Universitat de Girona

Facultat de Ciències

Memòria del Treball Final de Grau

Títol del treball:

Estudi de l'activitat biològica de compostos organometàl·lics com agents antitumorals vehiculitzats amb anàlegs de la Bombesina.

Estudiant: Inés Romero Pérez Grau en Biologia

Correu electrònic: inro2011ies@gmail.com

Tutor: Anna Massaguer Vall-llovera

Cotutor*:

Empresa / institució: Universitat de Girona

Vistiplau tutor (i cotutor*):

Nom del tutor: Anna Massaguer Vall-Llovera
Nom del cotutor*:

Empresa / institució: Universitat de Girona; Facultat de Ciències; Departament de Biologia: Àrea Bioquímica del Càncer.

Correu(s) electrònic(s): anna.massaguer@udg.edu

*si hi ha un cotutor assignat

Data de dipòsit de la memòria a secretaria de coordinació:

Agraïments

M'agradaria donar les gràcies a totes les persones que, d'una manera o una altre, m'han ajudat a fer possible aquest treball. Donar les gràcies a tots els membres del departament de Bioquímica del càncer, especialment a la Dra. Anna Massaguer Vall-llovera, per acollir-me en el seu grup, orientar-me i ajudar-me en l'elaboració del treball. Gràcies per la teva dedicació i paciència.

També m'agradaria donar les gràcies a la Dra. Maria Ángeles Martínez Lorente, del departament de Química de la Universitat de Girona, per estar sempre disposada a ajudar en diferents aspectes importants del treball. Donar les gràcies als meus companys de laboratori, la Judit Salvà i en Sergi Rueda, per aconseguir un molt bon ambient de treball i ajudar-me sempre que ho he necessitat.

Per descomptat, donar les gràcies a la meva família, en especial als meus pares i a la meva cosina, per animar-me i ajudar-me constantment. Sense tots vosaltres, tot hagués sigut molt més difícil d'aconseguir.

Moltes gràcies a tothom.

Resum

El càncer de pròstata (CaP) és la sisena causa de mort per càncer entre homes. Els diversos tractaments contra aquesta neoplàsia generen efectes tòxics a l'organisme, a causa d'actuar tant en cèl·lules canceroses com en aquelles que són normals. Un nou enfocament anomenat "teràpia dirigida" pretén solvatar els problemes dels tractaments convencionals. Dins d'aquestes teràpies, una estratègia consisteix en unir els agents antitumorals a molècules que tinguin un receptor sobreexpressat en cèl·lules canceroses, per tal de dirigir-los de forma selectiva cap aquestes.

En la línia cel·lular de càncer de pròstata (PC3), s'ha descrit la sobreexpressió del receptor del "Gastrin releasing peptide" (GRP), el qual presenta com a lligand un pèptid homòleg a la Bombesina, que actua com a potent factor de creixement. La utilització de pèptids derivats de la Bombesina permetria doncs vehiculitzar agents antitumorals específicament cap a les cèl·lules PC3.

També s'ha descrit que diversos complexos organometàl·lics presenten activitat antitumoral depenent de fotoactivació, el que permetria tenir compostos només actius sobre les cèl·lules tumorals, quan aquestes són irradiades.

El principal objectiu d'aquest estudi és la caracterització de l'activitat biològica de diversos compostos organometàl·lics basats en platí i ruteni, conjugats a pèptids anàlegs a la Bombesina. Per això, mitjançant tècniques de cultius cel·lulars, s'ha estudiat el seu efecte sobre la viabilitat de cèl·lules de càncer de pròstata. A més, s'ha estimat la capacitat dels diferents compostos a ser fotoactivats, mitjançant la seva irradiació a λ = 447 nm.

A partir de les diferents tècniques emprades, s'ha identificat el compost de platí L com a possible agent antitumoral, a causa del seu potent efecte sobre la viabilitat cel·lular. A més, s'ha descrit la capacitat del complex de ruteni B de ser fotoactivable, fet que el classificaria com a prodroga no-tòxica capaç d'exercir activitat citotòxica de forma controlada, a partir de la seva irradiació.

També s'ha comprovat que la conjugació dels diferents compostos a un pèptid anàleg a la Bombesina i a una seqüència de localització nuclear (NLS), incrementen la internalització i l'activitat dels compostos en cèl·lules canceroses. A més, ambdós pèptids utilitzats com a transportadors són capaços d'arribar a nucli; essent la seqüència NLS la causant d'una major acumulació a nucli dels compostos vehiculitzats.

Resumen

El cáncer de próstata (CaP) es la sexta causa de muerte por cáncer entre hombres. Los diversos tratamientos contra esta neoplasia generan efectos tóxicos en el organismo, a causa de actuar tanto en células cancerosas como en aquellas que son normales. Un nuevo enfoque denominado "terapia dirigida" pretender solventar los problemas de los tratamientos convencionales. Dentro de estas terapias, una estrategia consiste en unir los agentes antitumorales a moléculas que tengan un receptor sobreexpresado en células cancerígenas, dirigiéndolos de forma selectiva hacia estas.

En la línea celular de cáncer de próstata (PC3), se ha descrito la sobreexpresión del receptor del "Gastrin releasing peptide" (GRP), el cual presenta como ligando un péptido homólogo a la Bombesina, que actúa como potente factor de crecimiento. La utilización de péptidos derivados de la Bombesina permitiría entonces vehiculizar agentes antitumorales específicamente hacia las células PC3.

También se ha descrito que varios complejos organometálicos presentan actividad antitumoral dependiente de fotoactivación, lo que permitiría tener compuestos solo activos sobre las células tumorales, cuando estas son irradiadas.

El principal objetivo de este estudio es la caracterización de la actividad biológica de varios compuestos organometálicos basados en platino y rutenio, conjugados a un péptido análogo a la Bombesina. Por eso, mediante técnicas de cultivos celulares, se ha estudiado el efecto sobre la viabilidad de células de cáncer de próstata. Además, se ha estimado la capacidad de los diferentes compuestos a ser fotoactivables, a partir de su previa irradiación a λ = 447 nm.

A partir de las diferentes técnicas empleadas, se ha identificado el compuesto de platino L como posible agente antitumoral, debido a su potente efecto sobre la viabilidad celular. Además, se ha descrito la capacidad del complejo de rutenio B de ser fotoactivable, hecho que lo catalogaría como prodroga no-tóxica capaz de ejercer actividad citotóxica de forma controlada, a partir de su irradiación.

También se ha comprobado que la conjugación de los diferentes compuestos a un péptido análogo a la Bombesina y a una secuencia de localización nuclear (NLS), incrementan la internalización y actividad del compuesto en células cancerosas. Asimismo, ambos péptidos utilizados como transportadores son capaces de llegar a núcleo; siendo la secuencia NLS la causante de una mayor acumulación a núcleo de los compuestos vehiculizados.

Abstract

The prostate cancer (CaP) is between men the sixth cause of cancer death. The diverse treatments used against this neoplasm include mainly toxic effects on the organism, due to acting in both cancer cells and those that are normal. A new focus named “target delivery” tries to solve the problems of conventional treatments. Within therapies, one strategy involves joining antitumour agents to molecules that have an overexpressed receptor in cancer cells, to target them selectively.

In prostate cancer cell line (PC3), the overexpressed receptor “Gastrin releasing peptide” (GRP) has been described, which presents as a ligand a peptide homolog to Bombesin, this one acts as a potent growth factor. The use of peptides derived from the Bombesin would carry antitumor agents specifically to PC3 cells.

It has also been described that several organometallic complexes display antitumour activity depending on photoactivation, which would only allow active compounds on tumor cells when they are irradiated.

The main objective of this study is the characterization of the biological activity of various organometallic compounds based on platinum and ruthenium, conjugated to an analogue peptide to the Bombesin. For this reason, its effect on the viability of prostate cancer cells has been studied, with the use of cell culture techniques. In addition, the ability of the different compounds to be photoactivated has been estimated, by means of its irradiation at $\lambda = 447$ nm.

Based on the different techniques used, platinum L compound has been identified as a possible antitumor agent, due to its potent effect on cell viability. In addition, the ability of the ruthenium B complex to be photoactivable has been described, which would classify it as a non-toxic prodrug capable of exerting cytotoxic activity in a controlled way, from its irradiation.

It has also been shown that the conjugation of the different compounds to a peptide analogue to the Bombesin and a sequence of nuclear localization (NLS), increase the internalization and activity of compounds in cancer cells. In addition, both peptides used as carriers can reach the nucleus; being the NLS sequence the cause of a greater accumulation at the nucleus of the compounds transported.

ÍNDEX

1. Introducció 1
1.1. Definició de càncer 1
1.2. Càncer de pròstata 1
1.3. Tractaments 1
1.4. Compostos de Ruteni 4
1.5. Disseny de nous compostos metàl·lics anticancerígens 4
1.6. Vehiculització amb pèptids 5
1.7. Bombesina 6
1.8. Seqüència senyal de localització nuclear (NLS) 7
2. Objectives 7
3. Material i mètodes 8
3.1. Complexes organometàl·lics utilitzats 8
3.1.1. Anàlegs de Bombesina i Seqüència de Localització Nuclear 8
3.2. Línia cel·lular 9
3.3. Tècniques de cultius cel·lulars 9
3.3.1. Descongelació línia cel·lular PC3 9
3.3.2. Tripsinització i subcultiu 10
3.3.3. Recompte cel·lular 11
3.3.3.1. Recompte per Cambra de Neubauer 11
3.3.3.2. Recompte per Scepter 12
3.3.4. Assaig de proliferació cel·lular MTT. 12
3.3.4.1. Activitat antiproliferativa dels possibles agents antitumorals 12
3.3.4.2. Fotoactivació dels compostos K, B i 9lys-B 14
3.3.5. Cinètica citotoxicitat cisplatí vs compost L 15
3.3.6. Citometria de flux 16
3.3.7. Microscòpia Confocal de fluorescència 17
3.4. Anàlisi estadística 18
4. Resultats 18
4.1. Anàlisi comparatiu de l'activitat citotòxica de diferents compostos de Pt i Ru 18
4.2. Fotoactivació dels compostos K, B i 9lys-B 20
4.3. Estudi de la cinètica d'actuació dels compostos L i cisplatí 23
4.4. Assaig d'internalització per citometria de flux 24

4.5. Observació de la localització cel·lular dels diferents pèptids per microscòpia de fluorescència..... 25
5. Discussió..... 26
5.1. Discussió de resultats..... 26
5.2. Ètica i sostenibilitat..... 28
6. Conclusions..... 28
7. Bibliografia..... 29

1. Introducció

1.1. Definició de càncer

El càncer és una de les principals causes de morbiditat i mortalitat en tot el món (Mantovani, 2009), essent responsable de més de 8 milions de morts cada any a escala mundial (Nassbau et al., 2015). Les cèl·lules canceroses, anomenades també cèl·lules neoplàsiques, proliferen desafiant els controls normals cel·lulars, alterant així la societat multicel·lular de la qual formen part. Aquest procés és iniciat a partir de l'aparició d'una mutació en una cèl·lula, proporcionant a aquesta un avantatge selectiu que permet la seva proliferació cel·lular descontrolada. Cicles repetits de mutació, competència i selecció natural provoquen l'aparició de clons de cèl·lules mutants (Bruce et al., 2008), les quals s'acumulen en un punt concret del cos; causant els anomenats tumors o neoplasmes (Nassbau et al., 2015).

En el cas que les cèl·lules neoplàsiques romanguin agrupades juntes en una única massa, es diu que el tumor és benigne. En aquesta etapa, es pot aconseguir una cura completa mitjançant l'eliminació de la massa quirúrgicament. Un tumor és considerat càncer quan aquest és maligne, és a dir, quan les seves cèl·lules han adquirit la capacitat d'envair teixits diferents de l'original. La invasió en general implica la capacitat de desprendre's, entrar als vasos limfàtics o torrent sanguini, essent capaces d'envair i colonitzar els teixits circumdants (metàstasi) (Bruce et al., 2008).

1.2. Càncer de pròstata

El càncer de pròstata (CaP) és la sisena causa de mort per càncer entre homes (Center et al., 2012), presentant una incidència mundial de 25,3 per cada 100.000 individus. El càncer de pròstata es defineix com a neoplàsia glandular maligna (adenocarcinoma), principalment de les cèl·lules luminals de l'òrgan glandular (acini). Segons les nocions actuals, l'origen d'aquesta neoplàsia no és trobada en cèl·lules secretores (cèl·lules finals ja diferenciades), sinó en cèl·lules precursores o mare, amb diferenciació secretora (Ramon & Dennis, 2007).

Avui en dia, es troba establert que el creixement del càncer de pròstata és depenent de la presència d'hormones, especialment d'andrògens. D'aquesta manera, s'utilitzen teràpies centrades en bloquejar i disminuir la seva acció en el CaP. Com a tractaments farmacològics utilitzats, trobem la injecció d'anàlegs de l'hormona alliberadora de gonadotropina (GnRH), i el bloqueig de la unió dels andrògens als receptors d'andrògens (AR). A més, el càncer de pròstata és tractat a partir de teràpies deprivatives d'androgen (ADT), les quals es basen en eliminar la producció de testosterona per eliminació quirúrgica (prostatectomia). Aquesta tècnica permet la prevenció de la unió de testosterona als seus receptors cel·lulars, essent la teràpia més comunament utilitzada (Horwich, 2010; Rojas, 2017).

1.3. Tractaments

El tractament contra el càncer requereix la comprensió de les propietats especials que les cèl·lules canceroses adquireixen a mesura que evolucionen, es multipliquen i es propaguen. Aquestes propietats especials inclouen alteracions en les vies de senyalització cel·lulars relacionades amb el control i manteniment de la proliferació cel·lular, ocasionant a les cèl·lules d'un tumor ignorar els senyals procedents del seu entorn (Bruce et al., 2008).

El tractament del càncer depèn del tipus de càncer i l'etapa de la malaltia (Ramaswami et al., 2016). Actualment, els tractaments utilitzats es troben dividits en quatre tipus principalment: cirurgia, radioteràpia, quimioteràpia i teràpia biològica, on les diferents modalitats s'utilitzen sovint en combinació.

Referent a la quimioteràpia, aquesta és definida com el subministrament de substàncies químiques que provoquen alteracions cel·lulars, ja sigui en la síntesi d'àcids nucleics, divisió cel·lular o síntesi de proteïnes. Com a resultat, interfereixen en el procés de proliferació cel·lular, ocasionant l'apoptosi de les cèl·lules afectades. Avui en dia, la majoria d'agents quimioterapèutics lamentablement tenen els seus objectius diana tant en teixits tumorals com en aquells que són normals, com per exemple el cisplatí, utilitzat en el tractament de diferents tipus de càncers. D'aquesta manera, el subministrament de substàncies químiques pot acabar produint un efecte tòxic a l'organisme (Sausville & Longo, 2001).

Hi ha diferents problemes associats als diversos tractaments utilitzats. Per exemple, la cirurgia no pot ser utilitzada si el tumor és de tipus invasiu, per tant aquesta només serà útil si el tumor és benigne o es detecta en les primeres etapes del desenvolupament en una única localització (Ramaswami et al., 2016). En relació a la radioteràpia, aquesta consisteix en utilitzar altes dosis de radiació que provoquen danys a les cèl·lules canceroses, com per exemple talls de doble cadena en el DNA. Tanmateix, la radiació també pot afectar a cèl·lules no cancerígenes, per tant els nivells de radiació han de ser controlats amb precisió (Sausville & Longo, 2001).

Per superar els inconvenients que aquests tractaments poden causar, s'estan desenvolupant noves estratègies en el disseny de nous fàrmacs pel tractament del càncer, basant-se en la utilització d'agents dirigits (Ramaswami et al., 2016). Aquest terme fa referència a petites molècules, generalment amb massa molecular inferior a 1500 Da, que interactuen amb molècules específiques expressades selectivament en cèl·lules tumorals (Moucheron, 2009).

