



Universidad de Oviedo

**MÁSTER EN CIENCIAS ANALÍTICAS Y  
BIOANALÍTICAS**

*Trabajo Fin de Máster*

**El potencial de nuevas drogas de  
rutenio como agentes quimioterápicos:  
estudio de su interacción con el ADN**

**Mario Corte Rodríguez**

**Junio 2013, Oviedo**



Universidad de Oviedo

**Departamento de Química Física y  
Analítica**

**ELISA BLANCO GONZÁLEZ**, Catedrática del Departamento de  
Química Física y Analítica de la Facultad de Química de la Universidad de  
Oviedo,

CERTIFICA:

Que el presente trabajo titulado “*El potencial de nuevas drogas de rutenio como agentes quimioterápicos: estudio de su interacción con el ADN*” ha sido realizado por el Licenciado **Mario Corte Rodríguez** en el Departamento de Química Física y Analítica de la Universidad de Oviedo bajo su dirección, constituyendo el Trabajo de Fin de Máster del interesado, cuya presentación autorizo.

Oviedo, Junio 2013

Edo.: Elisa Blanco González

## Índice

<b>1. Introducción .....</b>	<b>1</b>
1.1 Quimioterapia antineoplásica.....	2
1.2 Metalofármacos en quimioterapia.....	4
1.3 El cisplatino en quimioterapia .....	5
1.4 Complejos de rutenio en quimioterapia .....	8
1.5 Objetivos .....	19
<b>2. Experimental .....</b>	<b>21</b>
2.1 Instrumentación.....	21
2.2 Materiales y reactivos .....	26
<b>3. Resultados y discusión .....</b>	<b>29</b>
3.1 Estudio de la interacción de los complejos de rutenio con los nucleótidos del ADN .....	29
3.2 Estudio de la interacción del complejo de rutenio ASR3 con el oligonucleótido de secuencia 5'-TCCTGTCC-3' .....	36
3.3 Identificación de los aductos formados por ESI-Q-TOF-MS .....	37
<b>4. Conclusiones .....</b>	<b>44</b>
<b>5. Bibliografía .....</b>	<b>46</b>

# **1. Introducción**

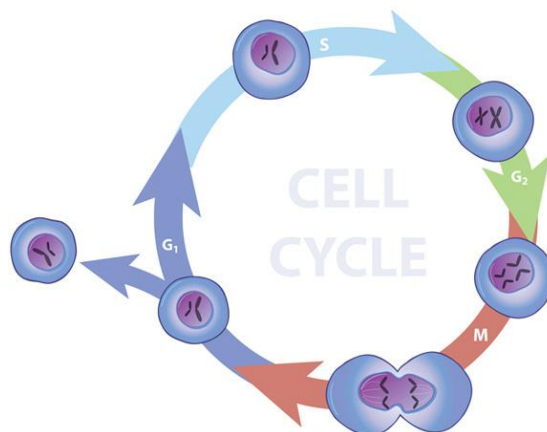
---

## 1. Introducción

La definición biológica de neoplasia o tumor es un tema controvertido. Entre las definiciones más aceptadas se encuentra la de Rupert Willis que, en 1952, estableció que “una neoplasia es una masa anormal de tejido, cuyo crecimiento excede y no está coordinado con el de los tejidos normales y sigue creciendo después de que cesa el estímulo que provocó el cambio.”<sup>1</sup> Además, en muchas ocasiones, los términos de neoplasia y cáncer se utilizan como sinónimos. Sin embargo, una neoplasia se considera maligna o cáncer cuando las células que la forman adquieren capacidad para escapar de su origen y colonizar y proliferar en otros tejidos u órganos (metástasis). Por lo tanto, el cáncer es una proliferación acelerada, desordenada, descontrolada y excesiva de las células de un tejido que invaden, desplazan y destruyen los tejidos sanos del organismo.

Para entender el origen del cáncer, hay que referirse al ciclo celular. Toda célula eucariota normal vive en un período secuencial de crecimiento y división que tiene las siguientes fases (Figura 1):

- **Fase G<sub>1</sub> (gap 1):** fase de crecimiento celular y reposo pos-mitótico. Las moléculas y estructuras citoplasmáticas aumentan en número. Se sintetizan proteínas y ARN.
- **Fase S (síntesis):** fase de replicación o síntesis de ADN. La cantidad de información genética y de proteínas nucleares se duplica y cada cromosoma pasa a estar formado por dos cromátidas idénticas.
- **Fase G<sub>2</sub> (gap 2):** continúa la síntesis de proteínas y ARN y comienza la condensación de los cromosomas en preparación para la división celular.
- **Fase M (mitosis):** se produce la división celular, constituida por la mitosis (división del núcleo) y citocinesis (división del citoplasma). La célula se divide en dos células hijas idénticas, cada una de ellas con la mitad del ADN y estructuras celulares de la célula madre.



**Figura 1.** Esquema del ciclo celular. La división celular, constituida por la mitosis y la citocinesis ocurre después de completarse las tres fases preparatorias G<sub>1</sub>, S y G<sub>2</sub>

Si durante el ciclo celular ocurre algún error, la célula dispone de mecanismos de control capaces de frenar dicho ciclo para que el error pueda ser reparado, o bien para inducir la muerte celular programada (apoptosis) cuando el daño es muy extenso. El resultado final es que durante el ciclo celular existe un equilibrio entre mitosis y apoptosis que regula la población celular de cada tejido. Cuando este equilibrio se rompe, la célula es capaz de repetir el ciclo indefinidamente y se convierte en una célula tumoral.

Por tanto, el cáncer se origina a partir de una única célula normal que sufre alteraciones accidentales irreversibles en los genes responsables de controlar el crecimiento y la muerte celular.<sup>2</sup> Todas las células que se hayan formado por división de esta primera, así como todas las siguientes generaciones presentarán los mismos fallos y, por lo tanto, el mismo comportamiento tumoral. De esta forma, el tumor seguirá creciendo de forma incontrolada mediante clones de la primera célula dañada. Además, el tumor puede llegar a invadir tejidos cercanos o, incluso, distribuirse por el organismo a través de la sangre o la linfa, convirtiéndose de esta forma en un cáncer (tumor maligno).

El cáncer es una de las principales causas de muerte a escala mundial y, además, se prevé que el número de defunciones por cáncer siga aumentando en todo el mundo y supere los 13.1 millones en 2030.<sup>3</sup> Por tanto, la búsqueda de tratamientos adecuados contra el cáncer es uno de los campos de la investigación de mayor importancia e interés actual. El objetivo de dichos tratamientos es la erradicación completa de las células cancerosas o la disminución del número de las mismas, de manera que se reduzca el tumor con el consiguiente alivio de los síntomas, mejora de la calidad de vida y prolongación de la supervivencia. Para ello, se utilizan fundamentalmente métodos quirúrgicos, radioterápicos y/o farmacológicos (quimioterapia).

### 1.1 Quimioterapia antineoplásica

La quimioterapia antineoplásica es un tratamiento a base de agentes químicos (fármacos) cuyo objetivo final es provocar la muerte de las células cancerosas. De ahí el nombre de fármacos citolíticos, citotóxicos o citostáticos. En la actualidad, existe un gran número de fármacos de este tipo con distinta naturaleza química y diferentes mecanismos de acción, pero todos ellos funcionan interfiriendo, de una forma u otra, en el ciclo celular; es decir, actúan sobre las células en división. Algunos lo hacen a nivel de una fase específica del ciclo (fase-específicos) y otros intervienen en varias fases o todo el ciclo celular (fase-inespecíficos)<sup>4</sup>. En cualquier caso, está claro que la quimioterapia afecta no

solo a las células tumorales, sino también a las células normales, en especial a aquellas que tienen una tasa de replicación más elevada (células epiteliales, de la médula ósea, germinales...). En consecuencia, la quimioterapia antineoplásica siempre produce efectos secundarios, más o menos graves, dependiendo del grado de especificidad del fármaco hacia las células tumorales, que es necesario evaluar y controlar.

Existen diversas formas de clasificar los fármacos que se utilizan en los tratamientos antineoplásicos. Una de ellas los clasifica en función de su mecanismo de acción<sup>5</sup>:

- Agentes alquilantes: son compuestos que interrumpen las funciones celulares mediante la formación de enlaces covalentes con los grupos amino, carboxilo, sulfhidrilo y fosfato en moléculas biológicamente importantes. Los sitios principales de alquilación son las bases nitrogenadas del ADN y ARN. Los agentes alquilantes dependen de la proliferación celular para su actividad, pero son fase-inespecíficos. Entre los agentes alquilantes se encuentran las mostazas nitrogenadas (Mecloretamina, Melfalán, Ciclofosfamida, Clorambucilo, Busulfan), nitrosoureas (Carmustina, Lomustina), alquilsulfonatos (Busulfan) y alquitriazenos (Dacarbazina, Temozolomida).
- Antimetabolitos: son compuestos estructuralmente análogos a los metabolitos que actúan como sustratos de las enzimas que catalizan la formación de precursores de nucleótidos de purina y pirimidina, de manera que los antimetabolitos se comportan como falsos sustratos, disminuyendo la biodisponibilidad de dichos precursores e impidiendo la síntesis de ADN y ARN. En consecuencia, son fármacos específicos de la fase S del ciclo celular. Entre los fármacos de este grupo se incluyen análogos del ácido fólico (Metotrexato), análogos de la pirimidina (5-Fluorouracilo, Citarabina, Gemcitabina) y análogos de la purina (6-Mercaptopurina, 6-Tioguanina, Azatioprina).
- Fijadores de la tubulina: son compuestos naturales que se forman como metabolitos secundarios de diversas plantas. Estos compuestos son capaces de unirse a la tubulina, una proteína esencial para la formación de microtúbulos durante la fase M del ciclo celular, impidiendo su normal funcionamiento. Por lo tanto, son fármacos específicos de la fase M del ciclo celular que bloquean las células que están en mitosis. En este grupo están los alcaloides de la vinca (Vincristina, Vinblastina) y los taxanos del tejo (Paclitaxel, Docetaxel).

- **Inhibidores de las topoisomerasas:** son compuestos que alteran la función de las topoisomerasas (I y II), enzimas que controlan y mantienen la estructura del ADN durante la replicación y transcripción. De esta manera, provocan la escisión mantenida de la cadena de ADN y la pérdida de su función. Por tanto, estos fármacos actúan sobre las fases S y G<sub>1</sub> del ciclo celular. A este grupo pertenecen Camptotecina, Irinotecán, Topotecán Etopósido y Tenipósido, entre otros.
- **Antibióticos citostáticos:** son compuestos capaces de intercalarse entre los pares de bases adyacentes de ADN y fijarse con intensidad diversa. También son capaces de inhibir la topoisomerasa II y, además, inducen la formación de radicales libres de oxígeno que provocan daño oxidativo en el ADN. Por tanto, son fármacos fase-inespecíficos. Entre los antibióticos de este tipo se encuentran las antraciclinas (Daunorubicina, Doxorubicina) y las bleomicinas.

### 1.2 Metalofármacos en quimioterapia

Desde tiempos muy antiguos, se han venido utilizando diferentes compuestos metálicos inorgánicos con fines terapéuticos. Así, los egipcios usaban cobre para esterilizar el agua y los chinos utilizaban diversos compuestos de oro para tratar algunas enfermedades. En Europa, Paracelso (1493-1541) propuso a finales del siglo XVI el empleo de antimonio como purgante y de cloruro mercurioso como diurético. A partir del siglo XVI y gracias a los trabajos de Paracelso, el interés de los metales como fármacos fue creciendo lentamente, de manera que el empleo de diferentes compuestos de mercurio para el tratamiento de la sífilis era algo habitual en el siglo XVIII y en 1910 se comercializó, con el nombre de “Salvarsan”,<sup>6</sup> un compuesto organometálico de arsénico (arsfenamina) para el mismo fin. Sin embargo, debido a su limitada selectividad y su toxicidad, el interés por los fármacos basados en metales fue disminuyendo de manera progresiva a favor de los compuestos orgánicos sintéticos o naturales.

El descubrimiento fortuito de Barnett Rosenberg y sus colaboradores, en 1965, de un compuesto que inhibía el crecimiento de la bacteria *Escherichia coli*,<sup>7</sup> identificado más tarde como cis-diaminodicloroplatino(II) (cisplatino), y su introducción posterior con éxito en la terapia del cáncer testicular (1978), promovió un interés renovado y creciente en medicamentos a base de metales, particularmente complejos organometálicos, como agentes antitumorales.



Los compuestos a base de metales amplían la posibilidad de construir moléculas más adecuadas para la unión a dianas biológicas específicas. De hecho, los iones metálicos exhiben una amplia gama de números de coordinación y geometrías, que permiten la unión a numerosos aniones y ligandos orgánicos diferentes (con sus propiedades químicas y biológicas)<sup>14</sup> en distribuciones espaciales más adecuadas, ofreciendo mejores modalidades de ataque a las moléculas diana.

Además, el potencial redox del metal puede interactuar con el estado redox celular, modificando la viabilidad celular, directamente o a través de un proceso de activación de un compuesto inicialmente inerte, lo que permite modular la toxicidad del fármaco.

### 1.3 El cisplatino en quimioterapia

El cisplatino (*cis*-diaminodicloroplatino (II)) (Figura 2) es uno de los fármacos más utilizados desde su comercialización en 1978<sup>8</sup> para el tratamiento de ciertos tumores sólidos, particularmente de células escamosas de cabeza y cuello, de testículos y de ovario.<sup>9</sup> También se utiliza para tratar el cáncer de vejiga, esofágico, pulmonar, de mama, cervical, de estómago y de próstata.<sup>10</sup> De hecho, se utiliza en más del 70% de todos los pacientes con cáncer.

