 ppm, 2.000 ppm, 2.857 ppm y

3.937 ppm) tras 10 y 60 minutos de exposición al tratamiento. Las placas se habían expuesto previamente durante 72 h y a 150 rpm a una solución de NaCl (80 g/L) o bien agua Mili-Q. B) Viabilidad de *E. coli DH5a* sembradas en placas de 24 pocillos revestidas con diferentes concentraciones de Ag (0 ppm, 714 ppm, 2.000 ppm, 2.857 ppm y 3.937 ppm) tras 10 y 60 minutos de exposición al tratamiento. Las placas se habían expuesto previamente a tres incubaciones seriadas con una solución de NaCl (80 g/L), de 72 h y a 150 rpm cada una.

En resumen, a través de todas estas aproximaciones experimentales, se ha demostrado el interés que los revestimientos con Ag-AQCs pueden tener en diferentes procesos industriales. Su marcado efecto bactericida se manifiesta con tiempos cortos de exposición, y a 15 ° C ya son completamente activos. Además, se ha demostrado que no se produce una liberación sustancial de los Ag-AQCs hacia el medio en el que se llevan a cabo los tratamientos, por lo que la actividad con el paso del tiempo es buena.

6 DISCUSIÓN





Durante el desarrollo de esta tesis doctoral se han llevado a cabo una serie de trabajos con los que se pretende determinar la potencialidad terapéutica de tres compuestos organometálicos. Para ello nos basamos en el mecanismo de acción que desencadenan sobre líneas celulares tumorales, así como el estudio de su acción bactericida.

Fueron empleados tres compuestos organometálicos que presentan la estructura “half-sandwich” o “taburete de piano”, y que se sintetizaron siguiendo la tendencia en el desarrollo de nuevos compuestos metalofármacos, atendiendo a las características definidas por Sadler y col. La principal diferencia entre ellos es su centro metálico, distinguiendo entre rutenio, rodio, e iridio. Como características comunes nos encontramos su grupo saliente (Cl), y su ligando quelato (phbzIm). Los identificamos como RuCl(cym)(phbzIm), RhCl(Cp^{*})(phbzIm) e IrCl(Cp^{*})(phbzIm).

Después de haber comprobado, en trabajos previos, su efecto citotóxico sobre diferentes líneas celulares tumorales establecidas, llevamos a cabo una serie de aproximaciones experimentales con las que tratamos de establecer el mecanismo de acción a través del que desencadenan la muerte celular, paso previo necesario para determinar su potencial como agentes terapéuticos.

Los complejos con base de Ru se han presentado como los agentes anticancerígenos con base metálica más prometedores, estando ligado su mecanismo de acción a la clásica unión al ADN, por lo que constituirían una buena alternativa al cisplatino.⁷⁹ Esta es la razón por la que investigamos la acción desencadenada al tratar líneas celulares tumorales con RuCl(cym)(phbzIm). Dentro de las perturbaciones que suelen aparecer en los procesos de muerte celular, nos encontramos con alteraciones en el ciclo, produciéndose en este caso un arresto en la fase G0/G1 en la línea celular A549, y en la fase G2/M en la línea celular MCF-7; esta última carece de caspasa 3, cuya inhibición provoca un arresto en la fase G2/M como el que detectamos⁸¹, lo que explicaría el efecto diferencial provocado por el RuCl(cym)(phbzIm). Otra característica común asociada a los diferentes procesos de muerte celular, es la variación en los niveles de ROS de las células,⁶⁹ que no se vieron modificados al tratar a las células con este complejo; otras vías de muerte celular que fueron investigadas son la ferroptosis^{89,93} y la

necroptosis^{84,85}, para ello se utilizaron inhibidores específicos de las mismas^{86-88,92}, con los que no obtuvimos ningún resultado diferencial, descartando inicialmente que estos mecanismos de muerte sean los responsables principales del efecto provocado por el RuCl(cym)(phbzIm), ya que no debemos olvidar que la falta de efecto de estos inhibidores ha sido descrita en otras ocasiones.^{85,93,115} También se investigaron otros mecanismos que pudieran desencadenar el proceso apoptótico, centrándonos en la vía que se activa al producirse una situación de estrés del RE, la UPR; ésta puede activarse a través de tres mecanismos diferentes, encontrando que el RuCl(cym)(phbzIm) produce un aumento en los niveles de ATF6 a las pocas horas del tratamiento, siendo este factor de transcripción uno de los activadores de esta vía⁹⁴⁻⁹⁶. Debido a que con el paso del tiempo no se detectan niveles elevados de este factor de transcripción, pensamos que podría estarse compensando el estrés producido y no llegando a desencadenarse el proceso apoptótico a través de este mecanismo, por lo que nos centramos en el estudio de uno de los efectores finales del mismo, CHOP⁹⁸⁻¹⁰⁰: cuando se trataron las células con RuCl(cym)(phbzIm), no se detectó su activación, por lo que ésta no debe ser la vía de muerte desencadenada por el mismo, lo que se corroboró al comprobarse que la inhibición en la síntesis proteica, relacionada con la vía UPR, tampoco era muy pronunciada.

De esta manera, las alteraciones que detectamos en las células cuando las tratamos con RuCl(cym)(phbzIm) no son lo suficientemente pronunciadas como para poder determinar el mecanismo de muerte desencadenado por este complejo, por lo que son necesarias más aproximaciones experimentales que nos ayuden a determinarlo.