Cisplatí:

El cisplatí (*cis*-diamminedichloroplatinum II) és un fàrmac anticancerígen que ha demostrat activitat antitumoral en un gran nombre de neoplasmes humans (Prestayko et al., 1980). És una molècula petita, composta per un ió de platí rodejat per dos lligands clor i dos lligands amoníac. Presenta una geometria plana quadrada, i només la seva forma *cis* confereix la seva determinada activitat antitumoral, essent per tant la forma *trans* la causant de la no activitat del compost (Goodsell, 2006).

Avui en dia, l'entrada de cisplatí a l'interior de la cèl·lula encara no és totalment coneguda. Les últimes evidències apunten al fet que el procés pot ser donat per difusió passiva o a través de proteïnes transportadores, essent destacats els transportadors de coure Ctr 1 i Ctr 2 (Ciarimboli, 2012). El cisplatí és activat una vegada es troba a l'interior de la cèl·lula, on la disminució en la concentració de clor produeix la pèrdua d'estabilitat del compost. D'aquesta manera, es dóna la pèrdua dels seus dos lligands clor, els quals són reemplaçats per molècules d'aigua (Desari & Tchounwou, 2014; Goodsell, 2006). El producte resultant d'aquest procés és un potent electròfil que pot reaccionar amb qualsevol nucleòfil, inclosos els grups sulfhidril de proteïnes i els àtoms donadors de nitrogen en àcids nucleics. El cisplatí s'uneix al centre reactiu N7 en residus de purina causant danys en l'àcid desoxiribonucleic, corbant a més la seva estructura. Si aquest dany al DNA no es pot reparar per la maquinària de reparació cel·lular, es bloqueja el procés de divisió cel·lular, donant com a resultat la mort cel·lular apoptòtica (Figura 1) (Desari & Tchounwou, 2014).

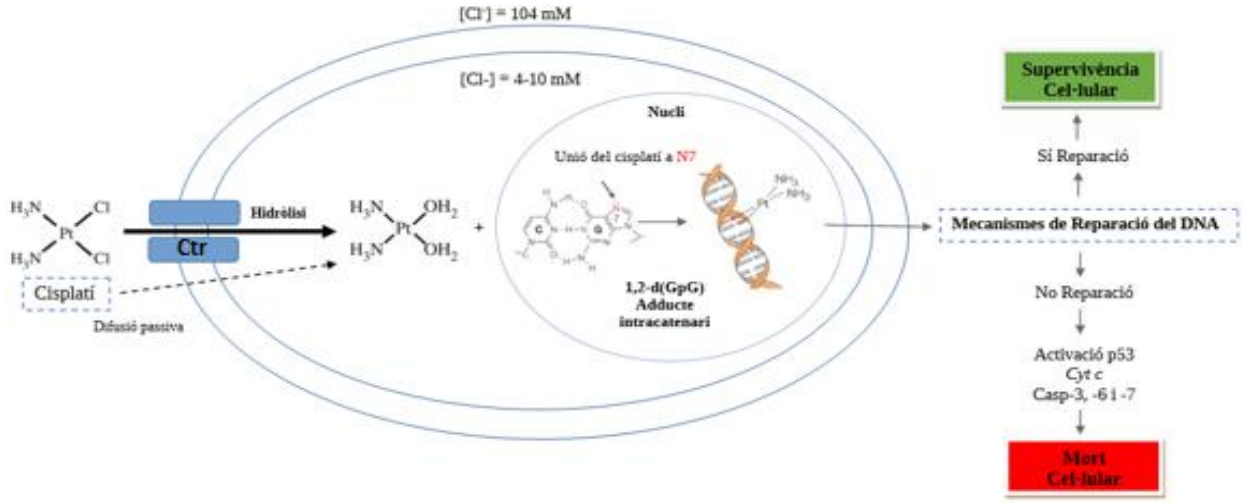

Figura 1: Simplificació del mecanisme d'acció del cisplatí, el qual comprèn la captació i activació cel·lular, interacció específica amb el DNA, i el possible posterior destí cel·lular. Extret i modificat de Johnstone et al., 2015, Kelland., 2007 i Shamseddine, A. I., & Farhat, F. S., 2011.

Una resposta comuna quan les cèl·lules experimenten danys en el DNA, és l'aturada de la progressió del cicle cel·lular, per tal d'intentar reparar el dany abans que aquest passi a les cèl·lules filles. D'aquesta manera, es dóna la prevenció de la transmissió de lesions inductores de determinades mutacions. El dany que experimenta el DNA com a resultat del tractament amb cisplatí, indueix la detenció del cicle cel·lular, procés que condueix a l'alliberament del citocrom c en els mitocondris, l'escissió posterior de la procaspasa 9, i l'activació de les caspases 3,6 i 7. Aquestes caspases degraden components cel·lulars que són essencials per a la viabilitat (Johnstone et al., 2015).

Existeixen diferents problemàtiques relacionades amb la utilització del cisplatí com agent antitumoral. El principal problema és la no discriminació entre cèl·lules normals i aquelles que són cancerígenes, fet que provoca que el seu mecanisme d'acció també afecti aquelles cèl·lules no tumorals. La quimioteràpia amb cisplatí s'associa amb efectes secundaris substancials que inclouen hepatoxicitat, nefrotoxicitat, neurotoxicitat i/o danys hematotòxics (Desari & Tchounwou, 2014). A més, molts tumors usualment esdevenen resistents al cisplatí durant el tractament. Aquest fet es troba relacionat majoritàriament per un increment en la reparació de danys en el DNA, o per un augment en la tolerància de les lesions produïdes en aquest (Borst et al., 2008).

Una estratègia sorgida durant l'última dècada per evitar efectes secundaris tòxics, consisteix en la utilització de compostos no tòxics de platí (Pt (IV)), on la seva activitat pot ser activada de manera lumínica directament en el lloc en el qual el càncer és localitzat. D'aquesta manera, és possible utilitzar compostos Pt (IV) com profàrmacs que poden ser activats per la llum, alliberant les espècies anticancerígines actives només en les cèl·lules tumorals irradiades. D'aquesta manera, diferents compostos de platí poden ser fotoactivats i poden formar enllaços creuats Pt-nucleòtid en residus de guanina, similars als danys produïts pel cisplatí (Moucheron, 2009). Una altra estratègia però, seria conjugar els compostos de platí a pèptids portadors que tinguessin els seus receptors sobreexpressats en cèl·lules tumorals, evitant així la interacció amb cèl·lules no cancerígenes (Mukhopadhyay et al., 2017).

1.4. Compostos de Ruteni

Els compostos anticancerígens de ruteni es defineixen com a complexos de coordinació alternatius als fàrmacs basats en compostos de platí. En comparació a aquests, els compostos de ruteni proporcionen un major potencial com agents antitumorals, ja que disposen d'una toxicitat reduïda.
Per entendre el seu mecanisme d'acció, cal remarcar que els complexes de Ru (II) són més reactius que els complexes de Ru (III). Com que les cèl·lules canceroses presenten un patró de creixement i multiplicació molt més ràpid que les cèl·lules normals, es crea un ambient més pobre en oxigen a causa de la seva elevada taxa metabòlica. La combinació d'aquest ambient amb els nivells més alts de glutatió i la disminució del pH, produeix la creació d'un entorn químicament reductor (Brabec, V., & Nováková, O. 2006). Aquesta característica permet que se subministrin complexes de Ru (III) (profàrmacs menys actius i no tòxics), que poden ser activats per reducció a Ru (II) únicament on les cèl·lules canceroses es troben localitzades.
Dins del grup de compostos organometàlics que contenen ruteni en la seva estructura, existeixen dos complexes que ja es troben en fase II d'estudis clínics: NAMI-A i KP1019 (Bergamo et al., 2012).

NAMI-A: El complex mostra activitat antimetastàsica, independentment del tipus de tumor i de l'etapa de creixement de la metàstasi. El seu mecanisme d'acció sembla implicar diversos factors, entre els quals es troben: interacció amb la regulació del cicle cel·lular, portant a una acumulació de cèl·lules en G2/M, augment de la matriu extracel·lular al voltant de la vascularització del tumor, evitant que aquest pugui envair teixits propers i els vasos sanguinis, i unió als àcids nucleics; afectant per tant directament al DNA de la cèl·lula tumoral (Antonarakis & Emadi., 2010).

KP109: A diferència de NAMI-A, aquest segon compost posseeix activitat directa citotòxica, promovent l'apoptosi en línies cel·lulars cancerígenes. El seu mecanisme d'acció, encara poc conegut, sembla implicar diferents aspectes: unió a la transferrina, activació per reducció a Ru (II) i inducció d'apoptosis via mitocondrial, a través de la despolarització de la membrana cel·lular. Aquest procés és independentment de l'estat de p53 en cèl·lules tumorals, suggerint que el trencament de cadenes de DNA no és el mecanisme dominant en l'acció del compost (Hartinger et al., 2006).

1.5. Disseny de nous compostos metàl·lics anticancerígens

Actualment, nombrosos investigadors han focalitzat els seus estudis en la recerca de diferents fàrmacs anticancerígens basats en compostos metàl·lics, permetent l'aplicació de quimioteràpies alternatives a les basades en cisplatí. En aquest context, s'han descrit tres famílies de compostos que tenen una potent activitat biològica: compostos de Pt o Ru amb lligands tipus polypyridyl, nous compostos de Pt derivats del cisplatí i compostos organometàlics de Ru-areno (Martínez et al.,2017). Els lligands polypyridyl confereixen als diferents complexos propietats fotoactivables, i la capacitat d'intercalar-se al DNA (Han Ang, W., & Dyson, P. J., 2006). A diferència d'aquests, els lligands areno destaquen per la seva capacitat d'estabilitzar els complexes de ruteni en el seu estat d'oxidació +2, a més d'influenciar en la captació cel·lular i seves les possibles interaccions amb les dianes biològiques (Yan et al., 2005).

A la **Figura 2** es troben representats diferents compostos de Pt i Ru sintetitzats pel grup de recerca del Dr. Fèlix Jalón (Universidad de Castilla – La Mancha) que tenen les estructures anteriorment descrites. Aquests compostos es van seleccionar per diferents aspectes estructurals: presència de sistemes d'anells plans aromàtics i/o heterocíclics que són capaços d'inserir-se o intercalar-se entre els parells de bases de la doble cadena del DNA (compostos L i B), càrrega positiva global dels compostos que pot ocasionar l'atracció

electrostàtica amb la cadena aniònica de fosfats del DNA (compostos L i B), i la capacitat d'interacció amb el DNA a partir de la formació d'enllaços covalents (compostos L i K) (Martínez et al., 2017).

A més, els diferents compostos es caracteritzen per la presència d'un grup àcid carboxílic (COOH) en un dels seus lligands. Aquest grup proporciona la capacitat de conjugar-se amb un pèptid que pot oferir la possibilitat d'augmentar l'especificitat del fàrmac antitumoral. A més, el complex B podria presentar la possibilitat de ser activat en presència de llum, actuant inicialment com a profàrmac sense activitat citotòxica. L'activitat antitumoral d'aquests compostos descrits, serà analitzada en aquest TFG.

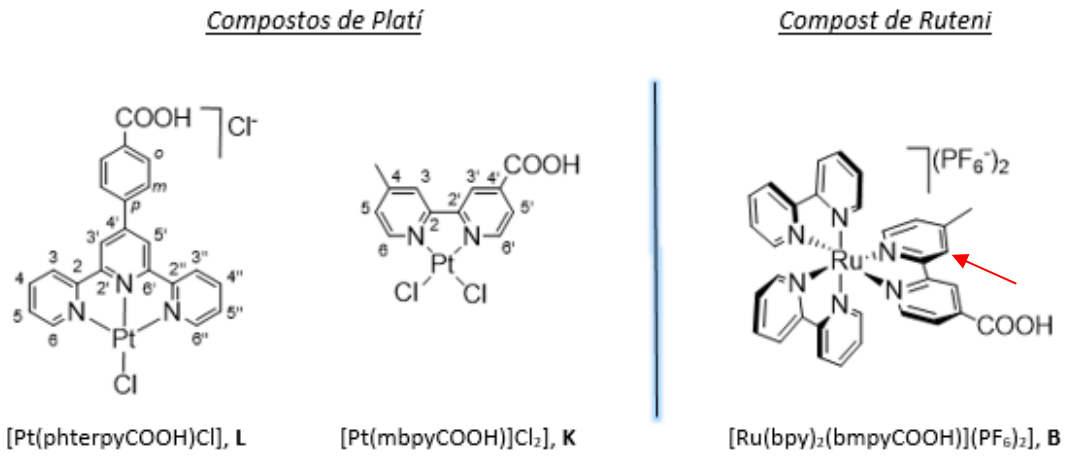

Figura 2: Estructura química dels compostos de platí L i K i del compost de ruteni B. Numeració dels àtoms dels lligands que formen part del compost. En vermell trobem senyalat els lligands tipus polypyridyl del compost B. Extret i modificat de Martínez et al., 2017.

1.6. Vehiculització amb pèptids

La quimioteràpia convencional es troba limitada per la resistència originada en cèl·lules tumorals i per la toxicitat ocasionada en cèl·lules normals. El principal problema de la quimioteràpia és la falta d'especificitat cel·lular en el mètode d'actuació. Un nou enfocament, anomenat "teràpia dirigida", va ser introduït amb l'objectiu d'augmentar l'eficàcia de la quimioteràpia sistèmica i reduir la toxicitat inespecífica dels fàrmacs convencionals.

Molts tumors malignes sobreexpressen receptors de pèptids, permetent una major interacció i internalització dels seus lligands específics. Una innovadora aplicació utilitza petits pèptids com a vehicles (*carriers*), per entregar fàrmacs citotòxics a les cèl·lules tumorals. La utilització del lligand natural pel receptor sobreexpressat conjugat amb una molècula citotòxica (complex lligand – fàrmac), pot dirigir-se específicament a les cèl·lules canceroses. D'aquesta manera, aquelles cèl·lules que segueixen patrons normals de proliferació es veuran afectades mínimament, fet causat per la diferenciació en la sobreexpressió del receptor en qüestió. Els compostos citotòxics conjugats a pèptids són molt menys tòxics que els respectius agents quimioterapèutics, fet que els podrien convertir en importants agents anticancerígens (Yoon et al., 2011).

És important però, que la teràpia mediada per receptor presenti la internalització del complex lligand – receptor en la cèl·lula cancerosa, de manera posterior a la seva unió específica (Okarvi, 2008).

1.7. Bombesina

La bombesina (BN) és un pèptid de 14 aminoàcids, aïllat per primera vegada a la pell de la granota europea *Bombina bombina*, l'any 1971. S'han trobat un gran nombre de pèptids similars a la bombesina en amfibis i mamífers, i s'agrupen en tres subfamílies basades en el tripèptid ubicat a l'extrem C-terminal: el pèptid alliberador de gastrina (GRP), la neuromedina C (GRP20-29) i neuromedina B (NMB). S'ha demostrat que els pèptids tipus bombesina modulen la contracció de la musculatura llisa, així com les secrecions exocrines i endocrines en teixits gastrointestinals, pàncrees i pituïtària (Sano et al., 2004), mantenint també els cicles circadians.

El pèptid homòleg equivalent en mamífers és el pèptid alliberador de la gastrina (GRP), i els seus receptors (GRP-r) es troben expressats abundantment a la membrana de determinades cèl·lules tumorals, estimulant el seu creixement (Arteaga de Murphy & Ferro-Flores, 2005). Aquesta sobreexpressió es troba present en una àmplia varietat de càncers, inclosos el càncer de pròstata, mama, pàncrees, gastrointestinal i pulmonar, entre altres (Okarvi, 2008). Concretament, s'ha descrit que les cèl·lules de càncer de pròstata presenten una densitat superior de GRP-r en la seva superfície en comparació amb altres cèl·lules de càncer en humans (Suresh et al., 2014).