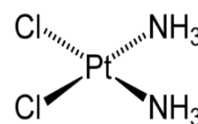


Figura 2. Estructura del cisplatino

El mecanismo de acción del cisplatino no es completamente conocido, pero se cree que comienza con la hidrólisis de los enlaces Pt-Cl para formar acu(hidroxi) derivados.<sup>11</sup> Estos derivados son especies altamente reactivas con una fuerte tendencia a sustituir las moléculas de agua por otros ligandos nucleofílicos<sup>12,13</sup>, de manera que, en el interior de la célula, el cisplatino es capaz de reaccionar con las bases nitrogenadas del ADN, que actúan como ligandos nucleofílicos. Los puntos de coordinación con el ADN se producen preferentemente con el nitrógeno en la posición 7 (N7) del anillo imidazol de la guanina y la adenina ya que son los átomos con mayor densidad electrónica y más accesibles al ataque electrofílico del cisplatino.<sup>14</sup> El resultado final de estas interacciones es la formación de aductos, mayoritariamente (~ 65 %), con dos guaninas adyacentes dentro de la misma cadena del ADN (enlaces cruzados 1,2-intracadena), del tipo Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>dGpG, aunque también se forman aductos (~ 25 %) correspondientes a enlaces cruzados 1,2-intracadena con una guanina y una adenina adyacentes.<sup>15</sup> La formación de este tipo de estructuras bloquea la replicación y la transcripción del ADN, desencadenando una cascada de señalización de apoptosis que lleva, finalmente, a la muerte celular.

Desafortunadamente, pese a su gran éxito en el tratamiento del cáncer, el uso clínico del cisplatino no está exento de inconvenientes que limitan tanto las dosis como la duración del tratamiento y su efectividad. En este sentido, en primer lugar el cisplatino presenta importantes efectos secundarios, los más importantes la ototoxicidad, la nefrotoxicidad, la neurotoxicidad (neuropatía periférica) y la mielosupresión (reducción en la actividad en la médula espinal)<sup>16,17</sup>. Entre todos ellos, destaca la nefrotoxicidad, que se reconoció desde los primeros ensayos clínicos como la toxicidad dosis-limitante. Esta nefrotoxicidad fue la que comprometió el uso generalizado del fármaco en los primeros años de su introducción en clínica y la que en la actualidad más condiciona su manejo práctico.

En segundo lugar, algunos tumores no responden al tratamiento con cisplatino (presentan resistencia intrínseca) y otros pueden desarrollar resistencia durante el curso del tratamiento, a pesar de haber presentado una respuesta inicial al mismo (resistencia adquirida). Las causas de esta resistencia (intrínseca o adquirida), aunque se han estudiado extensamente, están lejos de ser conocidas. Lo que sí se sabe es que son complejas y están influidas por muchos factores.

Está claro que el objetivo de los fármacos citostáticos es conseguir la muerte de la célula tumoral y, para ello, es necesario que la mayor cantidad de fármaco posible llegue a su diana molecular. Por tanto, cualquier circunstancia que se interponga o dificulte este objetivo puede ser un factor desencadenante de resistencia. En el caso concreto del cisplatino, puesto que su diana molecular es el ADN del núcleo celular, se han postulado los siguientes factores como causantes de su resistencia farmacológica (Figura 3)<sup>16</sup>:

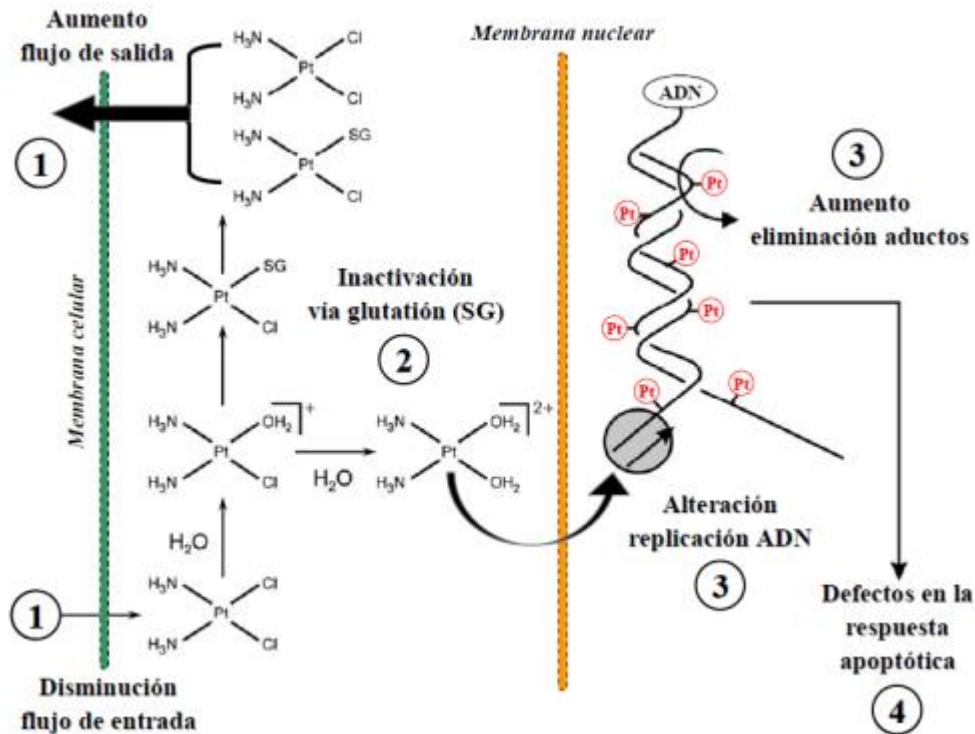
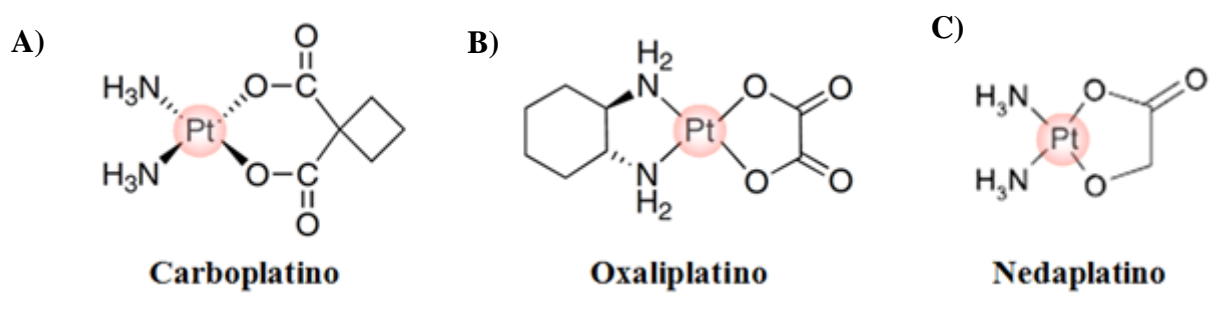


Figura 3. Esquema de las posibles formas de resistencia al cisplatino

- 1) Disminución de la concentración intracelular de cisplatino: como es lógico, si el cisplatino no puede acumularse en la célula, no podrá unirse al ADN y causar la muerte celular. Por lo tanto, el desarrollo de mecanismos que impidan la entrada del cisplatino en la célula resulta beneficioso para la célula tumoral.
- 2) Desactivación intracelular del cisplatino: una vez dentro de la célula, el cisplatino puede ser inactivado por unión a compuestos intracelulares, fundamentalmente, aquellos que contienen grupos tiol como el glutatión (GSH). De esta manera, el cisplatino libre que es capaz de unirse al ADN disminuye.
- 3) Alteración de las vías de reparación del ADN: la unión del cisplatino al ADN y la persistencia de estos aductos es vital para inducir la muerte celular. Por lo tanto, otro mecanismo causante de resistencia es el aumento de la capacidad de la célula tumoral para reparar dichos aductos.<sup>18</sup>
- 4) Disfunción de los sistemas reguladores de apoptosis: la formación de los aductos cisplatino-ADN representa el estímulo por el que se inicia una cascada de señales que desencadena la apoptosis. Por lo tanto, alteraciones en genes y sus proteínas correspondientes que tienen un papel clave en la regulación de la apoptosis pueden contribuir a la resistencia.

La toxicidad y la resistencia celular relacionadas con el empleo del cisplatino como fármaco citostático han propiciado la investigación en la búsqueda de nuevos complejos de coordinación de platino con similar actividad antineoplásica pero con menores problemas de resistencia y toxicidad. Aunque se han llegado a sintetizar más de 3000 compuestos de platino, solo 23 han sido sometidos a ensayos clínicos y únicamente dos de ellos han sido aprobados para su uso en quimioterapia a nivel mundial: el carboplatino [cis-diamino(1,1-ciclobutanodicarboxilato)platino(II)], y el oxaliplatino [trans-L-1,2-diamonociclohexanooxalatoplatino(II)], cuyas estructuras se representan en la Figura 4. En Japón, también se ha aprobado el uso del nedaplatino [cis-diaminoglicolatoplatino (II)] (Figura 4C)



*Figura 4. Estructuras químicas de los nuevos fármacos derivados del platino*

El mecanismo de acción de estos nuevos fármacos de platino a nivel celular es idéntico al del cisplatino, dada su similitud estructural. Es decir, forman el mismo tipo de aductos con el ADN.<sup>19</sup> De ahí, que ninguno de ellos presente grandes ventajas clínicas frente al cisplatino, por lo que éste sigue siendo el fármaco de Pt más utilizado.

### 1.4 Complejos de rutenio en quimioterapia

A pesar del gran éxito del cisplatino y sus análogos (oxaliplatino y carboplatino) y su amplia utilización en quimioterapia, su eficacia está limitada, como ya se ha comentado, por los efectos secundarios y por los fenómenos de resistencia, tanto intrínseca como adquirida, en la respuesta tumoral. Por lo tanto, existe un gran interés en el desarrollo de nuevos complejos metálicos que puedan servir como fármacos antineoplásicos con menor toxicidad, menos problemas de resistencia y mayor o igual efectividad que los compuestos de platino. Sin embargo, aunque en las últimas décadas se han llegado a sintetizar miles de nuevos compuestos derivados de una treintena de metales, solo unos pocos han llegado a completar el proceso de desarrollo clínico y la aprobación de las autoridades sanitarias.

En este sentido, uno de los metales más prometedores para el desarrollo de fármacos antitumorales es el rutenio. El rutenio es un metal de transición del grupo 8 de la tabla periódica. Fue descubierto por Karl Ernst Claus en 1844 y es un metal de transición seminoble, poco abundante y que presenta características físicas y químicas en común con otros elementos como Pt, Os, Rh, Ir y Pd. El uso de rutenio como alternativa al platino fue propuesto por primera vez por L.J. Anghileri et al.<sup>20</sup>, con estudios sobre policones de rutenio provistos de actividad antitumoral. Posteriormente, T. Giraldi et al.,<sup>21</sup> describieron la actividad antitumoral de los complejos de Ru(II) y (III). Desde entonces, se han desarrollados numerosos complejos de rutenio con fines terapéuticos, aunque hasta la fecha solo dos de ellos están siendo sometidos a ensayos clínicos de fase II.

Debido a la estructura octaédrica de los complejos de rutenio (II) y (III), en contraposición a la estructura plano-cuadrada de los compuestos de Pt (II), es de esperar que los complejos de rutenio presenten un mecanismo de acción diferente al del cisplatino y sus análogos. Por ello, muchos trabajos de investigación van enfocados a dilucidar los mecanismos de interacción con el ADN para estudiar si esta interacción puede explicar la diferente actividad de los compuestos de rutenio respecto a los complejos de platino en uso clínico.

### **Propiedades químicas y bioquímicas de los complejos de rutenio**

El rutenio posee unas propiedades muy interesantes para su aplicación en el campo farmacológico, como son:<sup>22</sup>

#### ***Cinética lenta de intercambio de ligandos***

Un importante factor para explicar por qué funciona el platino como fármaco antitumoral se relaciona con sus cinéticas de intercambio de ligandos, que son del orden de minutos a días, en lugar de microsegundos a segundos como ocurre con muchos compuestos de coordinación. Esto le da al Pt una elevada estabilidad cinética. El Ru(II) y Ru(III) tienen cinéticas de intercambio de ligandos similares al Pt(II).<sup>23</sup> Estas cinéticas están en la escala de tiempos del proceso de división celular, lo que quiere decir que si el rutenio se une a algún componente celular permanecerá unido el resto de la vida de la célula. Además, el rutenio tiene la posibilidad de unirse no solo a ligandos con átomos de S, O y N nucleofílicos de forma similar al platino, sino que dado que tiende a formar complejos con estructura octaédrica ofrece la posibilidad de unión de dos ligandos más que el Pt(II), que forma complejos con geometría plano-cuadrada. En consecuencia, los

complejos de Ru(II)/(III) tienen la posibilidad de unirse no solo al ADN, sino también a otras biomoléculas.