En el caso del RhCl(Cp*)(phbzIm), debido a las diferencias estructurales que presenta con el RuCl(cym)(phbzIm), tanto el centro metálico como el ligando areno, el mecanismo de acción desencadenado sería diferente, ya que estas características son las que lo determinarán.^{40,45,102,116} En este caso se detectó que, cuando las células se trataban con este complejo, se producía la activación de CHOP, por lo que se estaba activando la vía UPR asociada al estrés del RE y llegándose al final de la vía promoviendo la apoptosis. Debido a que se descartó la activación de ATF6 como responsable de este

proceso, ya que no se observaron niveles elevados del mismo, se exploraron modificaciones que pudieran estar afectando al proceso de plegamiento de proteínas y que estarían activando esta vía a través de PERK⁹⁴⁻⁹⁶. En este plegamiento, la formación de puentes disulfuro es una parte fundamental, viéndose afectada por la oxidación generalizada de los tioles libres. Empleamos el β -mercaptoetanol, un agente antioxidante que actúa como catalizador en el proceso de reorganización de las proteínas, en combinación con $\text{RhCl}(\text{Cp}^*)(\text{phbzIm})$, obteniendo una recuperación parcial de la viabilidad, por lo que este complejo estaría produciendo su efecto a través de la oxidación de los grupos tioles. Esto se corroboró a través del rescate parcial obtenido cuando combinamos el tratamiento de $\text{RhCl}(\text{Cp}^*)(\text{phbzIm})$ con DTT y NAC, agentes que actúan restaurando la acción de los tioles¹⁰⁶.

La alteración del estado redox de las células a través de la oxidación de los grupos tioles, afecta a múltiples dianas con las que se puede corroborar el proceso apoptótico, tales como el arresto del ciclo celular que se obtuvo con este complejo en la fase G0/G1, así como el daño en el ADN. Además, en estudios previos se vio que este complejo afectaba al funcionamiento general de las mitocondrias, pudiendo deberse a estos cambios en el estado redox, por lo que decidimos corroborar la afectación de estos orgánulos. La falta de aspartato se vuelve un factor limitante en la proliferación celular y está producida por la falta de NAD que debería regenerarse a través de la ETC,¹⁰⁸ por lo que al suplementar a las células con el mismo y ver una recuperación parcial de la viabilidad en el tratamiento con $\text{RhCl}(\text{Cp}^*)(\text{phbzIm})$, corroboramos el efecto de este complejo sobre las mitocondrias.¹⁰⁹

De esta manera, a través del efecto sobre los grupos tioles, el $\text{RhCl}(\text{Cp}^*)(\text{phbzIm})$ está afectando al estado redox las células, alterando a las mitocondrias. Esto nos hizo preguntarnos si se trataría de un compuesto adecuado como agente antimicrobiano, ya que según la hipótesis de Michael Kohanski y James Collins, los metalofármacos con efecto bactericida matarían a las bacterias a través del daño oxidativo.⁷¹ Después de haber constatado el efecto bactericida de este compuesto sobre diferentes cepas (*E. coli*, *S. aureus* subsp. *aureus*, *S. aureus*, *S. aureus* resistente a la meticilina (SARM), *E. hirae*, *E.*

faecalis, *E. coli* DH5 α), comprobamos su mecanismo de acción; para ello tratamos bacterias *E. coli* con $\text{RhCl}(\text{Cp}^*)(\text{phbzIm})$, obteniendo una elevación en los niveles de O_2^- , y para determinar si el mecanismo de muerte desencadenado se producía a través de esta alteración, repetimos el tratamiento con $\text{RhCl}(\text{Cp}^*)(\text{phbzIm})$ en condiciones de hipoxia. Sorprendentemente, obtuvimos que en estas condiciones la inhibición obtenida con el tratamiento era mayor que en condiciones de normoxia, por lo que el mecanismo de acción desencadenado por el $\text{RhCl}(\text{Cp}^*)(\text{phbzIm})$ sería diferente al desempeñado por los antibióticos actuales, incrementándose su interés terapéutico. Debido al efecto observado sobre la respiración en células tumorales, estudiamos cómo afectaba al metabolismo bacteriano, obteniendo un efecto marcado sobre el OCR, que se ve compensado por una marcada elevación de la ECAR, demostrándose que también está alterando la respiración bacteriana. Comprobamos además cómo afectaba al potencial de membrana, que es fundamental para la correcta proliferación bacteriana.

De esta manera, el $\text{RhCl}(\text{Cp}^*)(\text{phbzIm})$ se presenta como un interesante candidato antimicrobiano debido a que su capacidad bactericida no estará desempeñada a través del mecanismo más habitual,¹¹¹ y las bacterias podrían haber desarrollado menos mecanismos de defensa contra la misma.

El tercer compuesto estudiado es el $\text{IrCl}(\text{Cp}^*)(\text{phbzIm})$, que se diferencia del compuesto de $\text{RhCl}(\text{Cp}^*)(\text{phbzIm})$ únicamente en su centro metálico, y con los resultados obtenidos se demuestra la importancia que tiene el mismo en el mecanismo de acción, ya que encontramos diferencias significativas desde el primer momento: la IC_{50} asociada al mismo es mucho menor que la de los otros complejos ($16 \mu\text{M}$ frente a $43 \mu\text{M}$ del $\text{RhCl}(\text{Cp}^*)(\text{phbzIm})$ y $50 \mu\text{M}$ del $\text{RuCl}(\text{cym})(\text{phbzIm})$). Estudiando los efectos generales que tiene su tratamiento sobre células tumorales, encontramos que provoca un arresto en la fase G0/G1, así como una fuerte inhibición en la síntesis de proteínas, lo que concuerda con el arresto detectado.

Los niveles elevados de CHOP que detectamos al tratar las células con $\text{IrCl}(\text{Cp}^*)(\text{phbzIm})$ prueban que se está activando la vía apoptótica,

activándose la UPR a través de la vía de PERK, encontrándose la síntesis de proteínas fuertemente inhibida con este complejo.⁹⁸⁻¹⁰⁰

Tanto el estrés del RE como la variación del estado redox detectado (niveles de •OH elevados) y el daño sobre el ADN (modesto pero significativo), pueden aumentar la fuga de protones hacia las mitocondrias, pudiendo activar también la vía apoptótica a través de este orgánulo⁶². En estudio previos comprobamos que el IrCl(Cp*)(phbzIm) está afectando a la respiración las mismas, actuando como un agente protonóforo, por lo que la suma de estas vías estarán activando la muerte por apoptosis.