A més del receptor freqüentment expressat en tumors malignes, també s'han identificat altres tres tipus de receptors de Bombesina, com el receptor de la neuromedina B (NMB) i els receptors BB3 i BB4; essent aquests dos últims els que presenten una major afinitat per BN de la totalitat de receptors descrits (Arteaga de Murphy & Ferro-Flores, 2005).

La seqüència compresa entre els aminoàcids 7-14 a l'extrem C-terminal de la Bombesina és crítica per la unió del receptor i la seva activitat biològica (Okarvi, 2008), mentre que els primers aminoàcids presents a la regió N-inicial poden ser modificats sense ocasionar cap efecte biològic en BN.

Seqüència aminoacídica Bombesina:

pGlu-Gln-Arg-Leu-Gly-Asn-**Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-Met-NH_2**

S'ha demostrat que els tumors induïts en rates amb la línia cel·lular PC3 de càncer de pròstata humà, es redueixen notablement a partir de l'administració d'antagonistes de BN (Arteada de Murphy & Ferro-Flores, 2005). Des del descobriment de la Bombesina com a potent factor de creixement en molts tipus de cèl·lules tumorals, s'ha considerat l'interès de dissenyar i desenvolupar lligands antagonistes competitius del receptor BN/GRP. Mitjançant el bloqueig dels enllaços de BN als seus receptors, aquests antagonistes bloquegen els efectes fisiològics d'aquest pèptid, inhibint el creixement de les cèl·lules tumorals que responen a la promoció del creixement mediat per Bombesina (Okarvi, 2008). A més, si es conjuga la Bombesina a un agent citotòxic, la internalització del conjugat Bombesina – compost unit al receptor produeix que l'agent citotòxic entri específicament al tumor que sobreexpressi el receptor, i romangui en el teixit diana per llargs períodes de temps. Com a resultat, es produeixen danys a les cèl·lules tumorals sense malmetre les cèl·lules i teixits circumdants (Arteaga de Murphy & Ferro-Flores, 2005).

La internalització dels fàrmacs es dóna a partir de la interacció entre els conjugats de BN i els receptors sobreexpressats GRP; complex que internalitza mitjançant el mecanisme d'endocitosi mediat per receptor. Posteriorment, els complexes endocitats són alliberats des dels endosomes al citosol, ocasionant l'alliberament del fàrmac directament dins la cèl·lula en qüestió (Mukhopadhyay et al., 2007; Suresh et al., 2014).

1.8. Seqüència senyal de localització nuclear (NLS)

El nucli de les cèl·lules es troba aïllat del citoplasma per una membrana doble. La membrana nuclear es troba formada per complexes de porus nuclear (PNP), a través dels quals es produeix el pas exclusiu de molècules en ambdues direccions (Yao et al., 2013).

Les seqüències senyal de localització nuclear (NLS) estan descrites com una classe de pèptids altament catiònics, formats per aminoàcids bàsics amb una longitud inferior a 12 residus. Aquests majoritàriament són responsables del transport de proteïnes del citoplasma al nucli. Aquests pèptids catiònics han demostrat la seva capacitat de travessar la membrana citoplasmàtica i entrar a les cèl·lules, podent ser utilitzades per dirigir molècules conjugades a nucli; lloc d'actuació de nombrosos agents quimioterapèutics (Ragin et al., 2002).

2. Objectives

The main purpose of this project is the characterization of the biological activity of new targeted anticancer drugs composed by metal compound based in ruthenium (B) and platinum (L and K) conjugated to different Bombesin analogues as carrier peptides. The main objectives on this work are as follows:

- Comparison of the antiproliferative activity of compounds L, K and B on prostate cancer cells.

- Analysis of the antiproliferative activity of the compounds conjugated to the Bombesin analogues with and without a nuclear localization sequence (NLS) as a targeted delivery mechanism.

- Analysis of the effect of photoactivation on the antitumor activity of the compounds, since the activity of some ruthenium complexes can be activated after exposure to light.

- Comparison between the kinetics of the compounds with antitumoral activity and the kinetics of the anticancer drug cisplatin.

- Analysis of the internalization capacity of the Bombesin analogue, conjugated or not to a nuclear localization sequence, and their capacity of reaching at the cell nucleus using flow cytometry and confocal fluorescence microscopy.

3. Material i mètodes

3.1. Complexes organometàl·lics utilitzats

Inicialment, es va fer la preparació de les solucions mare dels compostos en pols a una concentració de 1000 µM. Es van pesar els diferents compostos en una balança analítica d'alta precisió (Mettler Toledo AX 205-DR) i es van diluir posteriorment amb el solvent orgànic DMSO (vehicle) i aigua miliQ estèril. El DMSO és un dissolvent orgànic necessari per a dissoldre els components poc solubles en aigua, tals com els utilitzats en aquest estudi (Wu et al., 2011). Cal tenir en compte que el % de DMSO no ha de ser superior a un 5% per cada 100 µL de solució preparada, ja que aquest podria esdevenir tòxic per les cèl·lules (Wu et al., 2011).

3.1.1. Anàlegs de Bombesina i Seqüència de Localització Nuclear

Estudis previs realitzats al departament de Bioquímica del càncer, en col·laboració amb el departament de Química a la Universitat de Girona, van comparar l'eficiència de vehiculització de diferents pèptids anàlegs a la Bombesina per a la seva posterior utilització en diferents estudis. Entre aquests, es va determinar el pèptid 9 sintetitzat *in vitro* com el millor pèptid anàleg a Bombesina, ja que era el que presentava una major internalització en les cèl·lules PC3. El pèptid 9 presenta una massa molecular de 1490,71 g/mL, i es troba compost per 13 aminoàcids. A diferència de la Bombesina, s'ha eliminat el grup piroglutàmic N-terminal, ja que aquest impossibilitaria la seva unió tant al compost metàl·lic com a una molècula de fluoresceïna; la qual és necessària pels assajos d'internalització per citometria de flux. A més, s'ha substituït la metionina C-terminal per una Leucina. En el cas del pèptid 9lys, la seqüència aminoacídica és idèntica a l'anterior, addicionant una Lisina per tal de separar el compost conjugat del punt d'unió entre pèptid i receptor (Taula 1).

A partir dels compostos L, K i B, en col·laboració amb el grup LIPPSO del Departament de Química, Udg, es van sintetitzar diferents conjugats en els quals els compostos metàl·lics es van unir a diferents pèptids portadors: dos pèptids anàlegs a Bombesina (pèptid 9 i pèptid 9lys) i un pèptid anàleg de la Bombesina amb una seqüència NLS (pèptid 9-NLS). En concret es van preparar dos conjugats amb el compost K: 9-K i 9-NLS-K, i un conjugat amb el compost B: 9lys-B.

Taula 1: Comparació de la seqüència aminoacídica de la Bombesina amb els seus pèptids anàlegs utilitzats en aquest estudi (9 i 9lys), i la seqüència de localització nuclear (NLS).

Seqüència aminoacídica Bombesina:	pGlu-Gln-Arg-Leu-Gly-Asn-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-Met-NH_2
Seqüència aminoacídica Pèptid 9:	Gln-Arg-Leu-Gly-Asn-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-Leu-NH_2
Seqüència aminoacídica Pèptid 9lys:	Gln-Arg-Leu-Gly-Asn-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-Leu-Lys-NH_2
Seqüència de Localització Nuclear:	Asp-Pro-Lys-Lys-Lys-Arg-Lys-Val

3.2. Línia cel·lular

La línia cel·lular utilitzada en aquest projecte, PC3 (ATT, USA), té origen en cèl·lules d'adenocarcinoma de pròstata humana. Les cèl·lules creixen en medi complet DMEM BioWhittaker™ (obtingut de Lonza), el qual es troba suplementat amb 4.5 g/L de D-glucosa, 1% L-glutamina, 1% de penicil·lina/estreptomicina i 10% de sèrum boví fetal (FBS). El medi de cultiu utilitzat ha de ser temperat en un bany d'aigua a 37ºC prèviament a la seva utilització.

Les cèl·lules són manipulades en una cabina de flux laminar tipus II (Faster-Bio 48) i són cultivades en un incubador amb una atmosfera humida amb 95% d'aire i un 5% de CO_2 a 37ºC (Thermo Scientific Heraeus Function Line). A l'inici del projecte les cèl·lules es trobaven criopreservades en medi complet per creixement suplementat amb un 10% (v/v) de DMSO a -196ºC en nitrogen líquid.

3.3. Tècniques de cultius cel·lulars

Entenem com a cultius cel·lulars l'extracció de cèl·lules d'animals o plantes i el seu subseqüent creixement en un ambient artificial favorable. Les cèl·lules poden ser extretes d'un teixit directament i ser disgregades per mitjans enzimàtics o mecànics abans de procedir a la realització del cultiu, o poden ser derivades d'una línia cel·lular o soca cel·lular que ja ha estat establerta.

Després de l'aïllament de les cèl·lules en qüestió, aquestes proliferaran sota les condicions apropiades en un cultiu primari, fins que ocupin tot el substrat viable (confluència visible entre un 80-90%). En aquest punt, les cèl·lules han de ser subcultivades realitzant la seva transferència a un nou flascó amb medi de creixement fresc, proporcionant l'espai necessari perquè el seu creixement continuï en curs.

Condicions de cultiu: Les condicions de cultiu varien àmpliament per cada tipus de cèl·lula, però l'ambient artificial en el qual les cèl·lules es cultiven invariablement, consisteix en un recipient adequat que conté un substrat o un medi que subministra els nutrients essencials (aminoàcids, carbohidrats, vitamines, minerals, factors de creixement, hormones, gasos (O_2, CO_2) i regula l'ambient físico-químic (pH, pressió osmòtica, temperatura)) (Thermo Fisher Scientific., 2015). A continuació, es descriuen els protocols de les tècniques de cultius cel·lulars que s'han realitzat en aquest treball.

3.3.1. Descongelació línia cel·lular PC3

Fonament de la tècnica:

El procés de criopreservació en cultius cel·lulars consisteix en la conservació en fred de cèl·lules viables procedents d'un subcultiu. Les cèl·lules són tractades amb l'agent crioprotector apropiat (per exemple DMSO), i guardades a temperatures inferiors a -130ºC fins que aquestes siguin necessàries. El DMSO s'utilitza com a crioprotector a causa de la seva habilitat de prevenir l'acumulació excessiva d'electròlits i altres substàncies durant el procés de congelació. D'aquesta manera, s'evita la formació de cristalls de gel que trenquen l'estructura de la membrana (Àvila-Portillo et al., 2006). Un cop es requereixi la seva utilització, aquestes seran descongelades en el seu criotub amb medi DMEM 10% FBS fins que el DMSO present esdevingui dissolt completament.

Protocol:

- Treure el criotub de cèl·lules congelades del tanc de nitrogen líquid (-196ºC).
- Afegir en un tub falcon estèril 9 mL de medi DMEM 10% FBS prèviament temperat a 36ºC en bany d'aigua.
- En condicions d'esterilitat, afegir medi DMEM 10% FBS gota a gota sobre les cèl·lules congelades fins que el criotub es trobi completament ple.
- Quan el gel es trobi desfet en la seva totalitat, recollir la suspensió cel·lular amb una pipeta i afegir al tub falcon amb medi preparat anteriorment. Homogeneïtzar la barreja en el transcurs d'aquest pas.
- Centrifugació del tub amb la suspensió cel·lular a 1500 rpm durant 5 minuts en una centrífuga refrigerada a 4ºC (Eppendorf – centrifuge 5804R).
- Eliminar el sobrenadant per aspiració amb una pipeta de vidre acoblada a la bomba de buit. Resuspendre el *pellet* en sec i, a continuació, resuspendre'l amb 10 mL de medi complet.
- Transferir la suspensió cel·lular en un flascó T75 (75 cm^2 de superfície).
- Introduir el flascó dins de l'incubador a 37ºC, 5% CO_2 i un 80% d'humitat relativa (cultiu de cèl·lules adherents).

3.3.2. Tripsinització i subcultiu

Fonament de la tècnica:

Quan s'observa un cultiu de cèl·lules adherents (en flascó de 75 cm^2) en el microscopi invertit (Olympus CKX41), i aquest ha arribat a la confluència desitjada (80-90% de la monocapa), es procedeix al procés de tripsinització. Aquest procés utilitza la solució Trypsin-EDTA (0.25%) (Gibco®) que combina l'enzim proteolític tripsina amb l'agent quelant EDTA; combinació que ocasiona el trencament de les unions de tipus proteic cèl·lula-cèl·lula i cèl·lula-matriu. Cal limitar el temps d'exposició de les cèl·lules als agents quelants i enzims proteolítics, ja que un temps excessiu podria danyar-les. D'aquesta manera, l'addició posterior de medi complet DMEM amb 10% de FBS produeix que les proteïnes del sèrum inactivin la tripsina i es subministrin suficients ions Ca^{2+} i Mg^{2+} per tal que l'EDTA no pugui segrestar la totalitat d'ions presents.

Protocol:

- Eliminar el medi per aspiració amb una pipeta de vidre estèril connectada a una bomba de buit. No deixar que les cèl·lules s'assequin.
- Rentat amb 10 mL de tampó fosfat PBS. Tapar i remenar suaument el flascó.
- Aspiració del tampó mitjançant una pipeta de vidre estèril connectada a la bomba de buit.
- Afegir la solució de tripsina-EDTA temperada prèviament a 37ºC en el bany d'aigua. Deixar actuar dins de l'incubador a 37ªC durant 5 minuts.
- Observar les cèl·lules al microscopi invertit. Si aquestes no es troben surant, colpejar els costats del flascó per tal d'acabar de desenganxar les cèl·lules. No exposar les cèl·lules a la tripsina més temps del necessari.
- Neutralitzar ràpidament l'acció de la tripsina-EDTA afegint 6 mL de medi DMEM 10% FBS. Resuspendre molt bé durant el transcurs d'aquest pas.
- En el cas de que es vulgui realitzar un subcultiu, deixar aproximadament 1.5 mL dels 10 mL finals del flascó. Descartar els mL restants i omplir el flascó inicial amb medi DMEM 10% FBS fins a 20 mL finals. Aquest procés cal repetir-ho cada 3 o 4 dies (segons el tipus cel·lular), per tal de mantenir les cèl·lules en fase de creixement exponencial.

3.3.3. Recompte cel·lular

3.3.3.1. Recompte per Cambra de Neubauer

Fonament de la tècnica:

Per tal de poder quantificar el nombre de cèl·lules presents en una suspensió, s'utilitza un portaobjectes d'uns 30 x 70 mm i 4 mm de gruix amb una petita depressió central; el qual és anomenat cambra de Neubauer (Figura 3). Aquesta presenta a la part central una quadrícula de 3 x 3 mm en la qual es realitza el comptatge de 4 àrees d'1 mm^2 de superfície cadascuna. Per sobre d'aquesta quadrícula és on es col·loca el cubreobjectes per tal d'observar la preparació al microscopi òptic invertit.

Per tal de poder distingir entre cèl·lules vives i mortes, s'utilitza el colorant Trypan Blue Solution (0,4%), on les cèl·lules mortes es trobaran tenyides de blau a causa de la pèrdua d'integritat de membrana, fet que ocasiona l'entrada del colorant. En relació al recompte cel·lular, aquest es realitza a partir de la mitjana aritmètica del nombre de cèl·lules entre les 4 àrees quantificades. Per tal d'obtenir la concentració total en la suspensió cel·lular, s'haurà de tenir en compte el volum comprès entre cada àrea i el cubreobjectes (0,1 mm^3) i la dilució realitzada en el recompte amb el colorant.