### ***Múltiples estados de oxidación***

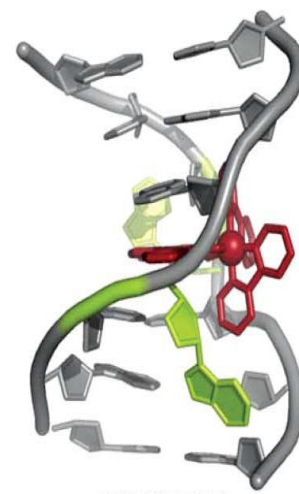
El rutenio puede presentar varios estados de oxidación (+2, +3 y +4) bajo condiciones fisiológicas. En estos estados, el rutenio se coordina en geometría octaédrica con 6 ligandos. Las alteraciones en el metabolismo de las células cancerosas dan lugar a una concentración de oxígeno más baja en los tejidos tumorales que en los tejidos sanos, lo que favorece un ambiente reductor. Además, las células tumorales presentan elevados niveles de glutatión y un pH más bajo que las normales, aumentando, aún más, la capacidad de reducción.<sup>24</sup> De esta manera, se puede aumentar la selectividad de los complejos de rutenio hacia las células cancerosas y minimizar el daño a las células sanas administrándolo en forma de complejos relativamente inertes de Ru(III) (profármacos) que se activan por reducción dentro de los tejidos cancerosos. Este mecanismo se conoce como “mecanismo de activación por reducción” e interviene en todos los complejos de Ru que se administran en estado de oxidación +3.

### ***Capacidad para imitar el comportamiento del hierro***

El rutenio imita al hierro uniéndose a la transferrina,<sup>25</sup> una proteína transportadora de hierro en el plasma sanguíneo. Ya que las células que se dividen rápidamente (incluidas las tumorales) tienen un mayor requerimiento de hierro, muchos receptores de transferrina sobre la superficie celular se encuentran sobre-expresados. Por esta razón, estudios *in vivo* han mostrado un aumento de entre 2 y 12 veces en la concentración de rutenio en células tumorales comparadas con células sanas.<sup>26</sup> Por lo tanto, dado que el rutenio llega preferentemente a las células tumorales, su toxicidad en el organismo se espera, al menos en teoría, que se vea reducida.

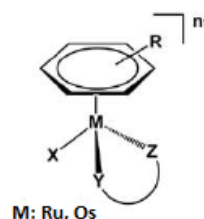
### Mecanismos de acción de los complejos de rutenio

El mecanismo por el cual los complejos de rutenio ejercen su actividad antineoplásica es todavía muy poco conocido. En algunos casos, se ha descrito una importante habilidad para unirse al ADN,<sup>27</sup> lo que hace pensar que éste podría ser una de sus principales dianas terapéuticas. Además, en el caso de complejos de rutenio que tengan en su estructura ligandos lábiles (buenos grupos salientes) como el Cl<sup>-</sup>, además de ligandos hidrofóbicos, se pueden esperar dos formas de unión.<sup>18,28</sup> Por un lado, la hidrólisis del ligando lábil (Cl<sup>-</sup>), genera los correspondientes acuo-complejos, que ven aumentada su reactividad permitiéndoles unirse de forma covalente a los N7 de la guanina de forma similar a como lo hace el cisplatino. Por otro lado, los ligandos hidrofóbicos pueden tener tendencia a interactuar con la parte hidrofóbica del ADN, intercalándose entre las dos hebras, como se muestra en la Figura 5.



**Figura 5:** Modelo de interacción por intercalación de un compuesto de Ru en el ADN

En los últimos tiempos, el trabajo en la búsqueda de complejos de Ru se ha focalizado mucho en el potencial antitumoral de complejos areno semi-sandwich de Ru(II) del tipo  $[(\eta^6\text{-areno})\text{Ru}(\text{YZ})(\text{X})]$ ,<sup>28</sup> donde YZ es un ligando quelato y X un buen grupo saliente como el Cl<sup>-</sup> (Figura 6). La bibliografía describe estos complejos como en forma de “taburete de piano”, en los que el ligando areno forma el “asiento” del taburete. Existe un elevado interés en la síntesis de este tipo de compuestos, debido al potencial que se presenta al poder variar cada uno de sus componentes (areno, ligando quelato YZ y ligando monodentado X) lo que permite cambiar sus propiedades cinéticas y termodinámicas.



**Figura 6.** Estructura genérica típica de un compuesto de tipo “taburete de piano” con quelato

Este tipo de complejos de Ru(II) muestran actividades *in vitro* e *in vivo* muy prometedoras. Estos compuestos monofuncionales se cree que se unen coordinativamente al N7 de la guanina en el ADN, que puede complementarse por uniones de intercalación del areno, así como interacciones específicas de puentes de hidrógeno entre el ligando quelato y el C6O de la guanina.<sup>29</sup> Estas interacciones adicionales dan lugar a modos de

unión a la cadena de ADN únicos y distorsiones estructurales diferentes a las que causa el cisplatino. Esto puede explicar que no exista resistencia cruzada de estos compuestos con cisplatino.

### Algunos complejos de Ru como fármacos potenciales

Dentro del grupo de compuestos organometálicos que contienen rutenio en su estructura, existen dos complejos que están ya en fase II de estudios clínicos, que son NAMI-A y KP1019, cuyas estructuras se muestran en las Figuras 7 y 8. Otros, como RM175 (Figura 9) y RAPTA-T (Figura 10) son prometedores candidatos aún en fases preclínicas.<sup>30</sup>

A pesar de las semejanzas estructurales y químicas entre los complejos de NAMI-A y KP1019, estos dos complejos de Ru(III) muestran diferente actividad antitumoral. En estudios preclínicos, NAMI-A ha demostrado tener un efecto inhibitorio contra la formación de metástasis en una variedad de tumores modelo en animales, pero carece de un efecto citotóxico directo sobre el tumor primario. En cambio, el KP1019 presenta una actividad antitumoral directa, induciendo la apoptosis de las células tumorales del cáncer primario. En cualquier caso, el mecanismo de acción de ambos complejos está todavía por dilucidar.

#### NAMI-A

Este compuesto ha sido el primer complejo de rutenio en entrar en estudios clínicos, habiendo finalizado ya la fase I para estudiar la dosis, determinar la farmacocinética y evaluar la toxicidad en 24 pacientes con diferentes tipos de tumores que habían sido tratados previamente con cirugía, quimioterapia y, en algunos casos, radioterapia.

El complejo ha demostrado poseer actividad antimetastásica independientemente del tipo de tumor primario y de la etapa de crecimiento de la metástasis. Su mecanismo de acción parece implicar diversos factores, como son: interacción con la regulación del ciclo celular, llevando a una acumulación de células en G<sub>2</sub>/M; inhibición de las metaloproteinasas de matriz; aumento de la matriz extracelular alrededor de la vascularización del tumor, evitando que éste invada los tejidos cercanos y los vasos sanguíneos; unión a los ácidos nucleicos y, por lo tanto, afectando directamente al ADN de la célula tumoral.<sup>22</sup>

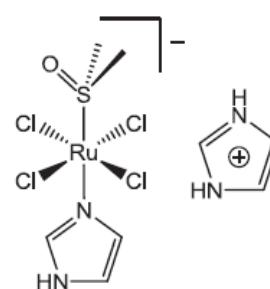


Figura 7. Estructura del NAMI-A



### KP1019

Es el segundo compuesto de rutenio que ha superado la fase I de estudios clínicos y también se han llevado a cabo estudios farmacocinéticos.<sup>31</sup> En estos estudios, realizados con 8 pacientes con tumores sólidos avanzados (incluyendo colorrectal, endometrial, melanoma y carcinomas de vejiga), se obtuvieron 5 casos de estabilización de la enfermedad de entre los 6 pacientes evaluables, en algunos casos en hasta 7 semanas con solo un ciclo de administración del fármaco.<sup>32</sup>

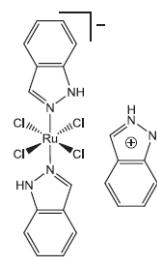


Figura 8: Estructura de KP1019

A diferencia de NAMI-A, KP1019 posee actividad directa citotóxica promoviendo la apoptosis en líneas celulares cancerosas, así como en diferentes tumores modelo (principalmente de cánceres colorrectales), incluyendo tumores primarios explantados humanos. El mecanismo de acción del KP1019 es, de nuevo, poco conocido, pero parece que implica: unión a la transferrina, activación por reducción a Ru(II) e inducción de apoptosis vía mitocondrial. El camino mitocondrial parece ser el principal responsable de la citotoxicidad, al menos en estudios *in vitro*, ya que lleva a la despolarización de la membrana celular, activando la apoptosis. También se ha demostrado en estudios con inhibidores de la reparación del ADN la participación en dicho daño de las interacciones del complejo con el ADN.<sup>32</sup>

En cuanto a las interacciones con el ADN, KP1019 se comporta de forma similar al cisplatino pero con una menor intensidad, unas 15 veces inferior.<sup>30</sup> En este sentido, la reducción del KP1019 por glutatión y ácido ascórbico aumenta la eficiencia de las rupturas producidas en ADN de cadena sencilla.

### RM175

Este tipo de compuestos exhiben un mecanismo diferente al de activación por reducción característico de los anteriores NAMI-A y KP1019, ya que en este caso el átomo de Ru del complejo se encuentra ya en su forma activa en estado de oxidación +2. Lo más característico de este compuesto es su forma de “taburete de piano”,

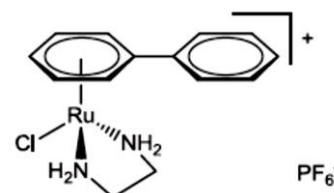


Figura 9. Estructura de RM175

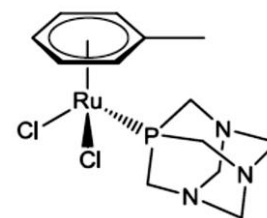
bastante común en este tipo de complejos, en el que el asiento está formado por el areno y las patas serían el ligando quelato etilendiamina y un cloruro como grupo saliente. Este tipo de compuestos son muy interesantes como fármacos antitumorales, ya que esta

estructura les concede la capacidad de generar una nueva forma de interactuar con el ADN que evite la resistencia que la célula puede haber adquirido al cisplatino. En este sentido, se cree que estos complejos con ligandos areno, además de su afinidad por las guaninas se pueden intercalar entre las dos hebras del ADN por interacciones hidrofóbicas, generando un mayor daño.<sup>29,33</sup>

Los aductos que forman los complejos areno de Ru(II) se eliminan del ADN por mecanismos diferentes al de reparación por escisión de nucleótidos, que es el mecanismo de reparación más habitual del cisplatino, lo que, junto con los nuevos modos de unión, explica la ausencia de resistencia cruzada al cisplatino.

### **RAPTA-T**

De nuevo nos encontramos ante un complejo de Ru(II), que ya se encuentra en su forma activa en estado de oxidación +2. El RAPTA-T pertenece a una familia de compuestos análogos del RAPTA (rutheno-areno-1,3,5-triaza-7-fosfatriciclo-[3.3.1.1]decanofosfina). De entre ellos, el RAPTA-T es el más estudiado.



*Figura 10. Estructura de RAPTA-T*

La estructura del RAPTA-T tiene la forma de “taburete de piano” típica con la parte superior del “taburete” formada por el ligando areno en coordinación  $\eta^6$ . En posición ecuatorial, tiene 2 ligandos Cl<sup>-</sup> lábiles y la estructura de tipo caja PTA (1,3,5-triaza-7-fosfaadamanteno), un ligando fosfano que hace al complejo más soluble en agua. Además, este grupo PTA confiere al complejo características biológicas interesantes, ya que permite que estos complejos se activen selectivamente en el medio ligeramente hipóxico de ciertos tumores sólidos. Así, el RAPTA-T, al igual que otros derivados similares conteniendo el grupo PTA es poco citotóxico en células normales, pero su citotoxicidad aumenta unas 4.5 veces en las células tumorales.

Este compuesto ha mostrado, además, modificaciones en el comportamiento de las células tumorales en cuanto a invasión y metástasis *in vitro* e, incluso, *in vivo* en ratones, donde ha mostrado una reducción moderada de la metástasis.<sup>26</sup>

### Nuevos compuestos antitumorales de rutenio

Uno de los problemas en la síntesis de nuevos complejos de rutenio con propiedades antineoplásicas es su escasa solubilidad en agua. Una de las formas más comunes de obtener compuestos organometálicos solubles en agua es mediante la presencia en el complejo de ligandos con propiedades hidrofílicas. Algunos de estos ligandos son los fosfanos solubles, entre los que, como ya se ha mostrado anteriormente, ha destacado el fosfano terciario de tipo caja PTA, 1,3,5-triaza-7-fosfatriciclo[3.3.1.1<sup>3,7</sup>]decano o 1,3,5-triaza-7-fosfaadamanteno, PTA (Figura 11). Este ligando tiene una elevada solubilidad en agua debido a la participación de sus tres átomos de nitrógeno en la formación de puentes de hidrógeno. En este sentido, se han realizado ya numerosos ensayos biológicos con muchos complejos conteniendo ligandos areno y PTA, entre ellos la familia de los RAPTA.<sup>34,35</sup>

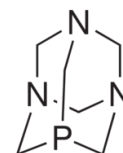


Figura 11. Ligando PTA

Los análogos del RAPTA-T conteniendo el ligando 1-CH<sub>3</sub>-PTA (Figura 12) han resultado tener una mayor citotoxicidad frente a células sanas que frente a las tumorales.<sup>36</sup> Esto se cree que es debido a un aumento de las interacciones con el ADN, debido a su carga positiva, y a mayores interacciones con las proteínas.<sup>37</sup>

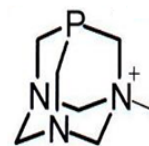


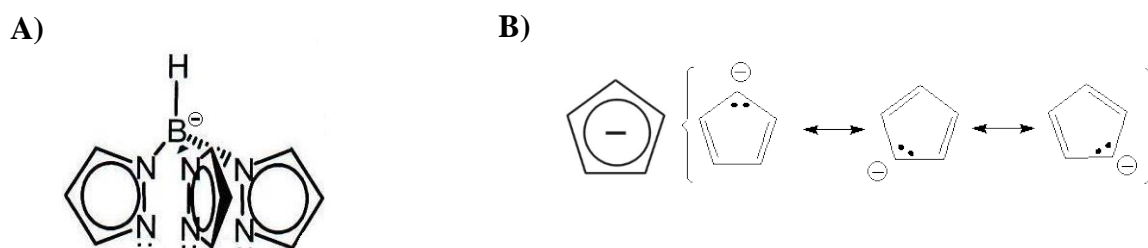
Figura 12. Ligando 1-CH<sub>3</sub>-PTA

Actualmente, el interés por el diseño de nuevos complejos de rutenio como agentes antitumorales se basa en el papel que juegan el grupo areno y los ligandos auxiliares como determinantes de las propiedades químicas y, por lo tanto, de la actividad biológica de estos compuestos. Así, estudios recientes sobre la actividad antitumoral de compuestos areno de rutenio muestran una relación entre el tamaño del areno y su actividad biológica, de forma que la citotoxicidad aumenta con el tamaño del anillo.<sup>38,39</sup>

A pesar de los muchos complejos sintetizados basados en rutenio, todos ellos se basan en la estructura “semi-sandwich” con un ligando de tipo areno. Sin embargo, solo se han realizado unos pocos estudios con complejos de Ru con ligandos ciclopentadienilo y, hasta la fecha, muy pocos y en poca profundidad, se habían llevado a cabo con complejos de hidrurotris(pirazolil)borato rutenio(II).