Con la finalidad de explorar nuevas aplicaciones terapéuticas para este compuesto, estudiamos su efecto sobre una línea celular no tumoral, cuyos requerimientos metabólicos son diferentes,⁵⁵ encontrando que también afecta a la respiración de las mismas, actuando como agente desacoplante, pero con un efecto menos marcado que en las células tumorales. Esta menor toxicidad nos animó a probar su potencial en el tratamiento de la obesidad, para lo que medimos la disipación de la temperatura que se producía en animales tratados con IrCl(Cp*)(phbzIm) frente a animales sin tratar. Obtuvimos un aumento de la misma que, aunque no muy elevada, podría servirnos para comenzar a explorar esta nueva vía. Para aumentar el índice terapéutico del mismo será necesario reducir su toxicidad, por lo que se nos abre un nuevo campo pendiente de explorar.

Por último, en esta búsqueda de otras aplicaciones, estudiamos su actividad antimicrobiana, encontrando que presenta un efecto bacteriostático sobre numerosas cepas (*E. coli*, *S. aureus* subsp. *aureus*, *S. aureus*, *S. aureus* resistente a la meticilina (SARM), *E. hirae*, *E. faecalis*, *E. coli* DH5 α); acerca de su mecanismo de acción, sorprendentemente encontramos los niveles de •OH elevados, lo que suele relacionarse con el daño en el ADN que desencadene la muerte celular, siendo habitual en los compuestos que presentan actividad bactericida, no bacteriostática⁷¹, pero en este caso los niveles alcanzados con el tratamiento de IrCl(Cp*)(phbzIm) no serán suficientes para producir la muerte, no resultando ser un buen candidato como agente antibiótico.

Dado el creciente problema de las resistencias bacterianas, hemos realizado una serie de experimentos con unos complejos diferentes empleados con finalidad industrial. Se tratan de clústeres atómicos de plata, metal con conocidas propiedades antimicrobianas, y cuya capacidad biocida había sido probada con anterioridad^{77,78}. Se usaron como recubrimiento en diferentes superficies, y sobre las que probamos el efecto sobre el crecimiento bacteriano bajo diferentes condiciones. Obtuvimos un marcado efecto bactericida con tiempos cortos de exposición, siendo completamente activos a partir de 15 °C, y los sometimos los recubrimientos a distintas condiciones que demostramos que no alteraban su efecto, descartando también que se produzca un desprendimiento sustancial de estos Ag-AQCs al medio, manteniendo así una buena actividad con el paso del tiempo, por lo que se presentan como unos buenos candidatos para evitar el crecimiento bacteriano en diferentes superficies que podemos encontrarnos en procesos de producción industrial.

7 CONCLUSIONES





1. La sola diferencia del metal (rodio frente a iridio) es suficiente para conferir propiedades biológicas diferentes a los complejos de $\text{RhCl}(\text{Cp}^*)(\text{phbzIm})$ e $\text{IrCl}(\text{Cp}^*)(\text{phbzIm})$.
2. El compuesto organometálico de $\text{RuCl}(\text{cym})(\text{phbzIm})$, a pesar de su semejanza estructural con los anteriores, tiene una actividad biológica muy reducida, lo que indica la importancia del átomo metálico en la acción farmacológica de estos compuestos.
3. El compuesto de $\text{RhCl}(\text{Cp}^*)(\text{phbzIm})$ induce la apoptosis a través de la oxidación de los grupos tioles, siendo un buen agente antimicrobiano al producir un efecto bactericida que es independiente de un incremento de los niveles de ROS.
4. El compuesto de $\text{IrCl}(\text{Cp}^*)(\text{phbzIm})$ actúa en la mitocondria como un protonóforo y afecta también al crecimiento bacteriano sin afectar a su viabilidad.



8 LISTADO DE ABREVIATURAS

ADN (ácido desoxirribonucleico)
Ag-AQCs (clústeres atómicos cuánticos de plata)
AMR (mecanismos de resistencia antimicrobiana)
AQCs (clústeres atómicos cuánticos)
ARN (ácido ribonucleico)
ATP (Adenosine 5'-triphosphate sodium)
ATF6 (factor de transcripción activador 6)
BHA (Hidroxianisol butilado)
CDDP (cisplatino, cis-diaminodicloroplatino (II))
CHX (cicloheximida)
CORMs (complejos liberadores de CO)
Cp* (areno ciclopentadieno)
Cym (cimeno)
DHE (indicador de superóxido dihidroetidio)
DiBAC₄ (Bis- (Ácido 1,3-Dibutilbarbitúrico) Trimetino Oxonol)
DMEN (*Dulbecco's Modified Eagle Medium low glucose*)
DME/F-12 (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Nutrient Mixture F-12 Ham*)
DMEM-Hi (*Dulbecco's Modified Eagle Medium high-glucose*)
DMSO (dimetilsulfóxido)
DO (densidad óptica)
DTT (1,4-Dithiothreitol)
EGTA (*Ethylene glycol-bis (2-aminoethylether)-N, N, N, N-tetraacetic acid*)
ENT (enfermedades no transmisibles)
ERAD (degradación asociada al RE)
ETC (cadena transportadora de electrones)
FADD (dominio de muerte asociado a FAS)
FBS (Suero Fetal Bovino)
GPX4 (glutación peroxidasa 4)
GSH (glutación)