Protocol:

- Tripsinització de les cèl·lules PC3 (veure punt 3.3.2).
- Centrifugar el medi amb les cèl·lules recollides en el tub falcon a 1500 rpm durant 5 minuts en una centrífuga refrigerada.
- Eliminar el sobrenedant amb una pipeta de vidre acoblada a una bomba de buit. Resuspendre el *pellet* en sec. Resuspendre novament el *pellet* amb 5 mL de medi DMEM 10% FBS.
- Posar en un tub eppendorf de 1,5 mL 75 µL del colorant Trypan Blue i 25 µL de la suspensió cel·lular obtinguda (dilució 1:4). Homogeneïtzar la barreja.
- Col·locar un cubreobjectes sobre el portaobjectes de la cambra de Neubauer.
- Agafar 10 µL de la barreja amb Trypan Blue preparada anteriorment i dipositar-la entre el portaobjectes i el cubreobjectes de la cambra. La barreja entrarà a aquesta per capil·laritat.
- Escollir l'objectiu de 10x del microscopi i enfocar la quadrícula. Comptar el nombre de cèl·lules vives presents en els 16 quadres de les 4 àrees utilitzades pel recompte.
- Determinar la concentració total de cèl·lules per mL de mostra a partir dels paràmetres plasmats a la fórmula mostrada a continuació:

$$\frac{N\,º\ total\ de\ cèl\cdot lules}{mL} = \frac{x\ cèl\cdot lules}{0{,}1\ \mathrm{mm3}} \times \frac{1\ mm3}{1\mu\mathrm{L}} \times \frac{10\text{^}3\ \mu\mathrm{L}}{1\ mL}$$

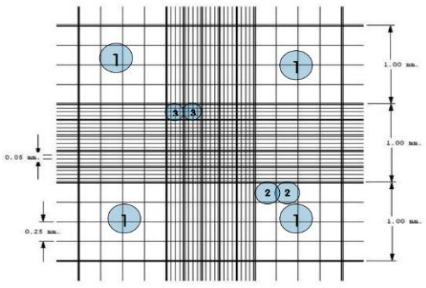

Figura 3: Quadrícula de 3x3 mm present a la Cambra de Neubauer, amb les quatre àrees utilitzades per a la realització de la mitjana aritmètica del recompte cel·lular. Extret de Bastidas, 2009.

3.3.3.2. Recompte per Scepter

Fonament de la tècnica:

Scepter™ Handheld Automated Cell Counter és un comptador de cèl·lules automàtic que realitza el recompte de qualsevol partícula que, en passar pel sensor d'un sol ús amb un filtre de 40 µM de diàmetre acoblat a la seva base, produeix un canvi en la resistència elèctrica, el qual pot ser quantificat com a recompte cel·lular. El sensor permet realitzar un comptatge comprès entre 50.000 – 1.500.000 cèl·lules/mL. Només es realitzarà el recompte d'aquelles cèl·lules que presentin la mida establerta dins del rang de diàmetres cel·lulars (8 µm i 25 µm), excloent així aquelles cèl·lules aberrantment grans o petites. El volum mínim total de mostra requerit pel comptatge és de 100 µL.

Protocol:

- Tripsinització de les cèl·lules PC3 (veure punt 3.3.2.).
- Centrifugar el medi amb les cèl·lules recollides en el tub falcon a 1500 rpm durant 5 minuts en una centrífuga refrigerada.
- Eliminar el sobrenedant amb una pipeta de vidre acoblada a una bomba de buit. Resuspendre el *pellet* en sec. Resuspendre novament el *pellet* amb 5 mL de medi DMEM 10% FBS.
- Realitzar dilució 1:4 amb PBS en un tub eppendorf de 1,5mL (150 µL PBS + 50 µL suspensió cel·lular).
- Col·locar el sensor de 40 µL a la base del Scepter.
- Submergir el sensor descrit dins de la suspensió cel·lular del tub eppendorf realitzat anteriorment. Esperar que l'aparell realitzi el recompte total de les cèl·lules en la mostra.

3.3.4. Assaig de proliferació cel·lular MTT.

3.3.4.1. Activitat antiproliferativa dels possibles agents antitumorals

Fonament de la tècnica:

L'estudi de l'activitat antiproliferativa mitjançant l'assaig MTT, és l'anàlisi més realitzat en el tractament de cèl·lules cancerígenes. La prova MTT consisteix en un assaig colorimètric basat en la reducció del Bromur de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazon (MTT). Aquesta s'origina a partir de l'enzim mitocondrial NADH deshidrogenasa de cèl·lules metabòlicament actives, el qual transforma el MTT (compost hidrofòbic de color groc) en un compost violeta hidrofòbic (formazan). La quantitat de cèl·lules vives és proporcional a la quantitat de formazan produït (major o menor intensitat de color), i aquest és secretar per les cèl·lules en forma de cristalls violetes que precipiten a la base dels pouets. Aquest paràmetre és quantificat a partir de la dissolució dels cristalls en un solvent orgànic (DMSO) i la posterior lectura de l'absorbància per espectrofotometria en cada pou a 570 nm, a partir lector de plaques (Lector Multi-Modal Synergy 4).

A partir de la tècnica descrita, es comprovarà l'activitat antiproliferativa dels diferents compostos descrits a diferents concentracions (Taula 2). A més, es realitzaran controls sense tractament a cada placa tractada (descrits com el 100% de viabilitat cel·lular), i s'avaluaran els efectes del DMSO en la supervivència cel·lular (vehicle dels diferents compostos organometàl·lics) i de l'aigua (vehicle dels pèptids sols).

Per tal de realitzar posteriors anàlisis estadístics, les diferents concentracions de cada compost seran testades per triplicat. A partir dels resultats obtinguts, es podrà donar el valor de IC_{50} per cadascun dels possibles agents antitumorals; valor corresponent a la concentració necessària per reduir el creixement cel·lular en un 50% *in vitro.*

Taula 2: Visualització dels diferents compostos utilitzats a cadascuna de les concentracions avaluades per triplicat. S'indiquen, a més, les concentracions dels diferents vehicles utilitzats (DMSO i H_2O) per cada compost en concret.

COMPOSTOS		CONCENTRACIONS AVALUADES
L		25 µM, 10 µM, 5 µM, 2,5 µM, 1 µM
K		100 µM, 50 µM, 25 µM
9-K		100 µM, 50 µM, 25 µM, 10 µM
9-NLS-K		100 µM, 50 µM, 25 µM, 10 µM
Pèptid 9		100 µM, 50 µM, 25 µM
Pèptid 9-NLS		100 µM, 50 µM, 25 µM
Vehicles:	*L i K → 10% DMSO*	**V-10:** 100 µM,50 µM, 25 µM, 10 µM, 5 µM, 2.5 µM
	9-K → 17% DMSO	**V-17:** 100 µM, 50 µM, 25 µM
	9-NLS-K → 27% DMSO	**V-27:** 100 µM, 50 µM, 25 µM
	9 i 9-NLS → 100% H_2O	**V-H_2O:** 100 µM, 50 µM, 25 µM, 10 µM, 2.5 µM

Protocol:

Dia 1

- Observació de les cèl·lules en creixement exponencial en el microscopi òptic invertit. Per tal de realitzar el tractament aquestes hauran d'estar entre un 40% de confluència.
- Tripsinització i recompte cèl·lules (per cambra de Neubauer o Scepter). Veure punts 3.3.2. i 3.3.3.
- A partir del recompte efectuat es calcularà el volum de suspensió cel·lular i medi DMEM 10% FBS necessari per tenir una concentració final de 6.000 cèl·lules per pou si el tractament és fa l'endemà. En el cas en què el temps d'espera entre la sembra i els tractaments sigui de dos dies, realitzarem els càlculs per tal de tenir una concentració final de 4.000 cèl·lules per pou.
- Introduir en un tub falcon els µL pertinents a la suspensió cel·lular i medi complet necessaris.
- Abocar la barreja anterior en una cubeta de plàstic estèril. Mitjançant una pipeta multicanal, posar 100 µL/pou d'aquesta en una placa de 96 pous totals. Resuspendre molt bé per tal de tenir una confluència homogènia de cèl·lules en cadascun dels pous a tractar. No utilitzar els pous dels extrems de la placa, ja que aquests poden ser susceptibles a evaporació.
- Incubar 24 hores (si la concentració final és de 6.000 cèl·lules/pou) o 48 hores (si la concentració final és de 4.000 cèl·lules/pou), en una atmosfera humida amb 95% d'aire i un 5% de CO_2 a 37ºC.

Dia 2

- Observació al microscopi òptic de l'homogeneïtat de cèl·lules/pou i l'adherència d'aquestes.
- Preparació de les dilucions pertinents de cada compost per cadascuna de les plaques de 96 a tractar. Abans de realitzar el banc de dilucions, les concentracions més elevades (100 µM o 25 µM en el cas del compost L) seran filtrades prèviament amb una xeringa i filtre especials per a eppendorfs d'1,5 mL. D'aquesta manera s'evitaran possibles contaminacions.

  En el cas dels controls, vehicles i pèptids sols, la filtració esmentada no serà necessària. Per a realitzar les concentracions mare dels diferents vehicles, es posarà el percentatge pertinent de DMSO (5%, 10%, 17% i 27%) amb aigua miliQ estèril.

Important: homogeneïtzar molt bé les solucions cada vegada que es realitzi una dilució.

- Aspiració del medi de les cèl·lules amb una agulla especial per a volums petits acoblada a la bomba de buit. Aquest procés es realitzarà per blocs, aspirant aquell medi dels pous d'aquell compost específic que s'introduirà (no es poden deixar les cèl·lules molta estona sense medi).
- Introduir 100 µL/pou de cada tractament seguint el disseny de placa corresponent.
- Incubar la placa 48 hores a 37ºC i 5 % de CO_2.

Dia 3

- Aspiració del medi present en cada pou tractat.
- Rentat cel·lular amb 200 µL/pou de PBS. Posterior aspiració.
- Posar en un tub falcon tapat amb paper de plata medi més MTT. Cada pou necessita 100 µL de medi amb 10 µ de MTT. Calcular el volum de cada compost necessari per a la totalitat de pous presents. Abocar la barreja final en una cubeta estèril.
- Amb una pipeta multicanal, afegir 110 µL/pou. Realitzar 3 blancs per placa on només hi hagi la suspensió anterior, sense cèl·lules (aprofitar els pous ubicats als marges de les plaques que no han estat tractats en cap moment).
- Incubar 2 hores a 37ºC i 5 % de CO_2.
- Aspiració del medi. Per a pous petits sempre s'utilitzarà la agulla especial acoblada a la bomba de buit.
- Introduir 200 µL/pou de DMSO amb la pipeta multicanal.
- Lectura dels resultats a partir del lector de plaques i el programa gen 5.

3.3.4.2. Fotoactivació dels compostos K, B i 9lys-B

Fonament de la tècnica:

La fotoactivació de complexos metàl·lics és un dels camps d'investigació actuals més importants, ja que podria implicar el desenvolupament de fàrmacs i tractaments més selectius. L'absorció de llum visible i ultraviolada per diferents molècules pot influir dràsticament en la seva reactivitat, produint una reacció fotoquímica en el centre del metall. Les molècules que es troben en estat excitat poden tenir diferents distribucions electròniques en comparació amb el seu estat basal, el que comporta també a diferents geometries, angles d'enllaç i longituds d'enllaç. D'aquesta manera, la longitud de l'enllaç metall-lligand pot allargar-se quan el complex es troba en el seu estat excitat, provocant l'alliberació i l'intercanvi del lligand de manera més fàcil i selectiva (Smith, N. A., & Sadler, P. J., 2013).

El procés de fotoactivació en aquest projecte consisteix en l'exposició de les cèl·lules conjuntament amb els tractaments a una llum LED que emet a λ = 447 nm, separada a una distància entre 2 i 3 centímetres de la placa irradiada. Cal tenir en compte que la llum utilitzada només presenta la capacitat d'irradiar una superfície total de 4 x 4 pous. Aquest procés és realitzat durant 1 hora, on a cada placa s'avalua: diferents concentracions del compost en qüestió, l'efecte del seu propi vehicle, i els pous control (només medi DMEM 10% FBS). La comparació entre les activitats dels diferents compostos es donarà a partir de la realització de les mateixes plaques de 96 efectuades, sense ser exposades aquestes a l'hora d' irradiació. De la mateixa manera que en assajos anteriors, cada concentració de cada tractament serà testat per triplicat (Taula 3).

Taula 3: Compostos utilitzats en l'assaig de fotoactivació, amb les diferents concentracions avaluades per triplicat. S'indiquen, a més, les diferents concentracions analitzades del vehicle (DMSO) corresponents a cada compost.

COMPOSTOS		CONCENTRACIONS AVALUADES
K		100 µM, 50 µM, 25 µM
B		100 µM, 50 µM, 25 µM, 10 µM, 5 µM, 2.5 µM
9lys-B		100 µM, 50 µM, 25 µM, 10 µM, 5 µM, 2.5 µM
Vehicle:	*K i B → 10% DMSO*	100 µM, 50 µM, 25 µM, 10 µM, 5 µM, 2.5 µM
	9lys-B → 5% DMSO	100 µM, 50 µM, 25 µM, 10 µM, 5 µM, 2.5 µM

Protocol:

- El procediment a utilitzar és el mateix descrit per a l'apartat 3.3.4. La diferència entre aquests és trobada al final del *Dia 2*, on les plaques a fotoirradiar seran incubades a 37ºC i 5 % de CO_2 durant només 1 hora. Aquelles plaques control no irradiades del mateix assaig sí seran incubades en aquest punt les 48 hores descrites.
- Després de l'hora d'incubació, es realitzarà el muntatge de la làmpada LED amb la placa en qüestió. Retirar la tapa de la placa sempre a l'hora de realitzar aquest pas. Deixar irradiar durant 1 hora.
  Important: la llum de la cabina de flux laminar haurà d'estar apagada durant el transcurs de l'assaig.
- Incubar la placa 48 hores a 37ºC i 5 % de CO_2 una vegada la irradiació ja s'hagi efectuat. Continuar amb el *Dia 3*.

3.3.5. Cinètica citotoxicitat cisplatí vs compost L

Fonament de la tècnica:

A partir d'un nou mètode de treball en cultius cel·lulars, s'utilitzarà la maquinària precisa (xCELLigence® RTCA DP-Acea), per tal de simular un assaig MTT a temps real durant 72 hores.

L'aparell DP xCELLigence® Real-Time Cell Analysis (RTCA) utilitza la resistència elèctrica no invasiva per tal de quantificar la proliferació cel·lular, el canvi de morfologia i la qualitat de l'adhesió cèl·lula-substrat a temps real. A més, permet realitzar diferents cinètiques utilitzant una càmera Boyden (E-Plate® 16) integrada electrònicament. Tres plaques electròniques independents permeten que els 16 pous totals siguin controlats i supervisats en paral·lel o independentment entre sí. L'aparell és col·locat en una incubadora de cultius cel·lulars i s'acciona i controla a través d'un cable connectat a la unitat de control (ordinador portàtil) localitzat a fora de l'incubador.

S'analitzarà la cinètica d'actuació del cisplatí i el compost L a 10 µM i 5 µM per duplicat. Es realitzaran mesures a diferents temps durant la totalitat de l'assaig, fins arribar a les 72 hores pròpies d'un assaig MTT *in vitro*.

Protocol:

- Tripsinització i recompte cel·lular per Scepter (veure punts 3.3.2. i 3.3.3.2.). Volem una concentració final de 5.000 cèl·lules/pou. Barrejar el volum necessari de medi complet i suspensió cel·lular en un tub eppendorf de 2mL.
- Posar 50 µL inicials de medi complet/pou en una placa de 16 pous E-Plate®.
- Introduir 100 µL/pou de la suspensió cel·lular preparada. Les hores compreses entre el primer *step* de l'experiment seran representatives de la proliferació de les cèl·lules PC3 sense cap tipus de tractament.
- Monotorització dels diferents *steps* de l'experiment:

  - **Step 1:** Mesura cada 30 minuts durant 24 hores.
  - **Step 2:** Anàlisi cada 15 minuts durant 24 hores.
  - **Step 3:** Anàlisi cada 5 minuts durant 24 hores.

- Al final de l'*step 1* s'aturen les mesures per iniciar la cinètica de supervivència cel·lular. Preparar les dilucions necessàries per als diferents compostos.
- Aspiració del medi present a partir d'una agulla acoblada a la bomba de buit.
- Posar els tractaments segons el disseny de plaques (150 µL/pou). Iniciar l'*step 2.*
- Una vegada passades les següents 48 hores, aturar l'experiment.