El ligando hidrurotris(pirazolil)borato (Tp) (Figura 13A), se considera generalmente análogo al  $\eta^5$ -ciclopentadienilo (Cp) (Figura 13B) debido a que tienen la misma carga y

son isoelectrónicos.<sup>40</sup> Sin embargo, el ángulo cónico del Tp está cerca de los 180°, mientras que Cp y Cp\* ( $\eta^5$ -pentametilciclopentadienilo) tienen, respectivamente, 100 y 146°. Como ya se ha mencionado, se esperaría que este aumento de tamaño favorezca una mayor actividad antitumoral, como ha ocurrido con otros derivados de rutenio.



**Figura 13.** Estructuras del ligando Tp (A) y del ligando Cp y sus formas resonantes (B)

En este sentido, el Grupo de Química Organometálica, perteneciente al Instituto de Química Organometálica “Enrique Moles” y al Departamento de Química Orgánica e Inorgánica de la Universidad de Oviedo sintetizaron, por primera vez, una serie de complejos de rutenio conteniendo ambos ligandos hidrurotris(pirazolil)borato (Tp) y 1,3,5-triaza-7-fosfaadamanteno (PTA),<sup>41</sup> siendo estos los primeros complejos de rutenio conteniendo el ligando Tp solubles en agua. Además, se sintetizó también una serie análoga de complejos conteniendo el ligando 1-CH<sub>3</sub>-PTA en lugar del PTA. La citotoxicidad de todos los compuestos sintetizados fue evaluada mediante un ensayo de inhibición del crecimiento *in vitro* sobre células tumorales y normales. De entre todos los compuestos ensayados, se seleccionaron los 4 compuestos con mejores propiedades, cuyas estructuras se recogen en la Tabla I.

**Tabla I:** Compuestos de Ru seleccionados para su estudio

Fórmula	[RuCl(κ <sup>3</sup> (N,N,N)-Tp)(PPh <sub>3</sub> )( <i>m</i> -PTA)] [CF <sub>3</sub> SO <sub>3</sub> ]	[RuCl(κ <sup>3</sup> (N,N,N)-Tp)(PPh <sub>3</sub> )(PTA)]	[RuH(κ <sup>3</sup> (N,N,N)-Tp)(PPh <sub>3</sub> )( <i>m</i> -PTA)] [CF <sub>3</sub> SO <sub>3</sub> ]	[RuH(κ <sup>3</sup> (N,N,N)-Tp)(PPh <sub>3</sub> )(PTA)]
Nombre abreviado	ASR3	ASR7	ASR12	ASR14
Peso molecular	933.09	768.99	898.65	734.54

(OTf: contraión triflato, CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub><sup>-</sup>);

### Ensayos previos

En estudios de farmacocinética, uno de los primeros datos que se evalúan en un nuevo compuesto es el valor de IC<sub>50</sub>. Este parámetro, conocido como concentración de inhibición del 50%, es una medida de la efectividad de un compuesto en la inhibición de un proceso biológico o bioquímico. El IC<sub>50</sub> representa la concentración de compuesto necesaria para inhibir dicho proceso a la mitad *in vitro*. En el caso de un cultivo de células tumorales o normales, corresponde a la concentración necesaria para reducir su crecimiento a la mitad. De este modo, valores bajos de IC<sub>50</sub> se relacionan con una elevada citotoxicidad del fármaco, que significaría una buena actividad del mismo si se da en células tumorales o posibles efectos adversos demasiado graves si se da en células normales. La combinación ideal en este caso sería, por lo tanto, valores bajos de IC<sub>50</sub> en células tumorales y valores elevados para células normales, lo que indicaría una elevada especificidad del fármaco frente a las células tumorales.

Los resultados que se obtuvieron para los IC<sub>50</sub> de los cuatro compuestos seleccionados se muestran en la Tabla II.<sup>40</sup>

**Tabla II:** Valores de  $IC_{50}$  para los compuestos ASR3, ASR8, ASR12 y ASR14

Línea celular	Tipo de células	$IC_{50}$ ( $\mu$ M)			
		ASR3	ASR7	ASR12	ASR14
NCI-H460	Carcinoma de pulmón	$3.1 \pm 0.4$	$27.0 \pm 1.4$	$3.1 \pm 0.3$	$3.4 \pm 0.3$
SF-268	Glioblastoma	$3.4 \pm 0.5$	$28.2 \pm 2.2$	$3.1 \pm 0.3$	$2.6 \pm 0.2$
MCF-7	Cáncer de mama	$4.1 \pm 0.5$	$11.3 \pm 1.4$	$3.3 \pm 0.4$	$3.1 \pm 0.3$
HUVEC	Normal	$10.6 \pm 0.4$	$25.3 \pm 1.1$	$27.9 \pm 2.7$	$6.6 \pm 0.3$

A la vista de los valores de la Tabla II, se puede concluir que se obtienen  $IC_{50}$  más bajos para las células tumorales que para las normales, lo que indica cierta especificidad en la actividad de los fármacos frente a las células tumorales. Una explicación más detallada de este estudio se puede encontrar en el artículo referenciado.<sup>40</sup>

Además, se llevaron a cabo estudios preliminares de interacción de los complejos de rutenio de interés (Tabla I) con el ADN a través de ensayos de cambio de movilidad del ADN<sup>41</sup> y mediante espectrometría de masas con Ionización/Desorción Asistida por la Matriz (MALDI-MS)<sup>40</sup>. Los resultados de estos estudios apuntaban a que existía alguna interacción con el ADN. Sin embargo, la información de estos ensayos es limitada y poco concluyente, por lo que se hacen necesarios estudios bioquímicos en más profundidad.

### 1.5 Objetivos

A lo largo de la Introducción se ha puesto de manifiesto la importancia de las interacciones de los fármacos antitumorales con moléculas de importancia biológica y, en especial, con el ADN. Por ello, en los estudios preclínicos de nuevos fármacos potenciales, es de gran importancia la evaluación de estas interacciones, en mayor medida cuando hay evidencias de que el funcionamiento del fármaco tenga rasgos en común con otros fármacos citostáticos que actúan a nivel del ADN nuclear como el cisplatino.

Por otro lado, son necesarios metalofármacos antitumorales alternativos al cisplatino que mejoren las limitaciones de éste, y para ello los complejos de rutenio, por sus características químicas y estructurales, parecen ofrecer buenas posibilidades. Además, los complejos de rutenio conteniendo el ligando hidrurotris(pirazolil)borato (Tp) junto con el fosfano soluble 1,3,5-triaza-7-fosfaadamanteno (PTA) han sido poco estudiados a pesar de que algunos estudios preliminares indican que pueden actuar como fármacos citostáticos.

Por todo ello, el objetivo general de este Trabajo Fin de Máster es la *“Evaluación de las interacciones con el ADN de nuevos complejos de rutenio con actividad citotóxica preferente hacia células tumorales”*. Este objetivo general se abordó a través de los siguientes objetivos parciales:

1. Desarrollo de una metodología basada en cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con detección UV/VIS y por espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS) para estudiar la interacción de los complejos de rutenio ASR3, ASR7, ASR12 y ASR14 con los cuatro desoxinucleótidos del ADN y selección del compuesto más reactivo.
2. Estudio de la interacción del compuesto seleccionado con un oligonucleótido de cadena sencilla.
3. Utilización de técnicas de espectrometría de masas molecular (Ionización por electrospray con detección por espectrometría de masas en tándem cuadrupolo-tiempo de vuelo, ESI-Q-TOF) para identificar/confirmar las estructuras de los aductos formados.

## **2. Experimental**

---



## 2. Experimental

### 2.1 Instrumentación

#### Espectrómetro de masas de alta resolución con fuente de plasma de acoplamiento inductivo (ICP-HR-MS)

El ICP-HR-MS utilizado fue el modelo Element 2 de Thermo Scientific (Waltham, Massachusetts, USA), cuyo esquema se representa en la Figura 14:

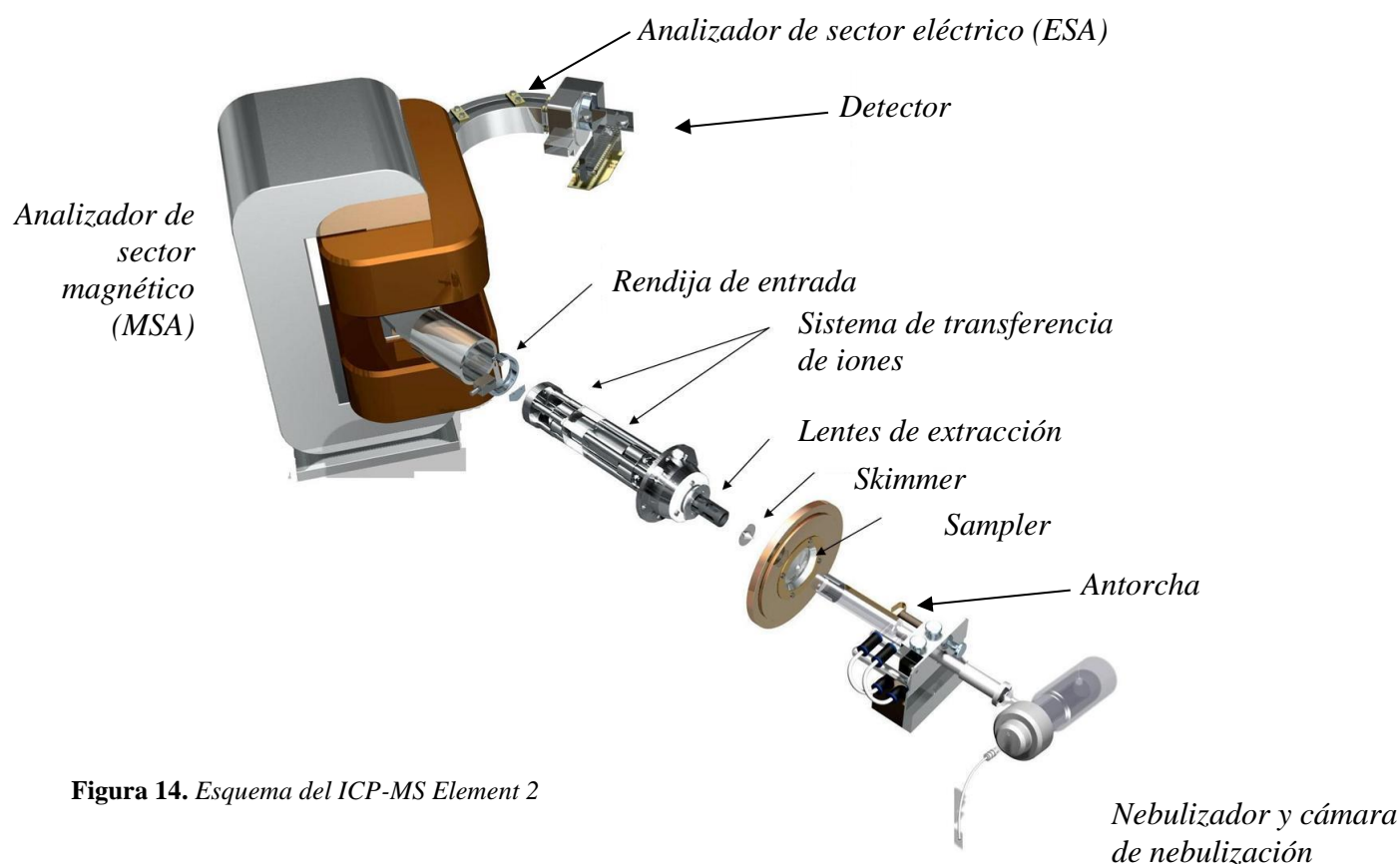


Figura 14. Esquema del ICP-MS Element 2

El ICP-MS es una de las técnicas más versátiles y poderosas para la determinación de elementos traza y ultratrazas en muestras biológicas. En este tipo de espectrómetro de masas, los iones se forman en un plasma de acoplamiento inductivo que se forma en una antorcha de cuarzo. Esta antorcha consta de tres tubos concéntricos a través de los cuales fluyen corrientes de argón. Por el tubo central entra un flujo de Ar de 0.9-1.5 L/min (gas portador) que arrastra el aerosol de la muestra formado en el nebulizador hacia el interior del plasma que se encuentra al final de la antorcha. Por el tubo intermedio entra un flujo de Ar auxiliar de unos 0.2 L/min que centra el plasma y lo coloca a la distancia correcta de la boca de la antorcha. Por el tubo más externo circula un flujo de Ar de unos 15 L/min que

es el encargado de formar el plasma (gas plasmógeno) y refrigerar la antorcha. La antorcha está rodeada, en su parte final, por una bobina de inducción conectada a un generador de radiofrecuencias (RF). Al aplicar la radiación de RF a la bobina con una potencia de entre 0.5 y 2 kW, se crea una corriente alterna que oscila con la frecuencia del generador, originando un intenso campo electromagnético en el interior de la antorcha. El plasma se inicia con el sembrado de electrones generados mediante una chispa de un dispositivo Tesla, que son acelerados en el campo electromagnético (acoplamiento inductivo) y al chocar con los átomos de Ar generan iones  $\text{Ar}^+$  y más electrones, produciéndose una reacción en cadena que genera el plasma. Este plasma se mantiene en estado estacionario por el aporte continuo de energía de RF desde el generador, resultando una bola de gas altamente ionizado con forma anular y a una temperatura de entre 5000 y 10000 K. De esta manera, cuando el aerosol de la muestra se introduce en el centro del plasma, éste tiene la energía suficiente para provocar la desolvatación, vaporización, atomización e ionización de sus componentes