HPF (fluoresceína 3'-(p-hidroxifenilo))
H₂O₂ (peróxido de hidrógeno)
Ir (Iridio)
IRE1 α (proteína que requiere inositol-1 α)
IRM (Resonancia magnética)
IUPAC (Unión Internacional de Química Pura y Aplicada)
KP1019b (indazolio- bis-indazol-tetracloro-rutenato)
LB (Luria Bertani)
LOX (lipoxigenasas)
MIC (concentración inhibitoria mínima)
MDR (Resistencia a múltiples fármacos)
MLKL (pseudoquinasa de linaje mixto)
MOMP (permeabilización de la membrana mitocondrial externa)
MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)
NAD (dinucleótido de nicotinamida y adenina)
NAC (N-acetil-L-cisteína)
NADPH (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato)
NAMI-A (*trans*-imidazol-dimetilsulfóxido-tetracloro rutenato)
NDGA (ácido nordihidroguaiarético)
NEC-1 (necrostatina-1)
NOXs (NADPH oxidasas unidas a la membrana)
Nrf2 (factor 2 relacionado con NF-E2)
NSA (necrosulfonamida)
OMS (Organización Mundial de la Salud)
O₂⁻ (anión superóxido)
•OH (radical hidroxilo)
PBS (tampón fosfato salino)
PCR (reacción en cadena de la polimerasa)
PERK (proteína quinasa ARN como-PKR)
PI (ioduro de propidio)
PTP (poro de transición de la permeabilidad mitocondrial)
PUFAs (ácidos grasos poliinsaturados)
RAPTA (*ruthenium arene PTA*)
RE (retículo endoplásmico)
Redox (reacción de reducción- oxidación)
Rh (Rodio)

RIP1 (receptor de serina-treonina quinasa 1)
RIPK1 (serina/treonina-proteína quinasa 1)
ROS (especies reactivas de oxígeno)
rpm (revoluciones por minuto)
RT (temperatura ambiente)
Ru (Rutenio)
SD (desviación estándar)
SDS (solución de solubilización)
SOD (superóxido dismutasa)
TCA (ácidos tricarbónicos)
TF (transferrina)
TNF (factor de necrosis tumoral)
TRADD (dominio de muerte asociado a TNFRF1)
TU (tunicamicina)
TUDCA (ácido tauroursodeoxicólico)
UPR (respuesta a proteínas mal plegadas)
UO126 (*1,4-Diamino-2,3-dicyano-1,4- bis(2-aminophenylthio)butadiene*)
8-OHdG (8-oxo-2'-desoxiguanosina)



9 BIBLIOGRAFÍA

1. Orvig C, Abrams MJ. Medicinal inorganic chemistry: Introduction. *Chem Rev.* 1999;99(9):2202-2203. doi:10.1021/cr980419w
2. Boros E, Dyson PJ, Gasser G. Classification of Metal-Based Drugs according to Their Mechanisms of Action. *Chem.* 2020;6(1):41-60. doi:10.1016/j.chempr.2019.10.013
3. Mjos KD, Orvig C. Metallodrugs in medicinal inorganic chemistry. *Chem Rev.* 2014;114(8):4540-4563. doi:10.1021/cr400460s
4. Thorburn AL. Paul Ehrlich: pioneer of chemotherapy and cure by arsenic (1854-1915). *Br J Vener Dis.* 1983;59(6):404-405. doi:10.1136/sti.59.6.404
5. Rubin RP. A brief history of great discoveries in pharmacology: In celebration of the centennial anniversary of the founding of the American Society of Pharmacology and Experimental Therapeutics. *Pharmacol Rev.* 2007;59(4):289-359. doi:10.1124/pr.107.70102
6. Bosch F, Rosich L. The contributions of Paul Ehrlich to pharmacology: A tribute on the occasion of the centenary of his Nobel Prize. *Pharmacology.* 2008;82(3):171-179. doi:10.1159/000149583
7. Farrell N. Metal Complexes as Drugs and Chemotherapeutic Agents. In: *Comprehensive Coordination Chemistry II.* ; 2003:809-840.
8. Barry NPE, Sadler PJ. Exploration of the medical periodic table: Towards new targets. *Chem Commun.* 2013;49(45):5106-5131. doi:10.1039/c3cc41143e
9. Hartinger CG, Dyson PJ. Bioorganometallic chemistry—from teaching paradigms to medicinal applications. *Chem Soc Rev.* 2009;38(2):391-401. doi:10.1039/b707077m
10. VanCamp L, Rosenberg B. Inhibition of Cell Division in

- Escherichia coli by Electrolysis Products from a Platinum Electrode. *Nature*. 1965;205:698-699.
11. Pinto AL, Lippard SJ. *Binding of the Antitumor Drug Cis-Diamminedichloroplatinum(II) (Cisplatin) to DNA*. Vol 780.; 1985.
 12. A. SL, M. CR. Christopher M. Riley. In: *Analytical Profiles of Drug Substances*. Vol 14. ; 1985:78-101.
 13. Alderden RA, Hall MD, Hambley TW, Kauffman GB. *Chemistry for Everyone The Discovery and Development of Cisplatin Products of Chemistry Edited By*. Vol 83. UTC; 2006. www.JCE.DivCHED.org
 14. Begley TP, Mukherjee A, Sadler PJ. Metals in Medicine: Therapeutic Agents. In: *Wiley Encyclopedia of Chemical Biology*. John Wiley & Sons, Inc.; 2009. doi:10.1002/9780470048672.webc333
 15. Hanif M, Hartinger CG. Organometallics in Cancer Treatment—Non-conventional Structures and Modes of Action. In: *Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering*. Elsevier; 2018. doi:10.1016/b978-0-12-409547-2.14249-0
 16. Barry NPE, Sadler PJ. 100 years of metal coordination chemistry: From Alfred Werner to anticancer metallodrugs. In: *Pure and Applied Chemistry*. Vol 86. Walter de Gruyter GmbH; 2014:1897-1910. doi:10.1515/pac-2014-0504
 17. Gasser G, Metzler-Nolte N. The potential of organometallic complexes in medicinal chemistry. *Curr Opin Chem Biol*. 2012;16(1-2):84-91. doi:10.1016/j.cbpa.2012.01.013
 18. Ernst KH, Wild FRWP, Blacque O, Berke H. Alfred Werner's coordination chemistry: New insights from old samples. *Angew Chemie - Int Ed*. 2011;50(46):10780-10787. doi:10.1002/anie.201104477
 19. Ronconi L, Sadler PJ. Using coordination chemistry to design new medicines. *Coord Chem Rev*. 2007;251(13-14 SPEC. ISS.):1633-1648. doi:10.1016/j.ccr.2006.11.017
 20. Thompson KH. Medicinal Inorganic Chemistry: Continuum of Dose versus Response-From Deficiency through Optimal Intake