3.3.6. Citometria de flux

Fonament de la tècnica:

La citometria de flux és una tècnica basada en l'obtenció d'informació sobre poblacions cel·lulars, a partir d'un estudi individualitzat d'una mostra representativa del conjunt poblacional (10.000 cèl·lules). La suspensió cel·lular en solució isotònica es fa passar a través d'un petit orifici, fent que aquestes passin d'una en una formant part d'una corrent continua, per una llum làser. Quan aquesta travessa una cèl·lula pateix una dispersió que pot ser evidenciada en un fotodetector, on el temps d'arribada dels fotons a aquest serà proporcional al diàmetre i, per tant, al volum cel·lular (mètode Side Scatter).

A partir de la tècnica descrita, es pretén quantificar l'entrada dels pèptids 9 i 9-NLS a l'interior de les cèl·lules PC3. Per tal de poder realitzar aquesta determinació, ambdós pèptids es trobaran units a una molècula orgànica fluorescent (fluoresceïna-5-isotiocianat). Aquest fluorocrom en ser estimulat per la llum làser del citòmetre, emet llum de color verd (visible) (excitació màxima a 495 nm i emissió màxima a 520 nm), que és detectada per un detector específic del citòmetre de flux. Aquest procés permet l'estudi rigorós de la quantitat de fluorescència emesa per cèl·lula, extrapolant així la quantitat de pèptid present.

Protocol:

Dia 1

- Tripsinització i recompte cel·lular per cambra de Neubauer (veure punts 3.3.2. i 3.3.3.1). Volem una concentració final de 50.000 cèl·lules/pou en una placa de 24 pous.
- A partir del recompte realitzat, calcular el volum de suspensió cel·lular i medi DMEM 10% FBS necessari per aconseguir el nombre de cèl·lules finals en cada pou estipulat.
- Passar 500 µL/pou de la suspensió anterior.
- Incubar 24 hores a 37ºC i 5 % de CO_2.

Dia 2

- Calcular i realitzar les dilucions dels pèptids 9 i 9-NLS units a fluoresceïna, obtenint de cadascun d'aquests les concentracions finals a 10 µM i 50 µM.
- Eliminar el medi amb una agulla acoblada a la bomba de buit.
- Tractar per duplicat amb 250 µL/pou de cadascuna de les concentracions dels pèptids per cada temps d'incubació requerida (1 hora i 3 hores). Realitzar controls amb medi DMEM 10% FBS per cadascuna de les hores d'exposició al pèptid.
- Incubar les cèl·lules durant 1 o 3 hores, segons el tractament a quantificar.
- Passat el temps d'incubació, retirar el medi dels pous aspirant amb una agulla estèril acoblada a la bomba de buit.
- Rentar cada pou amb 500 µL de PBS. Aspirar. Tractar cada pou amb 100 µL de Gibco® Trypsin-EDTA.
- Incubar durant 7 minuts a 37 ºC i 5% de CO_2.

- Passat el temps requerit, confirmar que les cèl·lules s'han desenganxat de la superfície dels pous observant la placa al microscopi invertit.
- Afegir 400 µL/pou de medi DMEM 10% FBS fred. És molt important que el medi sigui fred per tal d'aturar el metabolisme de les cèl·lules i que no internalitzi més pèptid 9 o 9-NLS.
- Recollir els 500 µL finals de cada pou en tubs eppendorf de 1,5 mL. Cal resuspendre molt bé durant la recollida de mostra per tal d'assegurar-nos que es recullen totes les cèl·lules presents en cada pou.
- Centrifugar els tubs eppendorf durant 10 minuts a 26000 rpm en una centrífuga refrigerada a 4ºC (Eppendorf – centrifuge 5415R).
- Eliminar el sobrenadant per aspiració amb una agulla estèril acoblada a la bomba de buit. Resuspendre el *pellet* en sec. Resuspendre el *pellet* amb 300 µL de PBS amb un 2% de FBS fred.
- Posar tot el volum de cadascun dels eppendorfs en tubs de citòmetre (1 tub de citòmetre per cada eppendorf amb tractament). Realitzar la lectura amb el citòmetre de flux (FACScalibur Becton Dickenson).

3.3.7. Microscòpia Confocal de fluorescència

Fonament de la tècnica:

La microscòpia confocal de fluorescència és el millor mètode per visualitzar la colocalització intracel·lular de proteïnes. Aquesta tècnica utilitza la il·luminació puntual i un "pinhole" que permet l'eliminació de la informació que es troba fora del pla focal. D'aquesta manera, s'obtenen imatges bi o tridimensionals, a causa de la bona resolució de l'eix X (Miyashita, 2004).

L'objectiu d'aquest estudi és visualitzar la localització dels pèptids 9 i 9-NLS a l'interior de les cèl·lules. Per tal de poder localitzar les diferents estructures, es realitza una tinció prèvia de les mostres amb reactius capaços d'emetre fluorescència. En aquest cas, s'utilitza el marcador Hoescht 3334, el qual presenta la capacitat de travessar la membrana plasmàtica de les cèl·lules, arribar a nucli, i interaccionar amb la cromatina. El seu espectre d'excitació és el de la llum UV i el d'emissió es troba comprès entre 460 - 490 nm (llum blava). A més, els pèptids 9 i 9-NLS, es troben marcats amb fluoresceïna-5-isotiocianat, que presenta el seu pic de màxima absorció a 494 nm i el d'emissió a 521 nm.

Protocol:

Dia 1

- Tripsinització de la línia cel·lular PC3 i recompte cel·lular per cambra de Neubauer (veure punts 3.3.2. i 3.3.3.1.).
- Calcular el volum de suspensió cel·lular i medi necessaris per realitzar una sembra de 50.000 cèl·lules/ pou en dues plaques de 8 pous cadascuna (Lab-Kel brand products). Aquesta presenta una superfície de 0,7 cm^2 per pou.
- Incubar les plaques a 37ºC i 5% de CO_2.

Dia 2

- Dissenyar de plaques: es tractaran les cèl·lules amb cadascun dels pèptids units al fluorocrom a 3 hores, 6 hores, 8 hores, a més de dos controls de medi DMEM 10% FBS.
- Realització de les dilucions pertinents per aconseguir una concentració final de cada pèptid de 50 µM.
- Eliminar el medi amb una agulla estèril acoblada a la bomba de buit.
- Tractar les cèl·lules amb 200 µL tractament/ pou en la incubació pertinent a 15 hores de la placa de 24. Realitzar els controls pertinents.

Dia 3

- Aspiració del medi a partir de l'agulla acoblada a la bomba de buit.
- Tractar les cèl·lules amb 200 µL tractament/pou en les incubacions pertinents a 3, 6, 8, i 15 hores, incloent-hi controls.
- Una vegada acabades totes les incubacions, rentar amb 500 µL/pou de PBS fred. A partir d'aquest punt, les cèl·lules es trobaran sempre en gel i tapades amb paper de plata.
- Fixar les cèl·lules amb paraformaldehid fred dissolt en PBS al 4% durant 12 minuts. El paraformaldehid interacciona amb els grups amino de les proteïnes i els fixa, mantenint l'estructura natural de les proteïnes.
- Rentar amb 500 µL/pou de PBS fred.
- Rentar durant 5 minuts amb 500 µL/pou de PBS fred.
- Tenyir el nucli de les cèl·lules amb 250 µL/pou de Hoescht dissolt en PBS 1/4000 (4 mL PBS + 1 µL Hoescht), fins a una concentració final de 5 µg/mL durant 15 minuts.
- Rentar amb 500 µL/pou de PBS fred.
- Repetir el rentat amb 500 µL/pou de PBS fred. Aspirar molt bé aquest últim rentat per tal que no quedin restes de PBS a la superfície de cada pou.
- Extreure la part superior del muntatge en cadascuna de les plaques. Posar per cada pou un medi de muntatge especial basat en *anti-fading*. Fixar els cubreobjectes amb esmalt d'ungles a la superfície dels portaobjectes.
- Observar les mostres al microscopi confocal de fluorescència (Nikon Eclipse Ti) (Serveis científico-tècnics de la Udg).

3.4. Anàlisi estadística

En aquest estudi, i a partir del compliment dels supòsits de normalitat i homogeneïtat de variàncies, es van realitzar múltiples proves t-student (test paramètric) de comparació de mitjanes per a mostres independents, per tal de quantificar les diferències entre els resultats obtinguts. La distribució imposada en l'anàlisi va ser de dues cues (distribució bilateral), i presentava un interval de confiança del 95%.

Una vegada determinat el valor *t* a partir del programa **IBM SPSS Statistics 23**, es va utilitzar el valor p associat. Si el valor p determinat és inferior al límit escollit per significança estadística (0.05), s'acceptarà que les diferències entre les mitjanes comparades són significativament diferents.

4. Resultats

4.1. Anàlisi comparatiu de l'activitat citotòxica de diferents compostos de Pt i Ru

Donat que els compostos utilitats són poc solubles en aigua, s'ha necessitat la utilització d'un dissolvent orgànic (DMSO) per tal de poder preparar les diferents solucions. Se sap que a determinades concentracions, els dissolvents orgànics poden ser tòxics per a les cèl·lules. Per aquest motiu, en primer lloc es va analitzar l'efecte del vehicle sobre la supervivència cel·lular en les cèl·lules PC3. Es va avaluar estadísticament les diferències significatives entre les diverses concentracions dels vehicles emprats (DMSO i aigua) respecte al control (cèl·lules tractades únicament amb medi DMEM 10% FBS). Cal remarcar que la supervivència cel·lular en els pou control sempre es considera el 100% de proliferació.

A la **Figura 4**, es troba representada la supervivència cel·lular de les cèl·lules PC3 respecte cadascun dels vehicles utilitzats com a dissolvents, tant dels compostos, pèptids, com dels conjugats analitzats posteriorment. La tipologia dels gràfics realitzats en els assajos de citotoxicitat són de tipus dosis-resposta.

Es van obtenir diferències significatives ($p < 0.05$) respecte el control en les concentracions de 100 µM i 50 µM dels vehicles amb DMSO al 5%, 10%, 17% i 27%. Les concentracions restants no especificades de cadascun dels

vehicles no presentaven una supervivència cel·lular significativament diferent respecte el control. Tot i això, com que es va observar que el vehicle sol tenir un efecte sobre la proliferació cel·lular en la majoria de concentracions assajades, per tal de tractar uniformement el conjunt de dades es van normalitzar els resultats i es van expressar com a percentatge relatiu a les mostres tractades amb el seu vehicle corresponent, en comptes del control (tractat amb medi de cultiu únicament). D'aquesta manera, es pretén visualitzar només l'activitat ocasionada del propi compost, sense la interferència del seu vehicle (Chan et al., 2013).

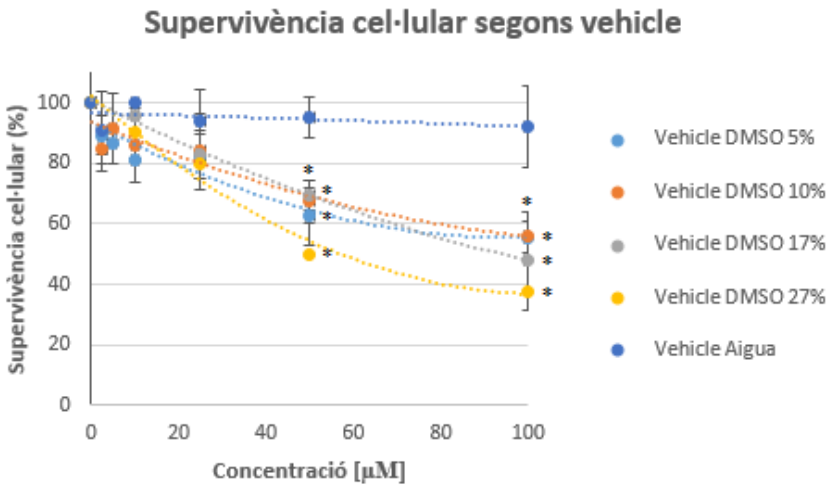

Figura 4: Comparativa del % de supervivència cel·lular segons el tipus de vehicle emprat (DMSO o aigua) en cadascun dels compostos analitzats en aquest estudi a diferents concentracions. *p<0.05 respecte cèl·lules control.

A la **Figura 5**, es troba representada la supervivència cel·lular de les PC3 a partir dels tractaments amb els compostos L, K i B a diferents concentracions, durant 48 hores. Les anàlisis estadístiques es van realitzar per cada compost i concentració, en comparativa amb el seu propi vehicle. Aquests mostraven que no hi ha un efecte significatiu en la supervivència cel·lular de les cèl·lules PC3 tractades amb els compostos K i B, mentre que sí que hi ha una disminució significativa en la supervivència cel·lular ($p < 0.05$) de les cèl·lules tractades amb el compost L a les concentracions de 25 µM, 10 µM i 5 µM.

Cal remarcar que estudis anteriors realitzats en el mateix grup de recerca mostraven una gran eficiència del compost L, per aquest motiu les concentracions provades en aquest compost eren inferiors a la dels restants.

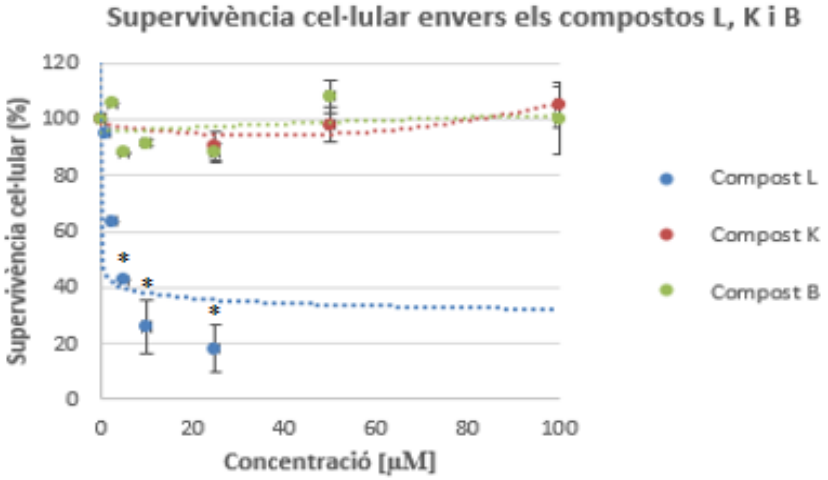

Figura 5: Comparativa del % de supervivència cel·lular segons el tipus de tractament (L, K o B) en l'assaig de citotoxicitat per la línia cel·lular PC3.*p<0.05 respecte el seu vehicle.

Donat que es va comprovar que el compost K no era actiu, es va voler assajar si la seva conjugació a un pèptid portador com la Bombesina podria millorar la seva acumulació cel·lular, i per tant la seva activitat antiproliferativa. A la **Figura 6** es troba representada la supervivència cel·lular envers els pèptids seleccionats com a portadors (*carriers*) (pèptids 9 i 9-NLS) i els seus pertinents conjugats. En relació a l'efecte dels pèptids sols sobre la viabilitat cel·lular, no es van trobar diferències significatives en comparació amb el seu vehicle (H_2O) (Figura 6A), el que indica que els efectes en la viabilitat cel·lular dels conjugats són degudes al propi compost, sense que els pèptids interfereixin també en aquesta. A la **Figura 6B**, es van veure diferències significatives ($p < 0.05$) en el compost 9-K a 100 µM i en el 9-NLS-K a 100 µM, 50 µM i 25 µM, respecte el compost no vehiculitzat (compost K). Aquests resultats indicarien que el pèptid 9 ajuda a l'entrada del compost a altes concentracions, mentre que el pèptid 9-NLS millora l'eficiència d'entrada respecte el pèptid anterior, aconseguint així uns resultats de viabilitat cel·lular menors a concentracions més baixes.