Los iones generados de esta forma deben ser introducidos en el analizador de masas mediante una interfase que permita pasar desde las condiciones de altas temperaturas y presión atmosférica en el plasma al ultra-alto vacío y las bajas temperaturas (unos 0°C) del interior del analizador. Esta interfase está formada por dos conos de aleaciones de Ni o Pt, el *sampler* y el *skimmer* (ver Figura 14), separados por una cámara de expansión con una presión intermedia de 1 torr que proporciona una bomba rotatoria. Cuando traspasan el *skimmer*, la presión es ya de  $10^{-5}$  torr, proporcionada por una bomba turbo-molecular. Finalmente, los iones pasan desde el analizador de masas al detector, que es un multiplicador de electrones secundarios (SEM).

El ICP genera iones monopositivos, pero en el plasma también se pueden formar otras especies poliatómicas que, en algunos casos, pueden solapar la masa del ión que queremos analizar. Esto ocurre en el caso del  $^{31}\text{P}$ , que se analizará en el presente Trabajo y está interferido por las especies poliatómicas  $^{14}\text{N}^{16}\text{O}^1\text{H}^+$  y  $^{15}\text{N}^{16}\text{O}^+$ . Para evitar estas interferencias poliatómicas y dado que el fósforo es un elemento monoisotópico, se utilizó un equipo de ICP-MS de alta resolución que, como se muestra en la Figura 14, tiene dos analizadores en línea en geometría Niers-Johnson inversa, es decir, primero el analizador de sector magnético (MSA) que separa los iones en función de su relación  $m/z$  y a continuación el de sector electrostático (ESA), que focaliza los iones en función de su energía cinética y, por lo tanto, lo que hace es estrechar los haces de iones ya separados en

el MSA. Cambiando la apertura de la rendija de entrada en el analizador, el equipo es capaz de trabajar en 3 modos de resolución: baja ( $R_s=300$ ), media ( $R_s=4000$ ) y alta ( $R_s=10000$ ).

De este modo, en media resolución es capaz de separar la señal correspondiente a  $^{31}\text{P}$  de sus interferentes como se muestra en la Figura 15.

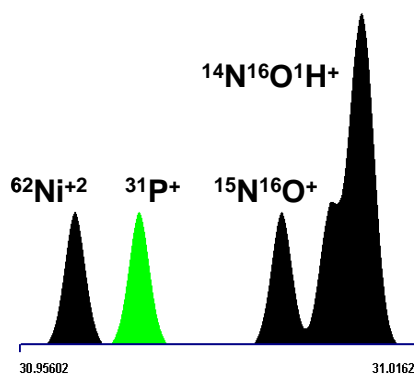


Figura 15. Espectro de masas en media resolución donde se muestra el  $^{31}\text{P}^{+}$  separado de sus interferencias poliatómicas

### Espectrómetro de masas con fuente de ionización por electro spray y analizador de masas de tipo cuadrupolo y tiempo de vuelo (ESI-Q-TOF-MS)

El ESI-Q-TOF empleado fue el modelo QStar<sup>®</sup> XL (Applied Biosystems, Langen, Alemania) con fuente MicroSpray<sup>®</sup>. Su esquema se muestra en la Figura 16. Este instrumento utiliza  $\text{N}_2$  como gas de nebulización y una celda de colisión de alta presión lineal (LINAC).

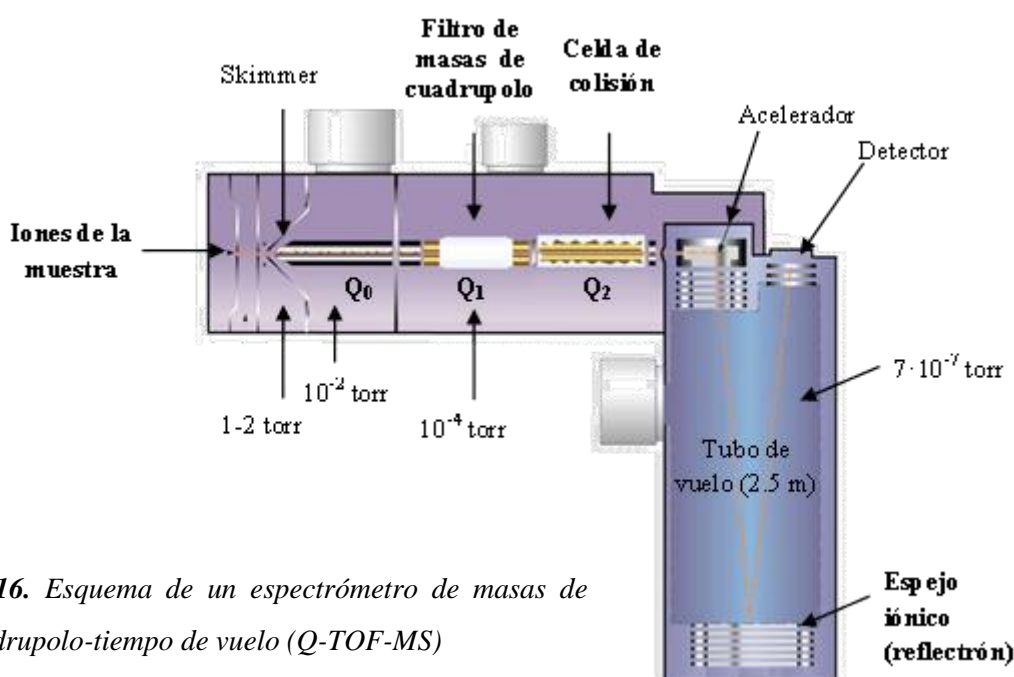


Figura 16. Esquema de un espectrómetro de masas de tipo cuadrupolo-tiempo de vuelo (Q-TOF-MS)

La ionización por electrospray (ESI) es una técnica de ionización a presión atmosférica en la que la muestra (siempre líquida y con pocas impurezas) se introduce a través de un capilar de acero inoxidable que termina en una punta metálica. La punta está sometida a un potencial de 3-6 kV respecto a un contra-electrodo. Esta diferencia de potencial hace que la muestra se transforme en un aerosol compuesto por pequeñas gotas altamente cargadas que se expande en una cámara que se encuentra a presión atmosférica. Normalmente se utiliza un flujo coaxial de gas ( $N_2$ ) alrededor del capilar para ayudar a la formación del aerosol y la desolvatación del líquido. Durante el transporte en el espacio que separa la punta del capilar del cono de extracción de los iones hacia el analizador de masas (*skimmer*) (ver Figura 16), el disolvente se va evaporando (para ello se utilizan mezclas con disolventes orgánicos), por lo que el tamaño de las gotas va disminuyendo, haciendo aumentar la repulsión entre las moléculas cargadas de la superficie de la gota. Cuando el tamaño de la gota llega a un valor crítico (límite Rayleigh), las repulsiones electrostáticas superan la tensión superficial y la microgota explota (explosión de Coulomb), produciéndose la desorción directa de los iones moleculares del analito en fase gas. Estos iones desolvatados con una o múltiples cargas son acelerados por campos eléctricos hacia el analizador de masas.

El potencial aplicado al capilar metálico puede ser positivo o negativo. Generalmente, si el analito tiene grupos funcionales que aceptan fácilmente protones (p.ej. los grupo amino en péptidos y proteínas) se trabaja en modo positivo. Si, por el contrario, el analito tiene grupos funcionales que pierden protones (p.ej. grupos fosfato en oligonucleótidos), se trabaja en modo negativo.

Los iones una vez generados a presión atmosférica pasan a una interfase de vacío cuya función es permitir la transferencia de los iones generados al analizador de masas. La cámara de vacío se divide en dos regiones (ver Figura 16). La primera de ellas está a  $1 \cdot 10^{-2}$  torr y contiene el primer cuadrupolo ( $Q_0$ ) que funciona como guía de iones. La segunda región de alto vacío contiene un segundo cuadrupolo ( $Q_1$ ), que funciona alternativamente como lente de iones en modo MS o como filtro de masas cuadrupolar en modo MS/MS. Un tercer cuadrupolo ( $Q_2$ ) o celda de colisión se llena del gas de colisión (He) en modo MS/MS y a continuación se encuentra el analizador de tiempo de vuelo (TOF) que confiere la elevada resolución de masa en estos equipos y que permitirá el análisis de los perfiles isotópicos de las moléculas. Por último, los iones se detectan en un multiplicador de electrones secundarios.

La fuente electrospray utilizada con este equipo utiliza microflujos ( $\mu$ ESI) para su funcionamiento. La ventaja de esta fuente frente a la nanoESI se encuentra en la operatividad, ya que los problemas de obstrucciones disminuyen drásticamente. A cambio, las fuentes nano, con flujos mucho más bajos y menores diámetros internos, ofrecen mayor sensibilidad, debido a que este detector es concentración-dependiente. En este tipo de detectores, la introducción de menores cantidades de muestra en flujos proporcionalmente menores no varía la intensidad de la señal. Además, flujos más bajos proporcionan fondos más bajos, por lo que la relación señal/ruido y por ello la sensibilidad, aumenta.

### **Equipos de cromatografía líquida de alta resolución**

En la actualidad, el acoplamiento HPLC-ICP-MS es, sin lugar a dudas, la técnica híbrida más versátil y poderosa para la cuantificación de biomoléculas (proteínas, aductos de ADN, etc.) que contengan o tengan asociado uno o varios heteroátomos (elementos distintos de C, O, H y N) medibles por ICP-MS. En el presente Trabajo Fin de Máster se utilizó un equipo de HPLC convencional con sistemas de detección VIS-UV y un equipo de HPLC capilar acoplado al ICP-HR-MS Element 2 como detector. Estos equipos se describen a continuación:

#### ***Equipo HPLC-UV/VIS***

Equipo de HPLC de Agilent modelo 1100 series convencional (Agilent, Waldbronn, Alemania), equipado con cuatro canales para fases móviles, desgasificador en línea mediante ultrasonidos, una bomba cuaternaria, un sistema de termostatación de columnas, automuestreador con inyección automática y un detector de diodos en línea (DAD) para la medida de la absorción de radiación UV-VIS por la fase móvil y los analitos a su paso por la celda de medida con dos lámparas de deuterio y wolframio con un rango de longitudes de onda de 190 a 950 nm.

#### ***Equipo $\mu$ HPLC Agilent***

Equipo de HPLC capilar ( $\mu$ HPLC) Agilent 1100 Series capilar equipado con cuatro canales para fases móviles, un desgasificador en línea mediante ultrasonidos, una bomba binaria capilar y un automuestreador con inyección automática capaz de inyectar microvolúmenes de muestra. Este equipo se acopló al ICP-HR-MS Element 2 como detector. Para ello, fue necesario emplear un micro-nebulizador de alta eficacia que trabajase óptimamente a los microflujos empleados en esta separación. Para ello, se utilizó un nebulizador de consumo total, que proporciona la máxima sensibilidad.