- to Toxicity. *Encycl Inorg Chem*. Published online 2010:1-5. doi:10.1002/0470862106.ia471
21. Ong YC, Gasser G. Organometallic compounds in drug discovery: Past, present and future. *Drug Discov Today Technol*. Published online 2019. doi:10.1016/j.ddtec.2019.06.001
 22. Gasser G, Ott I, Metzler-Nolte N. Organometallic anticancer compounds. *J Med Chem*. 2011;54(1):3-25. doi:10.1021/jm100020w
 23. Cleare MJ, Hoeschele JD. Studies on the antitumor activity of group VIII transition metal complexes. Part I. Platinum (II) complexes. *Bioinorg Chem*. 1973;2(3):187-210. doi:10.1016/S0006-3061(00)80249-5
 24. Jakupec MA, Galanski M, Arion VB, Hartinger CG, Keppler BK. Antitumour metal compounds: More than theme and variations. *Dalt Trans*. 2008;(2):183-194. doi:10.1039/b712656p
 25. Allardyce CS, Dyson PJ. Ruthenium in medicine: Current clinical uses and future prospects. *Platin Met Rev*. 2001;45(2):62-69.
 26. Muhammad N, Guo Z. Metal-based anticancer chemotherapeutic agents. *Curr Opin Chem Biol*. 2014;19(1):144-153. doi:10.1016/j.cbpa.2014.02.003
 27. Tanaka K, Kunimatzu T, Shimakura J, Hanada M. Development of Miriplatin , a Novel Antitumor Platinum for Hepatocellular Carcinoma. *Sumitomo Kagaku*. Published online 2011:1-12.
 28. Wheate NJ, Walker S, Craig GE, Oun R. The status of platinum anticancer drugs in the clinic and in clinical trials. *Dalt Trans*. 2010;39(35):8113-8127. doi:10.1039/c0dt00292e
 29. Phillips AMF, Pombeiro AJL. Transition Metal-Based Prodrugs for Anticancer Drug Delivery. *Curr Med Chem*. 2018;26(41):7476-7519. doi:10.2174/0929867326666181203141122
 30. Fuertes M, Castilla J, Alonso C, Pérez J. Cisplatin Biochemical Mechanism of Action: From Cytotoxicity to Induction of Cell Death Through Interconnections Between Apoptotic and Necrotic Pathways. *Curr Med Chem*. 2012;10(3):257-266.

- doi:10.2174/0929867033368484
31. Bergamo A, Gaiddon C, Schellens JHM, Beijnen JH, Sava G. Approaching tumour therapy beyond platinum drugs: Status of the art and perspectives of ruthenium drug candidates. *J Inorg Biochem.* 2012;106(1):90-99. doi:10.1016/j.jinorgbio.2011.09.030
 32. Gianferrara T, Bratsos I, Alessio E. A categorization of metal anticancer compounds based on their mode of action. *Dalt Trans.* 2009;(37):7588-7598. doi:10.1039/b905798f
 33. Simpson P V., Desai NM, Casari I, Massi M, Falasca M. Metal-based antitumor compounds: Beyond cisplatin. *Future Med Chem.* 2019;11(2):119-135. doi:10.4155/fmc-2018-0248
 34. Reedijk J. Improved understanding in platinum antitumour chemistry. *Chem Commun.* 1996;(7):801-806. doi:10.1039/cc9960000801
 35. Jaouen G, Vessières A. Transition metal carbonyl oestrogen receptor assay. *Pure Appl Chem.* 1985;57(12):1865-1874. doi:10.1351/pac198557121865
 36. Ang WH, Casini A, Sava G, Dyson PJ. Organometallic ruthenium-based antitumor compounds with novel modes of action. *J Organomet Chem.* 2011;696(5):989-998. doi:10.1016/j.jorganchem.2010.11.009
 37. Köpf-Maier P, Köpf H. Non-Platinum-Group Metal Antitumor Agents: History, Current Status, and Perspectives. *Chem Rev.* 1987;87(5):1137-1152. doi:10.1021/cr00081a012
 38. Süß-Fink G. Arene ruthenium complexes as anticancer agents. *Dalt Trans.* 2010;39(7):1673-1688. doi:10.1039/b916860p
 39. Murray BS, Dyson PJ. Recent progress in the development of organometallics for the treatment of cancer. *Curr Opin Chem Biol.* 2020;56:28-34. doi:10.1016/j.cbpa.2019.11.001
 40. Bruijninx PCA, Sadler PJ. *Controlling Platinum, Ruthenium, and Osmium Reactivity for Anticancer Drug Design.* Vol 61. Elsevier; 2009. doi:10.1016/S0898-8838(09)00201-3
 41. Betanzos-Lara S, Habtemariam A, Clarkson GJ, Sadler PJ. Organometallic cis-dichlorido ruthenium(II) ammine complexes. *Eur J Inorg Chem.* 2011;(21):3257-3264.