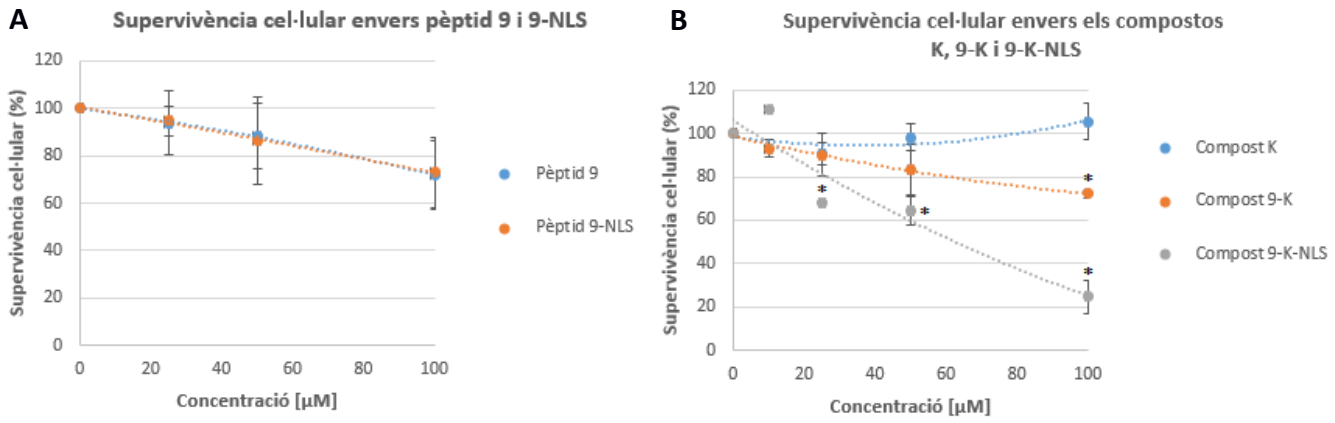

Figura 6: Supervivència cel·lular (%) de les PC3 tractades durant 48 hores amb els pèptids 9, 9-NLS (A), compost K i els seus respectius conjugats (compostos 9-K i 9-K-NLS) (B). *p<0.05 respecte cèl·lules tractades amb el compost K sense vehiculitzar.

4.2. Fotoactivació dels compostos K, B i 9lys-B

En l'estudi mostrat a continuació es va avaluar la capacitat de diferents compostos (K, B i 9lys-B) de ser fotoactivables. Aquesta propietat és definida com la capacitat dels compostos a ser excitats a partir de la seva exposició a llum visible. Els possibles canvis en la seva estructura poden esdevenir crucials en la seva possible activitat anticancerigena, passant de no exercir cap afecte sobre la viabilitat cel·lular a ocasionar una disminució important en aquesta. Estudis previs en la mateixa línia d'investigació, van considerar que per tal de veure diferències en la viabilitat cel·lular respecte els tractaments no irradiats, era necessari un temps d'exposició a irradiació de 1 hora. A més, van establir la necessitat d'incubar 1 hora les cèl·lules amb els tractaments abans d'iniciar el procés de fotoactivació.

En primer lloc, es va observar l'efecte de la fotoactivació sobre les cèl·lules tractades durant 48 hores, observant-les al microscopi òptic. A la **Figura 7**, es presenta la morfologia cel·lular en els tractaments control, vehicle 10% DMSO, compost B a 100 i 50 µM, i el compost K a 100 µM. Entre aquests, s'observa una notable diferència entre la morfologia de les cèl·lules tractades i irradiades amb el compost B a 100 i 50 µM amb les restants. Les diferències morfològiques indiquen la seva pèrdua de conformitat de membrana i brillantor pròpia, indicant la mort de les cèl·lules PC3 en ambdós tractaments mostrats. Per tant, observant la mort de les cèl·lules al microscopi òptic, es confirmaria l'efecte citotòxic del compost B a dosis altes.

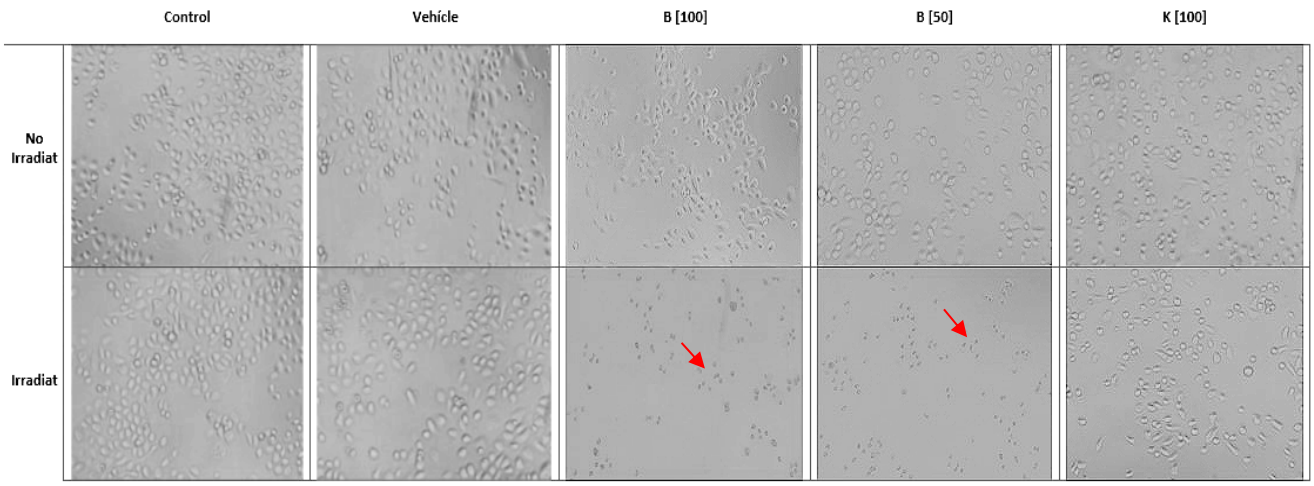

Figura 7: Imatge comparativa de les cèl·lules PC3 en l'assaig de fotoactivació després de 48 hores de tractament. Diferenciació entre els diversos tractaments emprats segons s'hagi donat el procés d'irradiació o no. Es destaquen en vermell cèl·lules de les concentracions de 100 i 50 µM del compost B irradiat on gairebé el 100% de les mostrades es troben mortes. Imatge retocada a partir del programa Adobe Photoshop CC.

Mitjançant assaigs MTT, es va voler comprovar si els compostos B i K incrementaven la seva activitat antiproliferativa en ser irradiats (Figura 8B). Analitzant els resultats a 50 µM, només es van trobar diferències significatives en el compost de ruteni B, el qual passava d'una supervivència cel·lular del 100% sense irradiar a una supervivència del 19,17% quan les cèl·lules s'irradien; excloent així la capacitat fotoactivable del compost de platí K.

Un cop descrita la capacitat del compost B a ser fotoactivable, es va comprovar si la resposta a la fotoactivació es modificava en ser conjugat al pèptid 9lys. D'aquesta manera, es van avaluar conjuntament l'activitat citotòxica dels compostos B i 9lys-B segons si es realitzava o no la seva exposició a una llum LED (λ = 447 nm). Es van trobar diferències significatives ($p < 0.05$) en ambdós compostos irradiats respecte els no irradiats en les concentracions de 100, 50, 25 i 10 µM; confirmant així l'activitat citotòxica dels compostos B i 9lys-B tant a altes com a baixes concentracions.

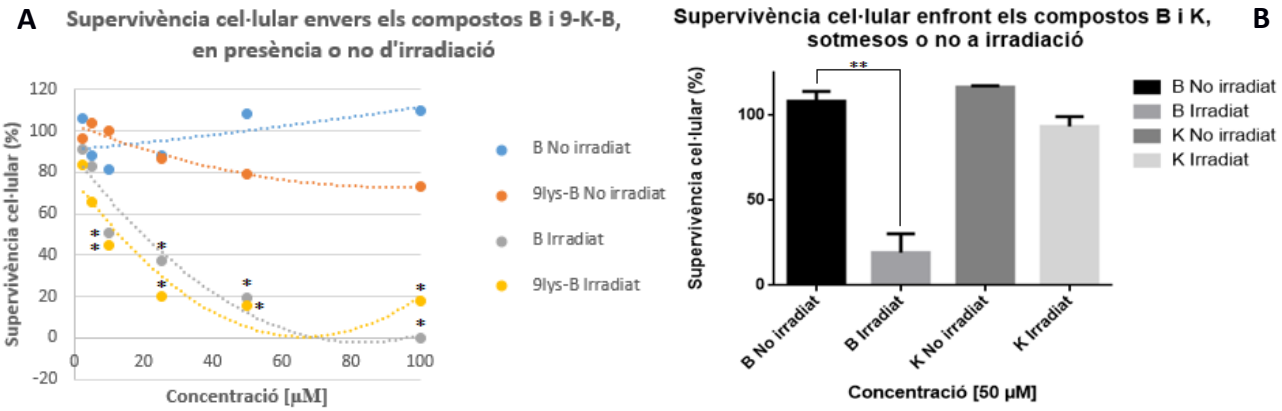

Figura 8: Representació gràfica de la supervivència cel·lular en PC3 segons la seva exposició o no a irradiació en els tractaments amb els compostos B i 9lys-B (A). Comparativa a 50 µM dels compostos B i K sobre l'activitat citotòxica en la línia cel·lular estudiada (B). *p<0.05 respecte els compostos no irradiats.

A partir dels resultats obtinguts, es va procedir a realitzar una anàlisi estadística per tal de determinar si la conjugació del compost B amb el pèptid 9lys ocasionava diferències respecte els valors de viabilitat cel·lular en els experiments de fotoactivació. A partir dels resultats obtinguts, es confirma la presència de diferències significatives ($p < 0.05$) entre els dos compostos en la concentració de 25 µM, el que indica que l'efecte citotòxic és mantingut a concentracions més baixes. Per tal d'apreciar aquestes diferències, a la **Taula 4** es poden observar les mitjanes de viabilitat cel·lular (representades en %) després dels tractament amb els dos compostos a 3 concentracions (100, 50 i 25 µM).

Taula 4: Mitjanes de la viabilitat cel·lular (%) en PC3 dels tractaments amb els compostos B i 9lys-B a diferents concentracions. Dades pertinents a l'assaig de fotoactivació.

Mitjana viabilitat cel·lular (%)

	Compost B Irradiat	Compost 9lys-B Irradiat
100 µM	0,00 %	0,38 %
50 µM	19,17 %	15,33 %
25 µM	37,38 %	19, 91 %

A partir de la totalitat de resultats obtinguts en els apartats 4.1 i 4.2, es va calcular la concentració requerida per una inhibició de la proliferació cel·lular del 50% *in vitro* respecte el control, per cada compost. Estudis anteriors (Chan et al., 2013) suggereixen considerar com no actius aquells compostos que presenten valors d'IC_{50} superiors a 50 µM. Es considera, per tant, que la dosi necessària perquè el compost sigui actiu en aquests casos és massa elevada per tal de ser utilitzada, ja que aquesta podria ocasionar múltiples efectes secundaris a l'organisme; motiu freqüent pel qual la quimioteràpia és interrompuda (Frömberg et al., 2011). D'aquesta manera, seran descartats aquells compostos que compleixin la característica anterior, ja que la dosis necessària perquè el compost tingui un efecte sobre la viabilitat cel·lular és massa elevada per ser subministrada.

Per tal d'obtenir els diferents valors d'IC_{50}, es va realitzar una regressió no lineal amb el software **Graphpad Prism 6**. Prèviament, es va efectuar una transformació logarítmica de la variable *Concentració (µM)*, a partir de la qual el programa pot obtenir el valor d'IC_{50} per cada compost introduït; obtenint així els resultats mostrats a la **Taula 5.**

Taula 5: Valors d'IC_{50} (µM) de cadascun dels compostos analitzats. Es destaquen aquells valors inferiors a 50 µM en la comparativa. Obtenció dels resultats a partir del programa Graphpad Prism 6.

IC_{50} (µM)

L	K	9-K	9-NLS-K	B	B IRR	9lys-B	9lys-B IRR
1,502 µM	**>50 µM**	**>50 µM**	**>50 µM**	**>50 µM**	**14,23 µM**	**>50 µM**	**7,20 µM**

4.3. Estudi de la cinètica d'actuació dels compostos L i cisplatí

Estudis en el mateix grup de recerca, estipulen que el valor d'IC_{50} del fàrmac cisplatí és de 2,5 µM (Martínez et al., 2017). A partir de les dades d'IC_{50} obtingudes, es va decidir analitzar a temps real la cinètica d'un assaig MTT complet entre el compost L i el cisplatí. D'aquesta manera, es pretén analitzar si la cinètica entre els dos compostos és similar. Aquest fet implicaria la possible administració del compost, ja que la seva actuació seria similar a la del cisplatí; fàrmac utilitzat actualment en el tractament de múltiples càncers. El seu subministrament però, es podria donar a dosis més baixes, ja que el seu valor d'IC_{50} és inferior; fet que reduiria el problema de la toxicitat. En aquest experiment, es van decidir provar les concentracions més baixes a les quals es van trobar diferències significatives en l'assaig de citotoxicitat respecte el compost L (5 i 10 µM) (Figura 5).

El sistema RTCA utilitza una placa que conté microelèctrodes interdigitats, integrats en el fons de la placa. El número de cèl·lules, viabilitat, morfologia i el grau d'adherència de les cèl·lules en contacte amb els elèctrodes afecta l'ambient iònic local, el que comporta a un increment de la impedància del flux d'electrons. Aquest factor és representat com a índex cel·lular (CI), el qual reflecteix el càlcul, mitjançant un algoritme intern del sistema, de la impedància depenent de freqüència, en absència o presència de cèl·lules adherides a la superfície dels pous (Hernàndez et al., 2016). A la **Figura 9**, es pot observar la cinètica avaluada dels dos compostos a 5 i 10 µM, respecte el control. Els resultats suggereixen que a 10 µM la cinètica del cisplatí és més ràpida, i per tant ocasiona una disminució en la viabilitat cel·lular superior respecte el compost L. A 5 µM però, les dues cinètiques es presenten de manera molt similar, fet que podria implicar el seu subministrament a baixes dosis.

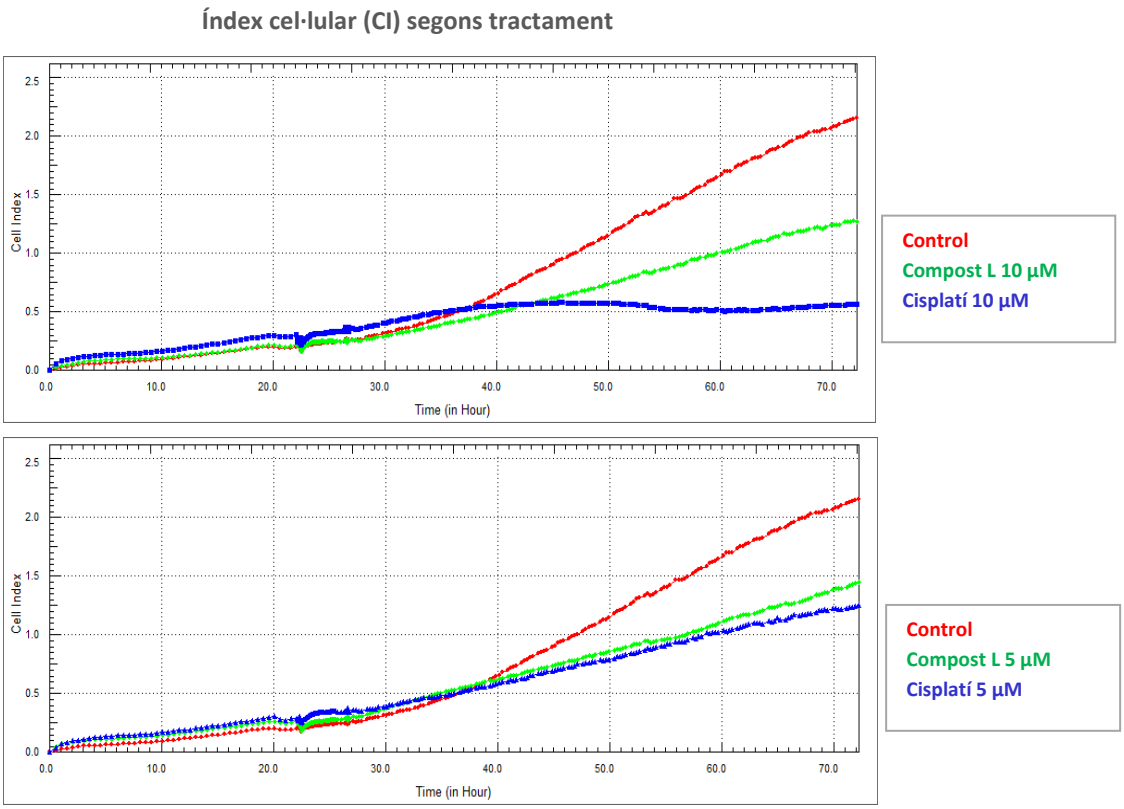

Figura 9: Representació de la cinètica d'un assaig MTT complert a temps real. Avaluació dels compostos L i cisplatí a 5 i 10 µM respecte el control a partir del CI proporcionat pel propi sistema RTCA.