### Otra instrumentación

Balanza analítica de precisión XB220 A de Precisa Instruments Ltd. (Suiza)

pH-metro modelo micropH2000 de Crison Instruments, S.A. (Barcelona, España)

Baño de agua termostatzado de control digital modelo Digiterm 100 de J.P. Selecta (Barcelona, España)

Baño de ultrasonidos de J.P. Selecta

## 2.2 Materiales y reactivos

### Columnas cromatográficas

- Columna Narrow Bore de HPLC de fase inversa Agilent ZORBAX Eclipse XDB-C18, 150 mm de longitud x 2.1 mm de diámetro interno, 5  $\mu\text{m}$  de tamaño de partícula (Agilent Technologies, Tokio, Japón)
- Columna capilar de HPLC de fase inversa Agilent ZORBAX SB C18, 150 mm de longitud x 0.5 mm de diámetro interno, 5  $\mu\text{m}$  de tamaño de partícula (Agilent Technologies)

### Otros materiales y reactivos

- Filtro Millex-GV de 0.22  $\mu\text{m}$  (Syringe Driven) (Millipore, Bredford, MA, USA) para filtrado de disoluciones de los compuestos de rutenio
- Agua ultrapura (resistividad 18.2  $\Omega$ ) obtenida a partir de agua destilada utilizando un sistema Milli-Q (Millipore)
- Disoluciones de los compuestos ASR3, ASR7, ASR12 y ASR14 (Tabla I) en concentración de 1 mg/mL preparadas por disolución de los correspondientes compuestos puros en agua Milli-Q con asistencia por ultrasonidos y posterior filtrado con filtros de 0.22  $\mu\text{m}$  para eliminar las partículas no disueltas
- Disoluciones patrón de los cuatro nucleótidos (nucleósidos-5'-monofosfato) del ADN: 2'-desoxiguanosina-5'-monofosfato (dGMP), 2'-desoxiadenosina-5'-monofosfato (dAMP), 2'-desoxicitidina-5'-monofosfato (dCMP) y 2'-desoxitimidina-5'-monofosfato (dTMP) en concentración de 1 mg/mL preparadas por disolución de sus correspondientes sales sódicas (Sigma-Aldrich) en agua Milli-Q.

- Disolución del oligonucleótido con la secuencia 5'-TCCTGTCC-3' (P.M.=2337.6 g/mol) preparada por disolución de 609.53 µg del oligo liofilizado sintetizado por Invitrogen (Invitrogen, Barcelona, España) en 1 mL de agua
- Acetonitrilo de calidad HPLC de Fisher Scientific (Hampton, New Hampshire, USA)
- Ácido fórmico (grado analítico  $\geq 98\%$ ) de Merck (Darmstadt, Alemania)
- Acetato de amonio de Merck
- Disolución patrón de rutenio 1000 µg/mL en 10% HCl de SCP Science (Quebec, Canadá) para ICP
- Disolución patrón de fósforo de 1000 µg/mL en medio ácido de Merck para ICP
- Gases (Ar, N<sub>2</sub> y He) de 99.999% de pureza suministrados por Air Liquide (Madrid, España)

## **3. Resultados y discusión**

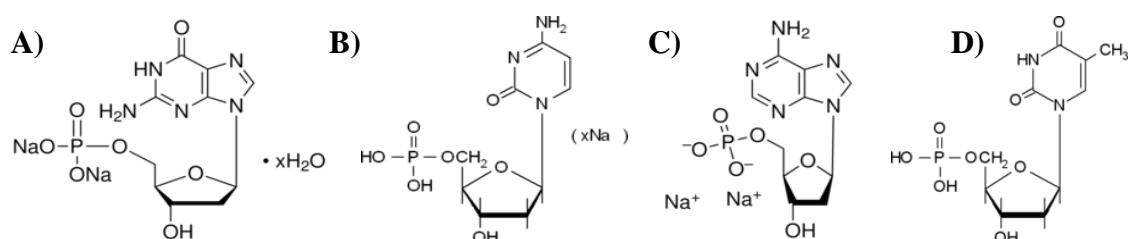
---



### 3. Resultados y discusión

#### 3.1 Estudio de la interacción de los complejos de rutenio con los nucleótidos del ADN

Con el fin de evaluar la interacción de los complejos de rutenio ASR3, ASR7, ASR12, ASR14 (Tabla I) con los nucleótidos del ADN cuyas estructuras se muestran en la Figura 17, se incubó cada compuesto por separado con cada uno de los cuatro nucleótidos. La incubación se llevó a cabo en exceso de nucleótido (relación molar nucleótido:complejo de 5:1) durante 24 horas en un baño termostatzado a 37°C.



**Figura 17.** Estructuras de las sales sódicas de los cuatro nucleótidos del ADN: (A) dGMP, (B) dCMP, (C) dAMP, (D) dTMP

#### HPLC-VIS/UV

Tras la incubación, se procedió a la puesta a punto de una metodología que permita separar los posibles productos de la reacción (aductos) del complejo de rutenio libre y del nucleótido que queda sin reaccionar. Para ello, se eligió la técnica de HPLC de fase reversa utilizando una columna *narrow-bore* Agilent ZORBAX Eclipse XDB-C18 (150 mm de longitud x 2.1 mm de diámetro interno) y como fase móvil una disolución mezcla de 0.05% de TFA en agua (disolución A) y 90% acetonitrilo/agua con 0.05% de TFA (disolución B) a un flujo de 0.2 mL/min. La detección se llevó a cabo mediante espectrofotometría de absorción VIS-UV a una longitud de onda de 260 nm, donde absorben todas las especies en estudio. Con estas condiciones se investigó el gradiente de acetonitrilo más adecuado para obtener una separación correcta en el menor tiempo posible. En todos los casos el volumen de inyección fue de 10 µL.

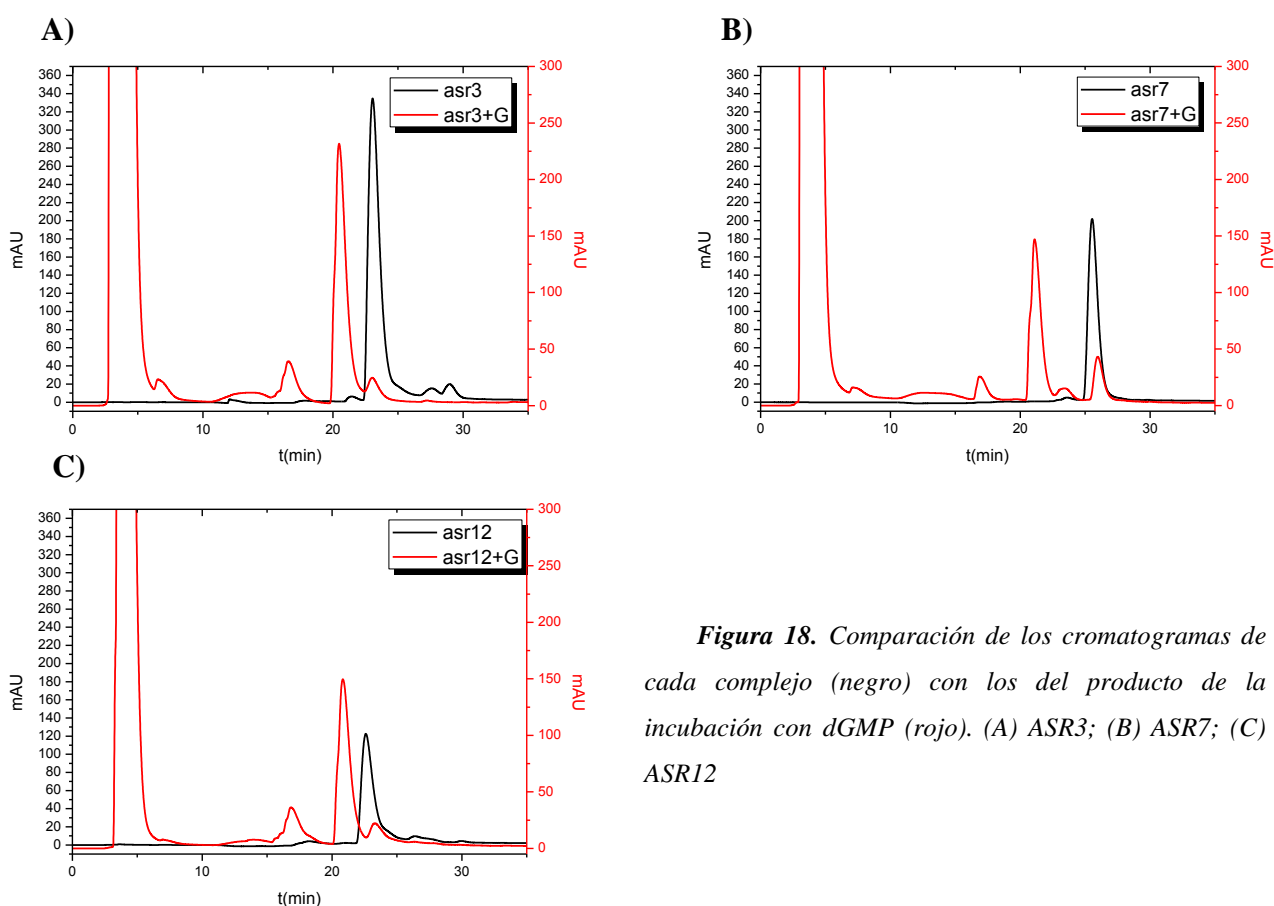
**Tabla III:** Gradiente de elución para HPLC-VIS/UV

Tiempo	% Fase B
0	3
2	3
27	100
39	100
40	3

Los mejores resultados se obtuvieron utilizando el gradiente de elución que se muestra en la Tabla III.

### **Interacción con dGMP**

Las figuras 18A, 18B y 18C recogen los cromatogramas obtenidos mediante HPLC-UV/VIS para los complejos ASR3, ASR7 y ASR12 y sus productos de reacción con dGMP en las condiciones de trabajo de la Tabla III. En estas condiciones no se consiguió la elución del complejo ASR14, debido a su gran hidrofobicidad (es el único de los cuatro que no contiene un grupo  $\text{Cl}^-$  saliente ni la carga positiva nativa debida al ligando 1- $\text{CH}_3$ -PTA, ver Tabla 1). Por lo tanto, este complejo fue descartado para futuros estudios.



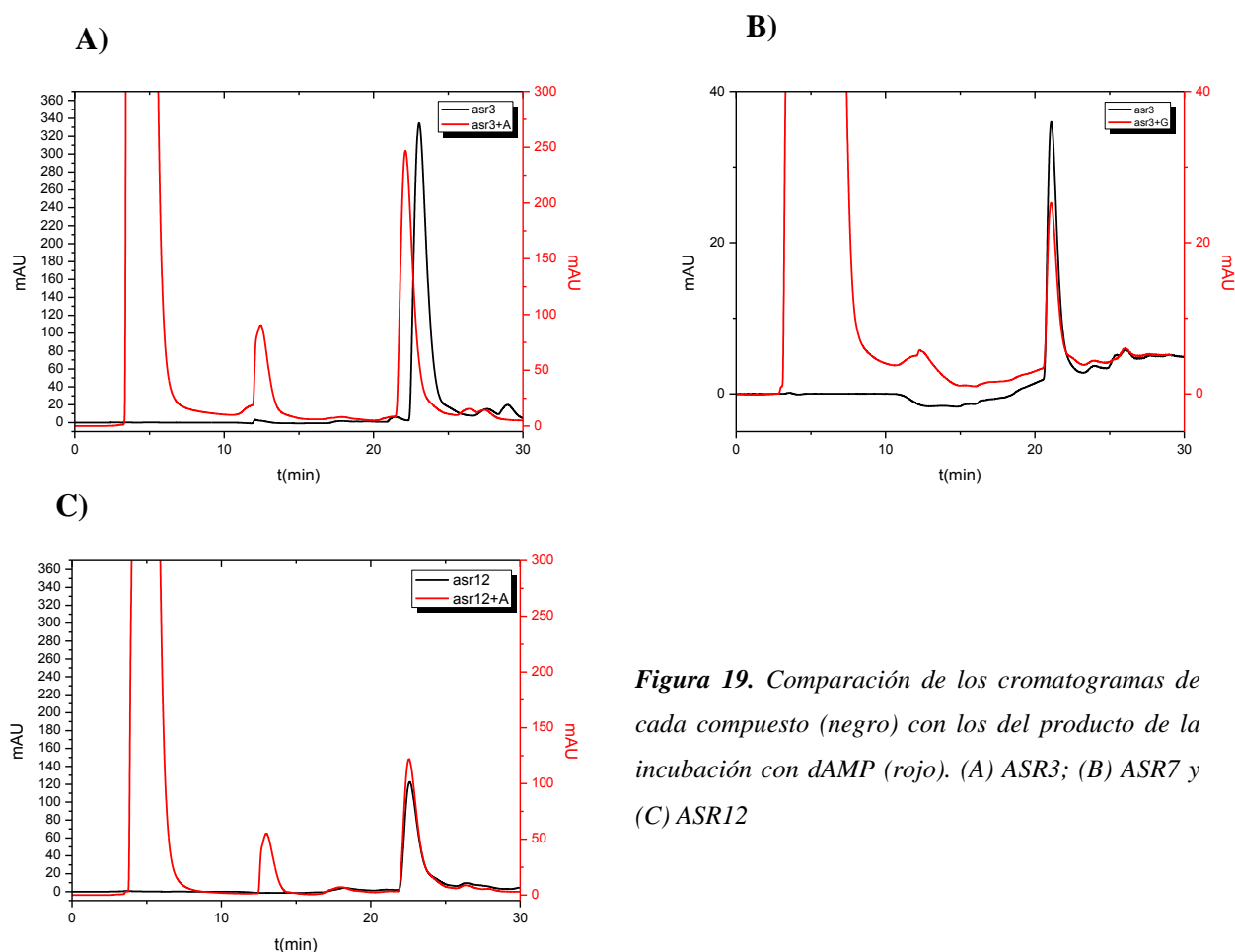
**Figura 18.** Comparación de los cromatogramas de cada complejo (negro) con los del producto de la incubación con dGMP (rojo). (A) ASR3; (B) ASR7; (C) ASR12

En los tres cromatogramas mostrados en la Figura 18 (trazo rojo) se observa un pico cromatográfico a un tiempo de retención de 5 minutos que corresponde al exceso de nucleótido que no ha reaccionado, y un pico a 17 minutos que corresponde a una impureza del patrón de nucleótido (la naturaleza de estos picos se comprobó por comparación con el cromatograma obtenido para la inyección de una disolución patrón del nucleótido libre). Después de la reacción de los complejos de rutenio con dGMP, aparece en todos los casos

un pico cromatográfico a un tiempo de retención de 21 minutos, inferior al del complejo libre que eluye a 22 min (ver Figura 18, trazo negro), y disminuye el área del pico cromatográfico correspondiente a dicho complejo libre. Estos resultados parecen indicar la formación de aductos ASR3-dGMP, ASR7-dGMP y ASR12-dGMP que eluyen con tiempos de retención de unos 21 min

### *Interacción con dAMP*

Los cromatogramas obtenidos mediante HPLC-UV/VIS para los complejos ASR3, ASR7 y ASR12 y sus productos de reacción con dAMP en las condiciones de trabajo seleccionadas como más adecuadas se muestran en la Figura 19.