- doi:10.1002/ejic.201100250
42. Zhang P, Sadler PJ. Redox-Active Metal Complexes for Anticancer Therapy. *Eur J Inorg Chem.* 2017;2017(12):1541-1548. doi:10.1002/ejic.201600908
 43. Bruijninx PC, Sadler PJ. New trends for metal complexes with anticancer activity. *Curr Opin Chem Biol.* 2008;12(2):197-206. doi:10.1016/j.cbpa.2007.11.013
 44. Wang F, Habtemariam A, Van Der Geer EPL, et al. Controlling ligand substitution reactions of organometallic complexes: Tuning cancer cell cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(51):18269-18274. doi:10.1073/pnas.0505798102
 45. Habtemariam A, Melchart M, Fernández R, et al. Structure-activity relationships for cytotoxic ruthenium(II) arene complexes containing N,N-, N,O-, and O,O-chelating ligands. *J Med Chem.* 2006;49(23):6858-6868. doi:10.1021/jm060596m
 46. Gichumbi JM, Friedrich HB. Half-sandwich complexes of platinum group metals (Ir, Rh, Ru and Os) and some recent biological and catalytic applications. *J Organomet Chem.* 2018;866:123-143. doi:10.1016/j.jorganchem.2018.04.021
 47. Louie AY, Meade TJ, Lippard SJ. Metal complexes as enzyme inhibitors. *Chem Rev.* 1999;99(9):2711-2734. doi:10.1021/cr9804285
 48. Jamieson ER, Lippard SJ. Structure, recognition, and processing of cisplatin-DNA adducts. *Chem Rev.* 1999;99(9):2467-2498. doi:10.1021/cr980421n
 49. Siddik ZH. Cisplatin: Mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene.* 2003;22(47 REV. ISS. 6):7265-7279. doi:10.1038/sj.onc.1206933
 50. Jolla L. C ANCER S TEM C ELLS : F UNDAMENTALS The Molecular Perspective : Cisplatin. Published online 2006:514-515.
 51. Oun R, Moussa YE, Wheate NJ. The side effects of platinum-based chemotherapy drugs: A review for chemists. *Dalt Trans.* 2018;47(19):6645-6653. doi:10.1039/c8dt00838h
 52. Hato S V., Khong A, De Vries IJM, Lesterhuis WJ. Molecular pathways: The immunogenic effects of platinum-based

- chemotherapeutics. *Clin Cancer Res.* 2014;20(11):2831-2837. doi:10.1158/1078-0432.CCR-13-3141
53. Paul D. The systemic hallmarks of cancer. *J Cancer Metastasis Treat.* 2020;2020. doi:10.20517/2394-4722.2020.63
 54. Hanahan D, Weinberg RA. The Hallmarks of Cancer. *Cell.* 2000;100(4):57-10.
 55. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell.* 2011;144(5):646-674. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013
 56. Romero-Canelón I, Sadler PJ. Next-generation metal anticancer complexes: Multitargeting via redox modulation. *Inorg Chem.* 2013;52(21):12276-12291. doi:10.1021/ic400835n
 57. Wang D, Lippard SJ. Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nat Rev Drug Discov.* 2005;4(4):307-320. doi:10.1038/nrd1691
 58. Haider T, Pandey V, Banjare N, Gupta PN, Soni V. Drug resistance in cancer: mechanisms and tackling strategies. *Pharmacol Reports.* Published online 2020. doi:10.1007/s43440-020-00138-7
 59. Bukowski K, Kciuk M, Kontek R. Mechanisms of multidrug resistance in cancer chemotherapy. *Int J Mol Sci.* 2020;21(9). doi:10.3390/ijms21093233
 60. Dallavalle, S., Dobričić, V., Lazzarato, L., Gazzano, E., Machuqueiro, M., Pajeva, I., Tsakovska I., Zidar, N., Fruttero R. Improvement of conventional anti-cancer drugs as new tools against multidrug resistant tumors. *Drug Resist Updat.* 2020;50. doi:10.1016/j.drup.2020.100682
 61. van Rijt SH, Sadler PJ. Current applications and future potential for bioinorganic chemistry in the development of anticancer drugs. *Drug Discov Today.* 2009;14(23-24):1089-1097. doi:10.1016/j.drudis.2009.09.003
 62. DeBenardinis RJ, Chandel NS. Fundamentals of cancer metabolism. *Sci Adv.* 2016;2(5). doi:10.1126/sciadv.1600200
 63. O. Warburg. On the Origin of Cancer Cells. *Science (80-).* 1956;123(3191):309-314.
 64. Vyas S, Zaganjor E, Haigis MC. Mitochondria and Cancer. *Cell.*

- 2016;166(3):555-566. doi:10.1016/j.cell.2016.07.002
65. Murphy MP, Hartley RC. Mitochondria as a therapeutic target for common pathologies. *Nat Rev Drug Discov.* 2018;17(12):865-886. doi:10.1038/nrd.2018.174
 66. Vander Heiden MG. Targeting cancer metabolism: A therapeutic window opens. *Nat Rev Drug Discov.* 2011;10(9):671-684. doi:10.1038/nrd3504
 67. Reczek CR, Chandel NS. The two faces of reactive oxygen species in cancer. *Annu Rev Cancer Biol.* 2017;1(August 2016):79-98. doi:10.1146/annurev-cancerbio-041916-065808
 68. Storz P. Reactive oxygen species in tumor progression. *Bioscience.* Published online 2005:1881-1896.
 69. Moloney JN, Cotter TG. ROS signalling in the biology of cancer. *Semin Cell Dev Biol.* 2018;80:50-64. doi:10.1016/j.semcdb.2017.05.023
 70. Trachootham D, Alexandre J, Huang P. Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: A radical therapeutic approach? *Nat Rev Drug Discov.* 2009;8(7):579-591. doi:10.1038/nrd2803
 71. Kohanski MA, Dwyer DJ, Hayete B, Lawrence CA, Collins JJ. A Common Mechanism of Cellular Death Induced by Bactericidal Antibiotics. *Cell.* 2007;130(5):797-810. doi:10.1016/j.cell.2007.06.049
 72. Sierra JM, Fusté E, Rabanal F, Vinuesa T, Viñas M. An overview of antimicrobial peptides and the latest advances in their development. *Expert Opin Biol Ther.* 2017;17(6):663-676. doi:10.1080/14712598.2017.1315402
 73. Hutchings M, Truman A, Wilkinson B. Antibiotics: past, present and future. *Curr Opin Microbiol.* 2019;51(Figure 1):72-80. doi:10.1016/j.mib.2019.10.008
 74. Morh KI. History of Antibiotics Research. In: *Springer International Publishing.* ; 2016:36. doi:10.1007/82
 75. Baquero F, Levin BR. Proximate and ultimate causes of the bactericidal action of antibiotics. *Nat Rev Microbiol.* Published online October 6, 2020. doi:10.1038/s41579-020-00443-1
 76. Zhang P, Sadler PJ. Advances in the design of organometallic anticancer complexes. *J Organomet Chem.* 2017;839:5-14.