4.4. Assaig d'internalització per citometria de flux

A partir dels resultats obtinguts sobre la viabilitat cel·lular envers els conjugats 9-K i 9-NLS-K (Figura 6), es va procedir a quantificar la capacitat d'entrada dels pèptids 9 i 9-NLS marcats amb fluoresceïna en les cèl·lules PC3. D'aquesta manera, es pretén avaluar la seva capacitat d'internalització a partir del recompte de fluorescència mitjana emesa per les cèl·lules, mitjançant la citometria de flux. D'aquesta manera, es podrà extrapolar la quantitat de pèptid que ha entrat dins de les cèl·lules al final d'1 o 3 hores d'exposició, respecte el control; avaluant així la capacitat d'ambdós pèptids de dirigir els diferents compostos de manera selectiva.

A la **Figura 10** es mostren els diferents pics (fluorescència mitjana emesa per les cèl·lules PC3), de cadascun dels pèptids a 10 µM i 50 µM, segons el temps d'exposició. Entre aquests, el pèptid 9-NLS és el que presenta un pic d'absorbància més desplaçat a l'eix de les X, indicant una major quantitat de fluorescència emesa, i per tant una major internalització d'aquest a l'interior de les cèl·lules. A més, la seva internalització mitjançant el mecanisme d'endocitosi mediat per receptor, és augmentat en incrementar la seva concentració i les hores a les quals es troben exposats.

A la **Figura 11**, es troba representada la mitjana geomètrica de la fluorescència emesa, la qual indica la tendència central o valor típic d'un conjunt de nombres, i no la suma d'aquests, tal i com representaria el càlcul de la mitjana normal.

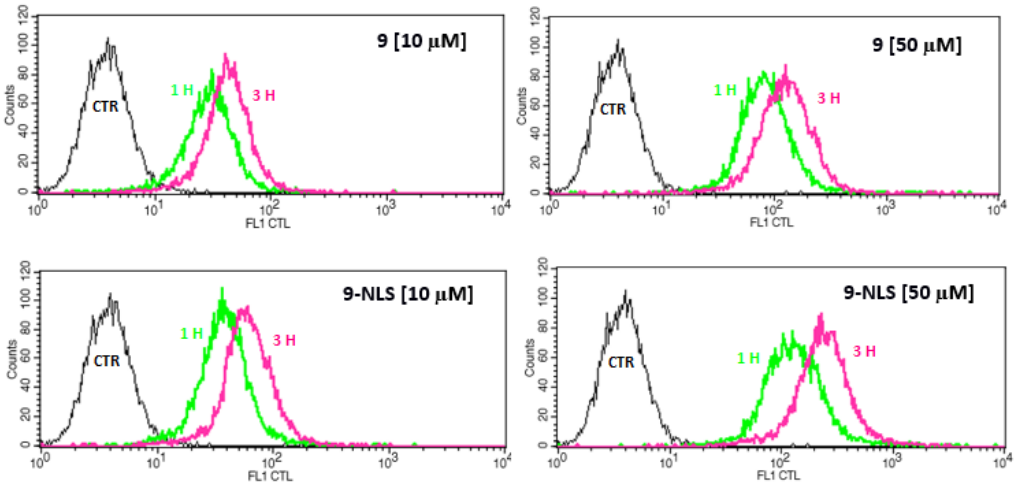

Figura 10: Comparativa en la capacitat d'internalització dels pèptids 9-F i 9-NLS-F a 10 i 50 µM, segons si eren exposats a les cèl·lules 1 o 3 hores.

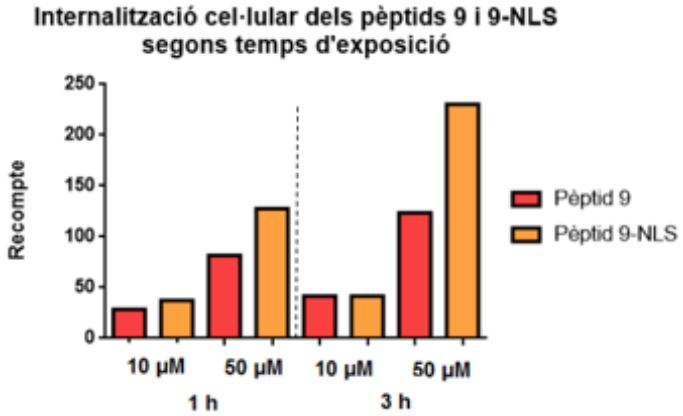

Figura 11: Mitjana geomètrica de la intensitat de fluorescència de les cèl·lules després dels tractaments amb els 9-F i 9-NLS-F a 10 i 50 µM.

4.5. Observació de la localització cel·lular dels diferents pèptids per microscòpia de fluorescència

A través de microscòpia de fluorescència, es va voler determinar la localització dels pèptids 9 i 9-NLS una vegada aquests es trobessin a l'interior de la cèl·lula. Concretament, es va comprovar si ambdós pèptids arribaven a nucli, i si fos així, a quina hora després de l'inici del tractament es donava. És important saber la localització dels *carriers* utilitzats per tal de poder confirmar si la conjugació ocasiona que els compostos arribin o no a nucli, i per tant puguin interaccionar amb el DNA; realitzant el seu efecte.

Les imatges van ser captades a través d'una càmera **Nikon Eclipse Ti**, realitzant a més una superposició de plans per tal de poder veure les dues fluorescències emeses a la vegada (distinció dels nuclis i els pèptids determinats). A la **Figura 12**, es poden observar les diverses imatges obtingudes a 10x en les diferents hores d'exposició a les quals les cèl·lules han estat sotmeses als diferents pèptids. Cal remarcar que les diferències en les coloracions blaves dels nuclis són degudes als diferents plans en els quals les cèl·lules es troben localitzades.

Observant el conjunt d'imatges obtingudes, es pot confirmar l'entrada d'ambdós pèptids a l'interior de la cèl·lula, tal com es va comprovar per citometria de flux. A més, la internalització del pèptid 9-NLS és clarament major en la comparativa, ja que podem observar més fluorescència emesa en les diferents hores quantificades. Referent al temps d'exposició, a 15 hores és on veiem una major quantitat de pèptid intracel·lular; quantitat excessiva per tal de poder determinar si arriba o no a nucli exactament. D'aquesta manera, es va catalogar a 8 hores com el millor temps d'exposició per tal d'avaluar la seva possible localització nuclear. En aquest punt, es va escollir un determinat pla d'ambdues mostres a 8 hores, els quals mitjançant microscòpia confocal, es van obtenir imatges de talls transversals dels nuclis que van ser seleccionats (25 talls amb una separació de 25 µM). D'aquesta manera, s'obté una imatge 3D (eixos X, Y i Z, **Figura 13**) per cadascun dels pèptids, en els quals es mostra la localització exacta d'aquests a 60x.

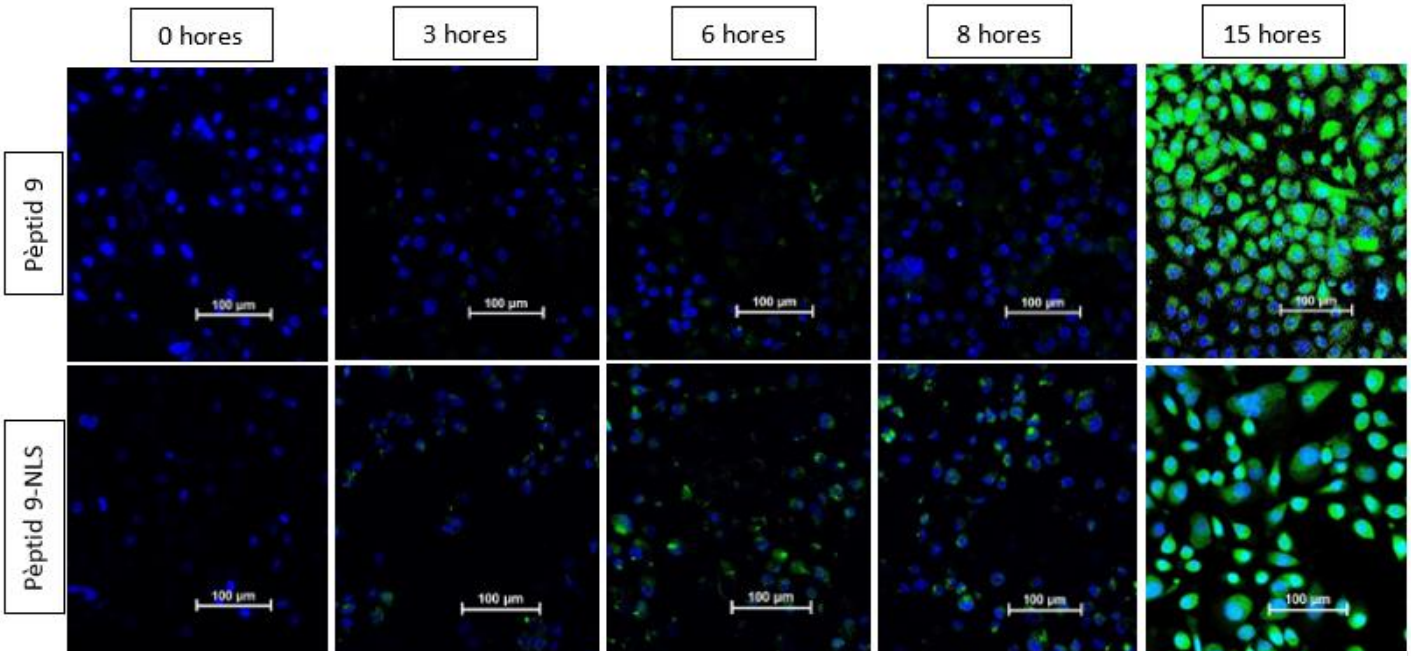

Figura 12: Representació, mitjançant microscòpia confocal de fluorescència, de la quantitat i localització dels pèptids 9-F i 9-NLS-F (verd-*fluoresceïna*) segons el temps d'exposició en cèl·lules PC3 (0 h, 3 h, 6 h, 8h, 15 h, nucli marcat en blau-*Hoescht 3334*). Imatges editades a partir dels programes NIS-Elements Viewer 4.20 i ImageJ-win 64.1.

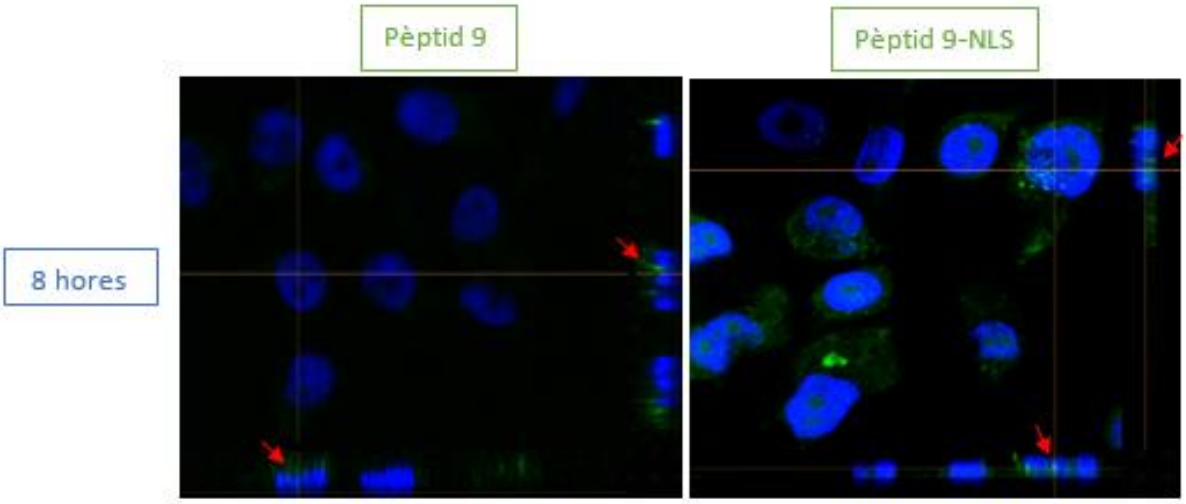

Figura 13: Representació per microscòpia confocal de fluorescència 3D, de la localització dels pèptids 9-F i 9-NLS-F en PC3. Seguint els eixos marcats dels nuclis tallats en selecció, es destaca aquella fluorescència emesa (verd) que es troba localitzada entre la fluorescència emesa pel propi nucli (blau). Imatges editades a partir dels programes NIS-Elements Viewer 4.20 i ImageJ-win 64.1.

5. Discussió

5.1. Discussió de resultats

El principal propòsit d'aquest estudi ha estat l'avaluació de l'activitat biològica de diversos compostos organometàl·lics com a possibles agents antitumorals, en cèl·lules de càncer de pròstata. Per tal d'endinsar-nos en noves teràpies dirigides, alguns dels compostos es trobaven units a un anàleg de Bombesina i, a més, en alguns casos a una seqüència NLS, mentre que altres tenien la capacitat de ser fotoactivables; incrementant així la selectivitat dels compostos en contra de les cèl·lules cancerígenes.

Estudis anteriors demostren que la utilització de dissolvents orgànics tals com el DMSO, poden presentar toxicitat al ser incubats amb cèl·lules, la qual augmenta a mesura que la seva concentració és incrementada. S'ha descrit com a límit un 5% de DMSO per tal de no ocasionar efectes tòxics en línies cel·lulars (Wu et al., 2011). En aquest estudi, s'ha demostrat que l'efecte del vehicle ocasiona un efecte citotòxic significatiu en les cèl·lules tractades a 100 i 50 µM en la totalitat de % quantificats. D'aquesta manera, cal tenir en compte el % de DMSO utilitzat a l'hora de dissoldre el compost, ja que una elevada concentració d'aquest a la mostra pot emmascarar la seva pròpia activitat.

Dels tres compostos analitzats (L, K i B), s'ha comprovat que l'únic agent amb activitat citotòxica és el compost de platí L. La seva activitat citotòxica a estat confirmada a baixes concentracions (25 µM, 10 µM i 5 µM), aprovant així la forta activitat del compost. Tal com s'expressa a la **Figura 9**, encara que la IC_{50} del compost L sigui inferior a la del cisplatí, aquest últim presenta un efecte sobre la viabilitat cel·lular molt més ràpid a 10 µM. A 5 µM però, la cinètica en ambdós compostos és molt similar. Aquest resultat suggereix que en el cas que aquest pugui ser subministrat, seria necessària una dosi menor respecte el cisplatí, però la ràpida actuació que aquest últim ofereix seria conservada. Contràriament, no s'ha observat cap tipus d'influència en la viabilitat cel·lular dels compostos K i B, fet que els descarta com a possibles agents antitumorals.