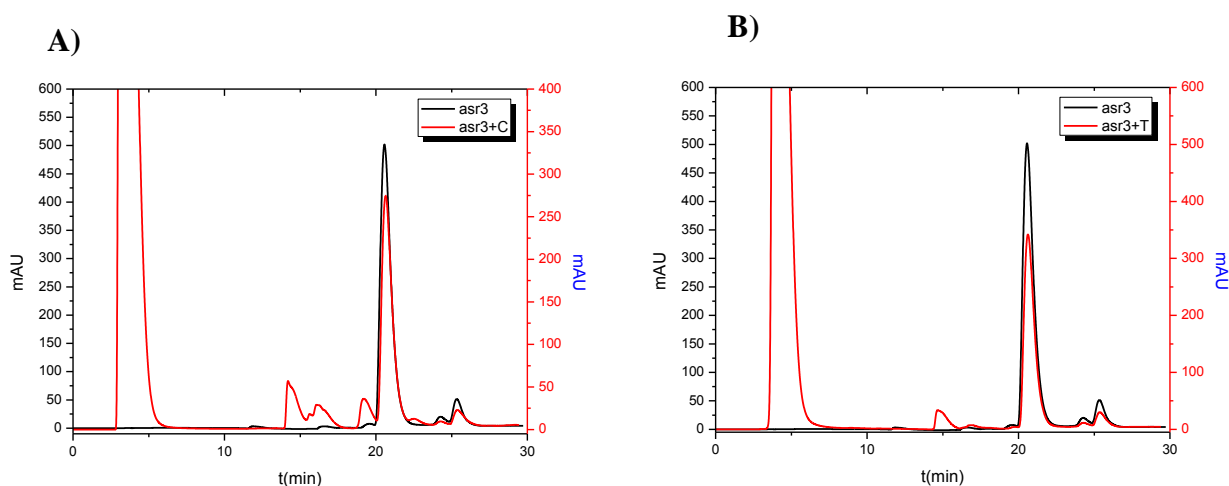
**Figura 19.** Comparación de los cromatogramas de cada compuesto (negro) con los del producto de la incubación con dAMP (rojo). (A) ASR3; (B) ASR7 y (C) ASR12

Como se puede ver en la Figura 19, el nucleótido en exceso que no reaccionó eluye de nuevo a un tiempo de retención de 5 min y presenta una impureza que eluye en torno a 12 minutos (por comparación con el cromatograma de una disolución patron de dAMP); el otro pico del cromatograma a tiempos de retención de 22 min (Figura 19A), 23 min (Figura 19B) y 24 min (Figura 19C) coincide prácticamente con el tiempo de retención de los

complejos ASR3, ASR7, ASR12 libres (Figura 19, trazo negro). Por tanto, estos resultados parecen indicar que estos complejos de rutenio no forman aductos con la dAMP.

### **Interacción con dTMP y dCMP**

A modo de ejemplo, se presentan en la Figura 20 los cromatogramas obtenidos en la incubación de ASR3 con dCMP y dTMP. Los cromatogramas obtenidos para ASR7 y ASR12 fueron similares.



**Figura 20.** Comparación de los cromatogramas del compuesto ASR3 con los del producto de la incubación con: (A) dCMP; (B) dTMP

### **μHPLC-ICP-MS**

Para confirmar los resultados obtenidos mediante HPLC-UV/VIS descritos en el apartado anterior, se procedió al acoplamiento de la separación cromatográfica con la detección específica de Ru y P mediante ICP-MS

Durante la optimización de la separación en el equipo VIS/UV, se observó que para eluir los compuestos era necesario llegar con el gradiente hasta una concentración de acetonitrilo de casi el 90% (Ver Tabla III). Esta elevada concentración de disolvente orgánico es incompatible con la detección por ICP-MS, ya que produce un enfriamiento del plasma, disminuyendo su eficacia de ionización y pudiendo llegar a producir su extinción. Además, la acumulación de carbono en los conos de extracción hace que la sensibilidad disminuya drásticamente durante la medida e, incluso, podrían llegar a obturarse. Para poder utilizar estas concentraciones de disolventes orgánicos en una técnica híbrida HPLC-ICP-MS es necesario el uso de sistemas de HPLC capilar (μHPLC).

Para la separación mediante  $\mu$ HPLC se utilizó la columna Agilent ZORBAX SB C18 (150 mm de longitud x 0.5 mm de diámetro interno) en el equipo Agilent 1100 Series Capilar. La elución se llevó a cabo con una fase móvil mezcla de 0.05% de TFA en agua (disolución A) y 90% acetonitrilo/H<sub>2</sub>O con 0.05% TFA (disolución B) a un flujo de 6  $\mu$ L/min. El volumen de inyección fue de 2  $\mu$ L y la detección se llevó a cabo mediante ICP-MS monitorizando la señal del fósforo y el rutenio.

Para ello, se utilizó un equipo de ICP-HR-MS equipado con un nebulizador de microflujos de consumo total compatible con el flujo de la fase móvil utilizado para la separación (6  $\mu$ L/min) y se procedió a optimizar los parámetros más importantes que afectan a la señal analítica de los isótopos monitorizados:  $^{31}\text{P}$  y  $^{102}\text{Ru}$ , como son: flujo de gas nebulizador, voltajes de las lentes iónicas, potencia de radiofrecuencia, anchura de rendija, resolución. En la Tabla IV se recogen los valores de los parámetros instrumentales del ICP-MS seleccionados finalmente como más adecuados.

**Tabla 4.** Condiciones de operación en el ICP-HR-MS

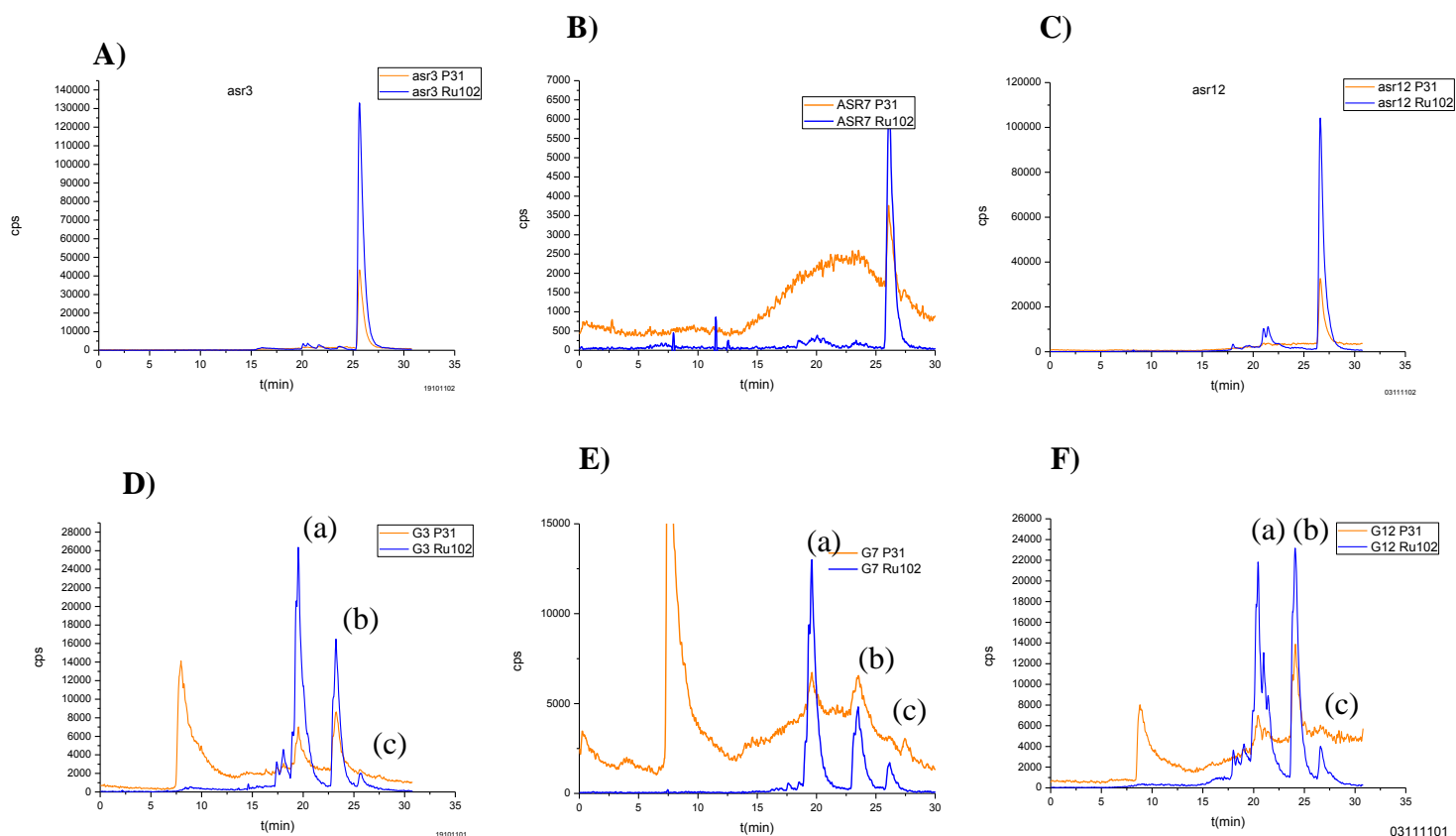
<b>Forward Power</b>	1280 W
<b>Flujo plasmógeno</b>	15 L/min
<b>Flujo auxiliar</b>	0.87 L/min
<b>Flujo gas de la muestra</b>	0.968 L/min
<b>Resolución</b>	Media (Rs=4000)
<b>Isótopos monitorizados</b>	$^{31}\text{P}$ , $^{101}\text{Ru}$ , $^{102}\text{Ru}$ , $^{104}\text{Ru}$

Una vez seleccionadas las condiciones de la detección se procedió a optimizar el gradiente más adecuado para la separación. Los mejores resultados se obtuvieron utilizando el gradiente de elución que se muestra en la Tabla V.

**Tabla V.** Gradiente en  $\mu$ HPLC-ICP-MS

<b>Tiempo</b>	<b>% Fase B</b>
0	3
3	3
23	100
28	100
29	3

Las Figuras 21A, 21B y 21C recogen los cromatogramas obtenidos mediante  $\mu$ HPLC-ICP-MS para los complejos ASR3, ASR7 y ASR12, respectivamente, en las condiciones de trabajo seleccionadas como más adecuadas (Tablas IV y V). Los cromatogramas obtenidos en dichas condiciones para los productos de la reacción de los complejos en estudio con dGMP se muestran en las Figuras 21D, 21E y 21F.



**Figura 21.** Cromatogramas obtenidos para (A) ASR3, (B) ASR7 y (C) ASR12 y sus productos de reacción con dGMP: (D) ASR3-dGMP; (E) ASR7-dGMP y (F) ASR12-dGMP. Señal de  $^{31}\text{P}$  en trazo naranja, señal de  $^{102}\text{Ru}$  en trazo azul

Como se puede ver en la Figura 21, en los cromatogramas de los productos de reacción (Figuras 21 D, E y F) aparece un pico de fósforo en torno a 10 minutos, que corresponde al exceso de nucleótido, mientras que la señal de Ru de los compuestos libres aparece a los tiempos de retención de 26 min (ASR3), 27 min (ASR7) y 27.5 min (ASR12). Cuando estos complejos reaccionan con dGMP se forman productos de reacción (aductos) que eluyen a menores tiempos de retención, picos cromatográficos marcados como (a) y (b) en las Figuras 21 D, E y F. Además, una pequeña parte de los compuestos queda sin reaccionar, dando lugar a los picos marcados como (c), que eluyen al tiempo de retención

del complejo libre (Figura 21 A, B y C). Esta fracción de compuesto no reaccionado es menor para el ASR3 que para los otros complejos de rutenio.

En cuanto a los resultados obtenidos mediante  $\mu$ HPLC-ICP-MS para la reacción de los complejos ASR3, ASR7 y ASR12 con dCMP, dTMP o dAMP pusieron de manifiesto que, al igual que se había observado mediante HPLC-UV/VIS, los complejos de rutenio en estudio no interaccionaron con estos nucleótidos.

Para establecer la naturaleza de los aductos formados con la dGMP se calcularon las áreas en cada pico de los cromatogramas de la Figura 21, tanto en la señal de  $^{31}\text{P}$  como en la de  $^{102}\text{Ru}$  y se calculó la relación entre ambas como (área de fósforo/área de rutenio) $\times 100$ . Los resultados se recogen en la Tabla VI.