- doi:10.1016/j.jorganchem.2017.03.038
77. Porto V, Borrajo E, Buceta D, et al. Silver Atomic Quantum Clusters of Three Atoms for Cancer Therapy: Targeting Chromatin Compaction to Increase the Therapeutic Index of Chemotherapy. *Adv Mater.* 2018;30(33):1-8. doi:10.1002/adma.201801317
 78. Neissa J, Pérez-Arnaiz C, Porto V, et al. Interaction of silver atomic quantum clusters with living organisms: bactericidal effect of Ag₃ clusters mediated by disruption of topoisomerase-DNA complexes. *Chem Sci.* 2015;6(12):6717-6724. doi:10.1039/c5sc02022k
 79. Bergamo A, Sava G. Ruthenium anticancer compounds: Myths and realities of the emerging metal-based drugs. *Dalt Trans.* 2011;40(31):7817-7823. doi:10.1039/c0dt01816c
 80. Elmore S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol.* 2007;35(4):495-516. doi:10.1080/01926230701320337
 81. Hashimoto T, Kikkawa U, Kamada S. Contribution of caspase(s) to the cell cycle regulation at mitotic phase. *PLoS One.* 2011;6(3):1-9. doi:10.1371/journal.pone.0018449
 82. Houlihan DF. Protein Turnover in Ectotherms and Its Relationships to Energetics. 1991;7:1-43. doi:10.1007/978-3-642-75897-3_1
 83. Rastrick SPS, Whiteley NM. Comparison of whole animal costs of protein synthesis among polar and temperate populations of the same species of gammarid amphipod. *Comp Biochem Physiol -Part A Mol Integr Physiol.* 2017;207:100-106. doi:10.1016/j.cbpa.2017.02.026
 84. Vandenabeele P, Galluzzi L, Vanden Berghe T, Kroemer G. Molecular mechanisms of necroptosis: An ordered cellular explosion. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2010;11(10):700-714. doi:10.1038/nrm2970
 85. Berghe T Vanden, Vanlangenakker N, Parthoens E, et al. Necroptosis, necrosis and secondary necrosis converge on similar cellular disintegration features. *Cell Death Differ.* 2010;17(6):922-930. doi:10.1038/cdd.2009.184

86. Conrad M, Pedro J, Angeli F, Vandenabeele P, Stockwell BR. Regulated necrosis : disease relevance. *Nat Publ Gr*. Published online 2016. doi:10.1038/nrd.2015.6
87. Shindo R, Kakehashi H, Okumura K, Kumagai Y, Nakano H. Critical contribution of oxidative stress to TNF α -induced necroptosis downstream of RIPK1 activation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013;436(2):212-216. doi:10.1016/j.bbrc.2013.05.075
88. Shen Z, Song J, Yung BC, Zhou Z, Wu A, Chen X. Emerging Strategies of Cancer Therapy Based on Ferroptosis. *Adv Mater*. 2018;30(12):1-15. doi:10.1002/adma.201704007
89. Dixon SJ, Lemberg KM, Lamprecht MR, et al. Ferroptosis: An iron-dependent form of nonapoptotic cell death. *Cell*. 2012;149(5):1060-1072. doi:10.1016/j.cell.2012.03.042
90. Lu B, Chen XB, Ying MD, He QJ, Cao J, Yang B. The role of ferroptosis in cancer development and treatment response. *Front Pharmacol*. 2018;8(JAN):1-8. doi:10.3389/fphar.2017.00992
91. Angeli JPF, Shah R, Pratt DA, Conrad M. Ferroptosis Inhibition: Mechanisms and Opportunities. *Trends Pharmacol Sci*. 2017;38(5):489-498. doi:10.1016/j.tips.2017.02.005
92. Li Y, Yan H, Xu X, Liu H, Wu C, Zhao L. Erastin/sorafenib induces cisplatin-resistant non-small cell lung cancer cell ferroptosis through inhibition of the Nrf2/xCT pathway. *Oncol Lett*. 2020;19(1):323-333. doi:10.3892/ol.2019.11066
93. Stockwell BR, Friedmann Angeli JP, Bayir H, et al. Ferroptosis: A Regulated Cell Death Nexus Linking Metabolism, Redox Biology, and Disease. *Cell*. 2017;171(2):273-285. doi:10.1016/j.cell.2017.09.021
94. Sano R, Reed JC. ER stress-induced cell death mechanisms. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res*. 2013;1833(12):3460-3470. doi:10.1016/j.bbamcr.2013.06.028
95. Oakes SA, Papa FR. The role of endoplasmic reticulum stress in human pathology. *Annu Rev Pathol Mech Dis*. 2015;10(October 2014):173-194. doi:10.1146/annurev-pathol-012513-104649
96. Ma Y, Brewer JW, Alan Diehl J, Hendershot LM. Two distinct stress signaling pathways converge upon the CHOP promoter