Respecte a l'efecte de la conjugació del compost K a un pèptid portador, s'ha confirmat una disminució en la viabilitat cel·lular quan aquest es troba conjugat amb el pèptid 9 a 100 μM, i a 100, 50 i 25 μM quan aquest es troba conjugat amb el pèptid 9-NLS. No s'ha trobat cap evidència significativa que confirmés la influència dels pèptids sols sobre la pròpia viabilitat cel·lular. Tal com afirmen Arteaga de Murphy & Ferro-Flores, 2005, la presència de pèptids transportadors conjugats a possibles agents citotòxics incrementa la selectivitat cap a les cèl·lules canceroses, fet que podria influenciar en l'activitat del propi compost. En aquest cas, és evident que la presència del pèptid anàleg a la Bombesina conjuntament amb la seqüència de localització nuclear, permeten al compost K una millora en la seva capacitat d'actuació.

Estudis paral·lels amb plasmidis de DNA en la mateixa línia d'investigació a la Universitat de Girona, confirmen la interacció del compost K amb el DNA, el qual indueix canvis en la seva conformació (Martinez et al., 2017). Aquesta evidència suggereix que el principal problema del compost K és la dificultat d'entrada a l'interior de la cèl·lula, problema que es podria solvatar a partir de la seva conjugació als pèptids portadors. A partir de les consideracions de Chan et al., 2013, no s'han considerat viables concentracions d'IC_{50} superiors a 50 μM, ja que aquestes podrien ocasionar un efecte tòxic important a l'organisme. Aquest fet exclouria com a possibles agents antitumorals els compostos 9-K i 9-NLS-K, encara que la seva activitat hagi estat millorada respecte el seu compost base.

A partir dels resultats mostrats a la **Figura 8**, s'ha demostrat que el procés de fotoactivació indueix l'activitat citotòxica del compost de ruteni B. Tal com s'explica a l'apartat **1.5**, la presència de lligands polypyridyl en la seva estructura confereixen al compost la propietat esmentada.

A diferència del compost K, el qual no presenta diferències en la seva activitat quan aquest és irradiat, el compost B passa a un estat energèticament més actiu. Tal com afirma Dobrucki, J.W, 2001, aquest fet condueix a la formació d'oxigen singlet, el qual és una espècie reactiva (ROS) que provoca el trencament de la cadena de DNA per efecte nucleasa. A més, s'ha hipotetitzat que una concentració elevada d'oxigen singlet ocasiona una sèrie de processos que acaben produint danys a la membrana cel·lular. Aquest procés ocasiona la pèrdua d'integritat de membrana i l'entrada del compost a les cèl·lules. En aquest cas en concret, s'ha passat d'una IC_{50} superior a 50 μM, a un valor de 14,23 μM quan aquest ha estat fotoactivat. Aquest valor podria plantejar al seu futur subministrament, ja que el fet que només sigui actiu en ser irradiat, faria possible un tractament més controlat (irradiant només en el lloc en el qual les cèl·lules cancerígenes són localitzades) sense efectes secundaris. A més, es va avaluar l'efecte de la conjugació en el compost 9lys-B. Comparant els valors d'IC_{50} obtinguts, es va observar una disminució significativa d'aquest (7,20 μM) en comparació amb el compost B no vehiculitzat. Aquests resultats reforçarien els efectes de la vehiculització en els diversos agents antitumorals, ja que aquests ocasionen que es produeixi un major efecte sobre la viabilitat cel·lular.

En referència a la quantificació de l'entrada dels pèptids 9 i 9-NLS, es va confirmar que el pèptid 9 actua com a bon anàleg de la Bombesina en cèl·lules PC3; línia cel·lular que presenta sobreexpressat el receptor GRP. A més, la seva conjugació amb la seqüència NLS augmenta els nivells de pèptid dins la cèl·lula, sobretot a concentracions de 50 μM a 3 hores d'exposició. Respecte el pèptid 9, a les **Figures 12 i 13** s'observa que la seva entrada és inferior a la del 9-NLS, a qualsevol de les hores quantificades.

Una vegada confirmada la capacitat d'entrada a l'interior de la cèl·lula per part dels dos pèptids, es va estudiar a les 8 hores d'exposició la seva localització intracel·lular.

A 60x, s'observen pèptids puntuals localitzats a l'interior del nucli, encara que la gran majoria presenten posició perinuclear. A diferència d'aquest, el pèptid 9-NLS és localitzat amb més freqüència a nucli, encara que

també s'observen elevades acumulacions perinuclears. Per tant, la seqüència NLS augmenta l'eficiència d'entrada (a través d'endosomes), a causa de la seva càrrega global positiva. La membrana plasmàtica presenta una càrrega global negativa, fet que facilita l'atracció i per tant l'entrada d'aquelles molècules amb càrrega oposada. A més, un cop dins de la cèl·lula, la seqüència NLS ajuda al fet que el pèptid s'acumuli a nucli, ja que és capaç de dirigir els diferents compostos fins a ell.

A partir de les dades extretes, s'estimen unes 8 hores d'exposició per tal de poder tenir una entrada notable de pèptid 9-NLS. A hores inferiors d'exposició la quantitat de pèptid visualitzat és extremadament baixa. Aquests resultats indiquen que els pèptids utilitzats en la vehiculització d'agents antitumorals són bons candidats a ser utilitzats en noves quimioteràpies, podent alliberar selectivament el fàrmac en cèl·lules de càncer de pròstata.

5.2. Ètica i sostenibilitat

La investigació biomèdica suposa el sacrifici cada any de milers d'animals per realitzar avenços en l'experimentació. En aquest estudi, s'han utilitzat models *in vitro* de cultius cel·lulars com a alternativa per tal d'evitar el seu sacrifici innecessari; utilitzant així cèl·lules fàcilment manipulables i renovables. En aquest cas en concret, les cèl·lules PC3 han estat extretes d'un home de 62 anys, concretament de l'ós com a lloc metastàsic. Sí que és cert però, que els cultius cel·lulars no poden reemplaçar sempre els assajos *in vivo*, però és una alternativa vàlida en la majoria d'ocasions.

En relació a la sostenibilitat, s'han complert les normes de seguretat de treball en el laboratori, i les normes concretes de treball en cultius cel·lulars. S'ha seguit de manera rigorosa els pertinents protocols de separació i tractament de residus, dipositant així tot el material que hagi estat en contacte amb material biològic en els seus respectius contenidors, els quals posteriorment són recollits i incinerats.

6. Conclusions

According to the objectives of this project, the following conclusions can be drawn:

- In the study of the effect on the cell viability of organometallics compounds K, B and L, only the L compound has been designated as a possible antitumor agent. Compounds K and B haven't shown any antiproliferative activity in the PC3 cell line.
- The conjugation of compounds K and B to a peptide analogue to Bombesin improves their antiproliferative activity. Moreover, the addition of a nuclear localization sequence (NLS) to the peptide sequence induces a notable increase in their antitumoral activity.
- Compound B has been identified as a potent photoactivable anticancer agent. The activity of the compound, is improved by its conjugation to the Bombesin analogue (9lys-B).
- Compound L shows a fast response as an antitumoral agent, which is similar to kinetics of the drug cisplatin at low concentrations. This property, together with an inferior IC_{50} value, suggests that L is a good pharmacologic candidate.
- It has been proved that the NLS sequence improve the internalization of peptide 9. In addition, the entrance to the cell nucleus of both peptides has been verified, although in comparison, the NLS sequence produces a major nuclear accumulation.

7. Bibliografia

Antonarakis, E. S., & Emadi, A. (2010). Ruthenium-based chemotherapeutics: are they ready for prime time?. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, *66*(1), 1-9.

Arteaga de Murphy, C., & Ferro-Flores, G. (2005). Bombesina y bombesinas radiomarcadas: estado actual. *Rev. med. nucl. Alasbimn j*, *8*(30).

Ávila-Portillo, L. M., Madero, J. I., López, C., León, M. F., Acosta, L., Gómez, C., Delgado, L., Gómez, C., Lozano, J. M., & Reguero, M. T. (2006). Fundamentos de criopreservación. *Revista colombiana de obstetricia y ginecología*, *57*(4).

Bastidas, O. (2009). Technical note–Neubauer chamber cell counting.

Bergamo, A., Gaiddon, C., Schellens, J. H. M., Beijnen, J. H., & Sava, G. (2012). Approaching tumour therapy beyond platinum drugs: status of the art and perspectives of ruthenium drug candidates. *Journal of inorganic biochemistry*, *106*(1), 90-99.

Borst, P., Rottenberg, S., & Jonkers, J. (2008). How do real tumors become resistant to cisplatin? *Cell cycle*, *7*(10), 1353-1359.

Brabec, V., & Nováková, O. (2006). DNA binding mode of ruthenium complexes and relationship to tumor cell toxicity. *Drug Resistance Updates*, *9*(3), 111-122.

Bruce, A., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2008). Molecular Biology of the Cell. New York, NY: Garland Science Pub.

Center, M. M., Jemal, A., Lortet-Tieulent, J., Ward, E., Ferlay, J., Brawley, O., & Bray, F. (2012). International variation in prostate cancer incidence and mortality rates. *European urology*, *61*(6), 1079-1092.

Chan, G. K. Y., Kleinheinz, T. L., Peterson, D., & Moffat, J. G. (2013). A simple high-content cell cycle assay reveals frequent discrepancies between cell number and ATP and MTS proliferation assays. *PloS one*, *8*(5), e63583.

Ciarimboli, G. (2012). Membrane transporters as mediators of cisplatin effects and side effects. *Scientifica*, 2012.

Dasari, S., & Tchounwou, P. B. (2014). Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *European journal of pharmacology*, *740*, 364-378.

Dobrucki, J. W. (2001). Interaction of oxygen-sensitive luminescent probes Ru (phen) 3 2+ and Ru (bipy) 3 2+ with animal and plant cells in vitro: mechanism of phototoxicity and conditions for non-invasive oxygen measurements. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, *65*(2), 136-144.

Frömberg, A., Gutsch, D., Schulze, D., Vollbracht, C., Weiss, G., Czubayko, F., & Aigner, A. (2011). Ascorbate exerts anti-proliferative effects through cell cycle inhibition and sensitizes tumor cells towards cytostatic drugs. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, *67*(5), 1157-1166.

Goodsell, D. S. (2006). The molecular perspective: cisplatin. *The oncologist*, *11*(3), 316-317.

Han Ang, W., & Dyson, P. J. (2006). Classical and non-classical ruthenium-based anticancer drugs: towards targeted chemotherapy. *European journal of inorganic chemistry*, *2006*(20), 4003-4018.

Hartinger, C. G., Zorbas-Seifried, S., Jakupec, M. A., Kynast, B., Zorbas, H., & Keppler, B. K. (2006). From bench to bedside–preclinical and early clinical development of the anticancer agent indazolium trans-[tetrachlorobis (1H-indazole) ruthenate (III)](KP1019 or FFC14A). *Journal of inorganic biochemistry*, *100*(5), 891-904.

Hernandez-Colina, M., & Del Toro Garcia, G. (2016). Cytotoxicity of 1-O-undecylglycerol in human breast cells by Real Time Cell Analysis. *Ars Pharmaceutica*, *57*(2), 63-66.

Horwich, A. (2010). *Systemic treatment of Prostate Cancer* (1a ed.). Sutton: Oxford University Press.

Johnstone, T. C., Suntharalingam, K., & Lippard, S. J. (2015). Third row transition metals for the treatment of cancer. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, *373*(2037), 20140185.

Kelland, L. (2007). The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nature Reviews Cancer*, 7(8), 573-584.

Mantovani, A. (2009). Cancer: inflaming metastasis. *Nature*, 457, 36-37.

Martínez, M., Carranza, A., Massaguer, A., Santos,L., Organero, Juan., Aliende, C., de Llorens, R., Iteng, N., Feliu, L., Planas, M., Rodríguez, A., Manzano, B., Espino, G., Jalón, F. (2017). Synthesis and biological evaluation of Ru(II) and Pt(II) complexes bearing carboxyl groups as potential anticancer targeted drugs. Manuscript submitted for publication.

Miyashita, T. (2004). Confocal microscopy for intracellular co-localization of proteins. *Protein-Protein Interactions: Methods and Applications*, 399-409.

Moucheron, C. (2009). From cisplatin to photoreactive Ru complexes: targeting DNA for biomedical applications. *New journal of chemistry*, *33*(2), 235-245.

Mukhopadhyay, S., Barnés, C. M., Haskel, A., Short, S. M., Barnes, K. R., & Lippard, S. J. (2007). Conjugated platinum (IV)- peptide complexes for targeting angiogenic tumor vasculature. *Bioconjugate chemistry*, 19(1), 39-49.

Nussbaum, R. L., McInnes, R. R., & Willard, H. F. (2015). *Thompson & Thompson genetics in medicine*. Elsevier Health Sciences.

Okarvi, S. M. (2008). Peptide-based radiopharmaceuticals and cytotoxic conjugates: potential tools against cancer. *Cancer treatment reviews*, *34*(1), 13-26.

Ragin, A. D., Morgan,R. A., & Chmielewski, J. (2002). Cellular import mediated by nuclear localization and signal peptide sequences. *Chemistry & biology*, 9(8), 943-948.

Ramaswami, R., Harding, V., & Newsom-Davis, T. (2013). Novel cancer therapies: treatments driven by tumour biology. *Postgraduate medical journal*, *89*(1057), 652-658.

Ramon, J., Dennis, L. (2007). *Prostate cancer* (1a ed.). New York: Springer.

Rojas, D. F., Manzo, D. J., Heriberto, S. A., Emiliano, G. A., Juárez, A. E., Coria-Álvila, G. A., Toledo, C. R., Locia, E. J., Hernández, A. M. (2011). El receptor a andrógenos en la fisiopatología prostática. *2(4)*, 1-15. Recuperat de https://www.uv.mx/eneurobiologia/vols/2011/4/Rojas-etal/Rojas-2(4)230511-2011-1.pdf.

Sano, H., Feighner, S. D., Hreniuk, D. L., Iwaasa, H., Sailer, A. W., Pan, J., ... & Tan, C. P. (2004). Characterization of the bombesin-like peptide receptor family in primates. *Genomics*, *84*(1), 139-146.

Sausville, E. A., & Longo, D. L. (2001). Principles of cancer treatment. *Harrison's Principles of Internal Medicine*, 1, 530-546.

Schamseddine, A. I., & Farhat, F. S. (2011). Platinum-based compounds for the treatment of metastatic breast cancer. Chemotherapy, 57(6), 468-487.

Smith, N. A., & Sadler, P. J. (2013). Photoactivatable metal complexes: from theory to applications in biotechnology and medicine.

Thermo Fisher Scientific Inc. (2015). Cell culture basics handbook. Recuperat el 10 d'Abril del 2017: https://www.thermofisher.com/es/es/home/references/gibco-cell-culture-basics.html.

Wu, S., Li, F., Ma, X., Wang, M., Zhang, P., & Zhong, R. (2011). Cytotoxicity of Eight Organic Solvents Towards Balb/3T3 and 293T Cells. In *2011 5th International Conference on Bioinformatics and Biomedical Engineering*.

Yan, Y. K., Melchart, M., Habtemariam, A., & Sadler, P. J. (2005). Organometallic chemistry, biology and medicine: ruthenium arene anticancer complexes. *Chemical communications*, (38), 4764-4776.

Yao, J., Fan, Y., Li, Y., & Huang, L. (2013). Strategies on the nuclear-targeted delivery of genes. *Journal of drug targeting*, *21*(10), 926-939.

Yoon, D. J., Liu, C. T., Quinlan, D. S., Nafisi, P. M., & Kamei, D. T. (2011). Intracellular trafficking considerations in the development of natural ligand-drug molecular conjugates for cancer. *Annals of biomedical engineering*, *39*(4), 1235-1251.