- during the mammalian unfolded protein response. *J Mol Biol.* 2002;318(5):1351-1365. doi:10.1016/S0022-2836(02)00234-6
97. Xi H, Barredo JC, Merchan JR, Lampidis TJ. Endoplasmic reticulum stress induced by 2-deoxyglucose but not glucose starvation activates AMPK through CaMKK β leading to autophagy. *Biochem Pharmacol.* 2013;85(10):1463-1477. doi:10.1016/j.bcp.2013.02.037
 98. Yang H, Niemeijer M, van de Water B, Beltman JB. ATF6 Is a Critical Determinant of CHOP Dynamics during the Unfolded Protein Response. *iScience.* 2020;23(2):100860. doi:10.1016/j.isci.2020.100860
 99. Cubillos-Ruiz JR, Bettigole SE, Glimcher LH. Tumorigenic and Immunosuppressive Effects of Endoplasmic Reticulum Stress in Cancer. *Cell.* 2017;168(4):692-706. doi:10.1016/j.cell.2016.12.004
 100. Dufey E, Sepúlveda D, Rojas-Rivera D, Hetz C. Cellular mechanisms of endoplasmic reticulum stress signaling in health and disease. 1. An overview. *Am J Physiol - Cell Physiol.* 2014;307(7):C582-C594. doi:10.1152/ajpcell.00258.2014
 101. Geldmacher Y, Oleszak M, Sheldrick WS. Rhodium(III) and iridium(III) complexes as anticancer agents. *Inorganica Chim Acta.* 2012;393:84-102. doi:10.1016/j.ica.2012.06.046
 102. Soldevila-Barreda JJ, Habtemariam A, Romero-Canelón I, Sadler PJ. Half-sandwich rhodium(III) transfer hydrogenation catalysts: Reduction of NAD⁺ and pyruvate, and antiproliferative activity. *J Inorg Biochem.* 2015;153(Iii):322-333. doi:10.1016/j.jinorgbio.2015.10.008
 103. Cao JY, Dixon SJ. Mechanisms of ferroptosis. *Cell Mol Life Sci.* 2016;73(11-12):2195-2209. doi:10.1007/s00018-016-2194-1
 104. Tait SWG, Green DR. Mitochondria and cell death: Outer membrane permeabilization and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2010;11(9):621-632. doi:10.1038/nrm2952
 105. Valavanidis A, Vlachogianni T, Fiotakis C. 8-Hydroxy-2' -deoxyguanosine (8-OHdG): A critical biomarker of oxidative stress and carcinogenesis. *J Environ Sci Heal - Part C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev.* 2009;27(2):120-139.

- doi:10.1080/10590500902885684
106. Cetinkaya A, Bulbuloglu E, Kurutas EB, Kantarceken B. N-acetylcysteine ameliorates methotrexate-induced oxidative liver damage in rats. *Med Sci Monit.* 2006;12(8):274-278.
 107. Kobrinsky NL, Sjolander DE, Goldenberg JA, Ortmeier TC. Successful treatment of doxorubicin and cisplatin resistant hepatoblastoma in a child with Beckwith-Wiedemann syndrome with high dose acetaminophen and N-acetylcysteine rescue. *Pediatr Blood Cancer.* 2005;45(2):222-225. doi:10.1002/pbc.20330
 108. Hosios AM, Matthew GVH. The redox requirements of proliferating mammalian cells. *J Biol Chem.* 2018;293(20):7490-7498. doi:10.1074/jbc.TM117.000239
 109. Vasan K, Werner M, Chandel NS. Mitochondrial Metabolism as a Target for Cancer Therapy. *Cell Metab.* 2020;32(3):341-352. doi:10.1016/j.cmet.2020.06.019
 110. Gothe Y, Marzo T, Messori L, Metzler-Nolte N. Iridium(I) Compounds as Prospective Anticancer Agents: Solution Chemistry, Antiproliferative Profiles and Protein Interactions for a Series of Iridium(I) N-Heterocyclic Carbene Complexes. *Chem - A Eur J.* 2016;22(35):12487-12494. doi:10.1002/chem.201601542
 111. Foti JJ, Devadoss B, Winkler JA, Collins JJ, Walker GC. Oxidation of the guanine nucleotide pool underlies cell death by bactericidal antibiotics. *Science (80-).* 2012;336(6079):315-319. doi:10.1126/science.1219192
 112. Benarroch JM, Asally M. The Microbiologist's Guide to Membrane Potential Dynamics. *Trends Microbiol.* 2020;28(4):304-314. doi:10.1016/j.tim.2019.12.008
 113. Stratford JP, Edwards CLA, Ghanshyam MJ, et al. Electrically induced bacterial membrane-potential dynamics correspond to cellular proliferation capacity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2019;116(19):9552-9557. doi:10.1073/pnas.1901788116
 114. Jepras RI, Paul FE, Pearson SC, Wilkinson MJ. Rapid assessment of antibiotic effects on *Escherichia coli* by bis-(1,3-dibutylbarbituric acid) trimethine oxonol and flow cytometry.

- Antimicrob Agents Chemother.* 1997;41(9):2001-2005.
doi:10.1128/aac.41.9.2001
115. Doll S, Conrad M. Iron and ferroptosis: A still ill-defined liaison. *IUBMB Life.* 2017;69(6):423-434. doi:10.1002/iub.1616
116. Dougan SJ, Habtemariam A, McHale SE, Parsons S, Sadler PJ. Catalytic organometallic anticancer complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(33):11628-11633. doi:10.1073/pnas.0800076105





El uso de los metales en el campo de la medicina data de hace más de 5.000 años, y el diseño racional de metalofármacos ha sido un área profundamente estudiada desde la inclusión del cisplatino en clínica, que ha guiado la búsqueda de nuevos complejos, abriéndose camino los compuestos organometálicos. En este trabajo hemos empleado tres compuestos con estructura “half-sandwich”, cuya diferencia fundamental es el centro metálico: Ru (II), Rh (III), Ir (III), presentando todos ellos capacidad antitumoral, desencadenando alteraciones biológicas diferenciadas que inician el mecanismo de muerte a través de distintas vías. Se ha estudiado su capacidad biocida debido al creciente problema asociado a la resistencia antimicrobiana.