	% área de $^{31}\text{P}$		
	ASR3	ASR7	ASR12
<b>Complejo libre, pico (c)</b>	31.30	27.39	28.07
<b>Pico (a)</b>	17.11	15.54	14.21
<b>Pico (b)</b>	46.14	72.76	37.29

*Tabla VI. Porcentaje de área de los picos cromatográficos de  $^{31}\text{P}$  frente a  $^{102}\text{Ru}$*

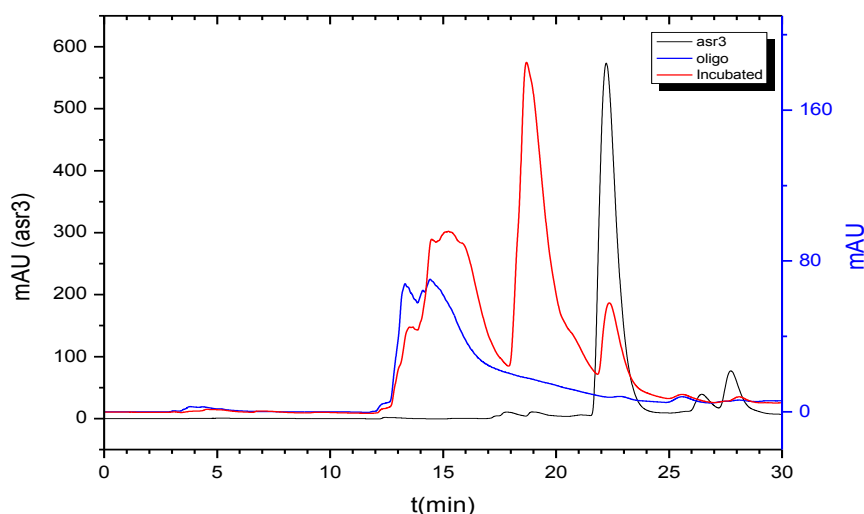
Como se puede ver en la Tabla VI, el pico correspondiente al complejo libre (pico c) presenta para los tres complejos en estudio una relación de % área de P de alrededor del 30%, que correspondería, según la estructura de los complejos (Introducción, Tabla I), a una relación estequiométrica de 2 átomos de P (uno del ligando PTA y otro del ligando –  $\text{PPh}_3$ ) por cada uno de Ru. El pico (a), correspondiente a un aducto con dGMP presenta, en todos los casos, una relación de, aproximadamente, la mitad respecto al complejo libre, que indica que el aducto tiene que tener en su estructura un único átomo de P. Esto podría explicarse si el complejo al formar el aducto con dGMP pierde sus ligandos PTA y  $\text{PPh}_3$ . El pico (b), correspondiente a otro aducto presenta, sin embargo, para ASR3 y ASR12 una relación que es, aproximadamente, 1.5 veces la que presenta el complejo libre; es decir, una especie que contendría 3 átomos de P, que podría explicarse como el aducto formado por el complejo (sin perder sus ligandos con P) con el nucleótido dGMP, que aporta un átomo de P a los dos que ya contiene el complejo de rutenio. En el caso del complejo ASR7, esta relación es 2.7 veces mayor, lo que podría indicar un aducto con varias moléculas de dGMP.

A la vista de los resultados obtenidos que acabamos de comentar, se concluyó que el complejo ASR3 es el que más interacciona de todos los estudiados con el nucleótido dGMP, ya que la proporción de complejo libre sin reaccionar era la más baja. Además, sus  $IC_{50}$  eran los más interesantes, como ya se comentó en la Introducción (ver Tabla II). Por ello, la interacción **ASR3-dGMP** fue seleccionada para continuar con los estudios posteriores.

### 3.2 Estudio de la interacción del complejo de rutenio ASR3 con el oligonucleótido de secuencia 5'-TCCTGTCC-3'

Una vez establecido que el complejo ASR3 interacciona con el nucleótido dGMP y tras la puesta a punto de la metodología adecuada para estudiar dicha interacción se procedió a estudiar la reacción de ASR3 con un oligonucleótido de secuencia 5'-TCCTGTCC-3'.

Para ello, se hizo reaccionar el oligonucleótido con el complejo de rutenio en condiciones de exceso de oligo (relación molar oligo:complejo de 2:1) durante 24 horas en un baño de agua termostaticado a 37°C. Una alícuota de 10  $\mu$ L del producto de reacción se inyectó en el sistema cromatográfico de HPLC-UV/VIS y se analizó en las condiciones cromatográficas de la Tabla III. El resultado de esta separación se muestra en la Figura 22.



**Figura 22.** Cromatogramas correspondientes a la interacción de ASR3 con el oligo de secuencia 5'-TCCTGTCC-3'. En trazo azul: oligo; en trazo negro: ASR3; en trazo rojo producto de la incubación



En la Figura 22 se puede ver que el producto de la reacción tiene tres picos en el cromatograma (trazo rojo). El primero a un tiempo, de retención de unos 15 min, que coincide con el pico correspondiente al oligonucleótido puro (trazo azul). Otro pico a 22.5 min, que coincide con el pico del complejo ASR3 (trazo negro) y un tercer pico a 19 minutos que no está presente ni en el cromatograma del oligo (trazo azul) ni en el del complejo (trazo negro) y que, por lo tanto, podría corresponder al aducto del ASR3 con el oligo.

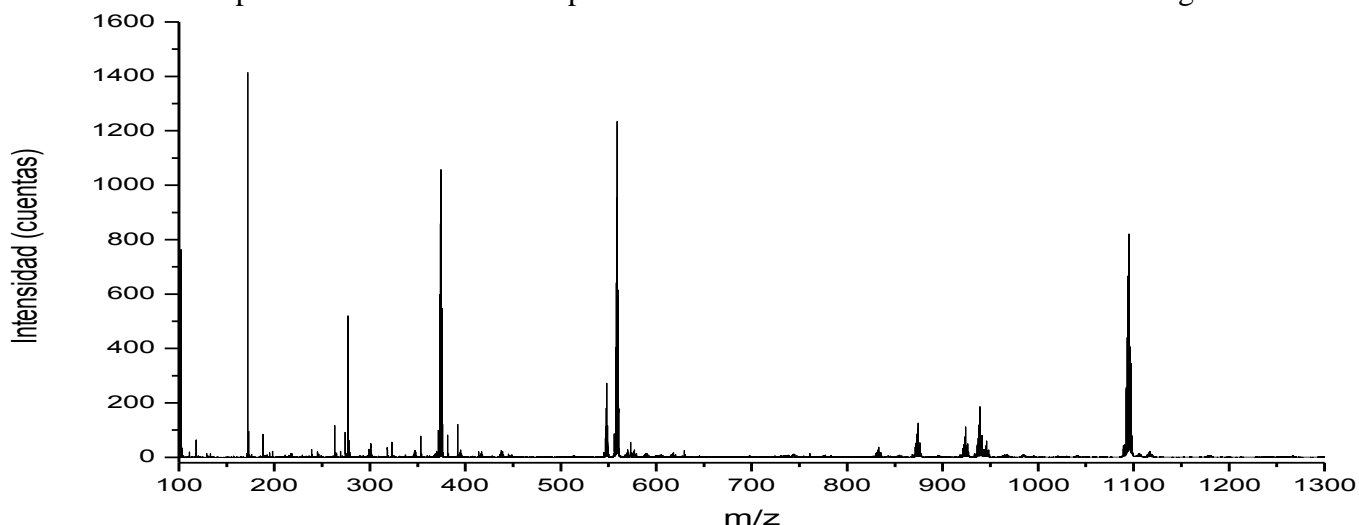
### 3.3 Identificación de los aductos formados por ESI-Q-TOF-MS

Para establecer la naturaleza de los aductos formados por reacción del complejo ASR3 con dGMP y con el oligo 5'-TCCTGTCC-3' se procedió a su análisis mediante ESI-Q-TOF. Para ello, la muestra se introdujo en el sistema (ESI-Q-TOF modelo QStar<sup>®</sup> XL) equipado con una fuente de ionización de tipo micro, mediante una bomba de jeringa a un flujo de entre 3 y 7  $\mu\text{L}/\text{min}$ . Los análisis se realizaron en modo positivo.

En el caso del aducto con dGMP, el resultado de la incubación (disolución acuosa) se diluyó 1:1 en 50% de MeOH con 0.1% de ácido fórmico. Para el análisis de los aductos con el oligo, está claro que el trabajo en modo positivo no es el más adecuado, ya que existe un gran número de cargas negativas en el aducto (cada nucleótido del oligo aporta una carga negativa de su grupo fosfato), por lo que para favorecer la formación de iones positivos en la fuente de ESI se recurrió a añadir a la muestra una concentración de acetato amónico 10 mM en 20% Metanol.<sup>42</sup> En estas condiciones, se favorece la formación de iones positivos, al formarse aductos con los iones  $\text{NH}_4^+$ .

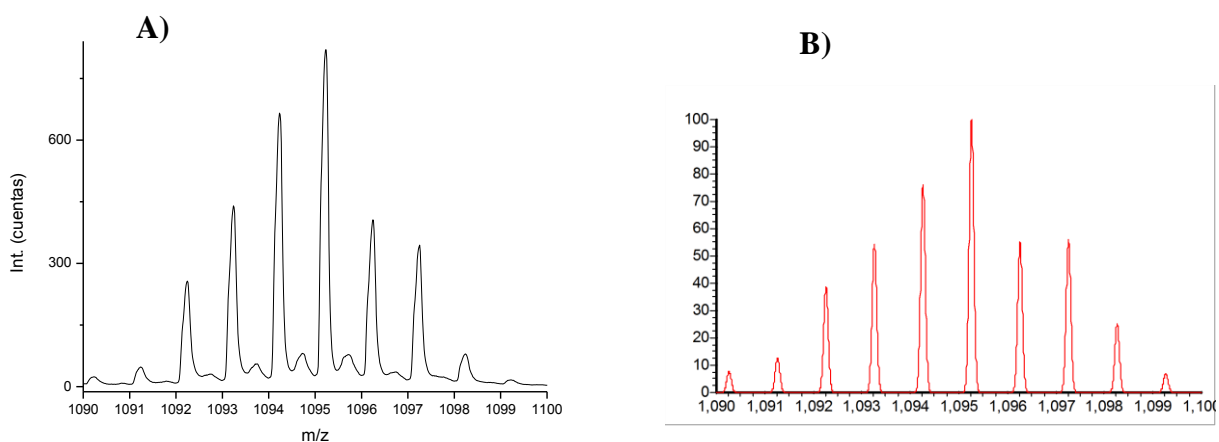
### Aductos ASR3-dGMP

El espectro de masas obtenido para el aducto ASR3-dGMP se muestra en la Figura 23.



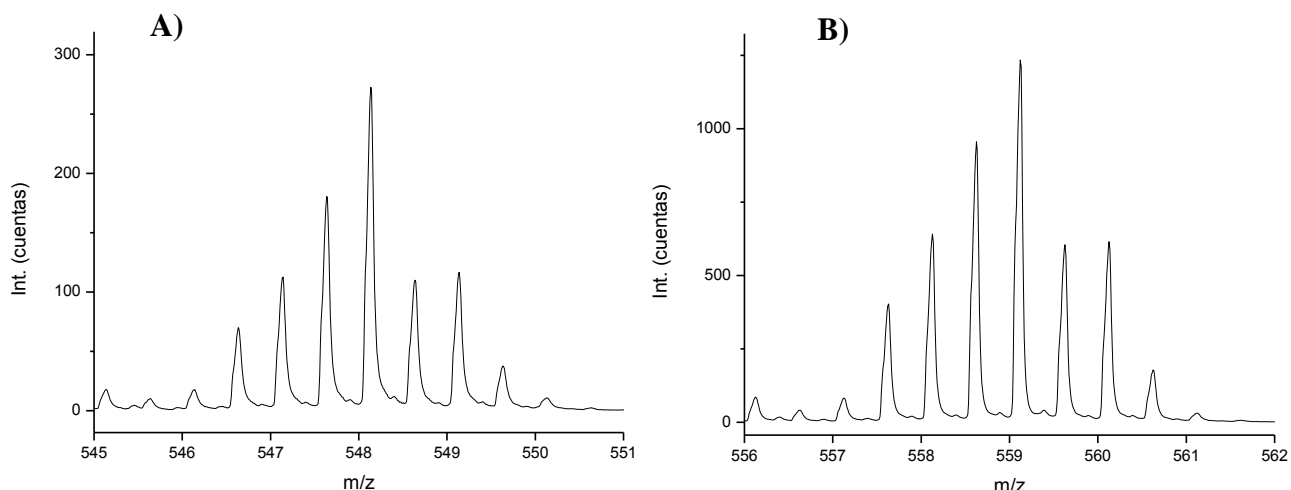
*Figura 23* Espectro de masas del producto de la incubación de ASR3 con dGMP

Como se puede ver en la Figura 23, aparece un ión monocargado a  $m/z$  1095.2, cuya masa correspondería al ión molecular del aducto 1:1 de dGMP con ASR3, que habría perdido al formar el aducto el contraión  $\text{OTf}^-$  y el ligando  $\text{Cl}^-$ , posición que utilizaría para la unión a dGMP, posiblemente a través del N7 de la guanina (masa molecular de ASR3 933.09 Da; masa molecular dGMP 347.22 Da; masa molecular de ASR3 sin  $\text{OTf}^-$  ni  $\text{Cl}^-$  748.59; masa molecular esperada del aducto: 1095.8 Da). Además, el ión a  $m/z$  1095.2 presenta un perfil isotópico dado por el rutenio que coincide con el obtenido de forma teórica, como muestra la Figura 24.



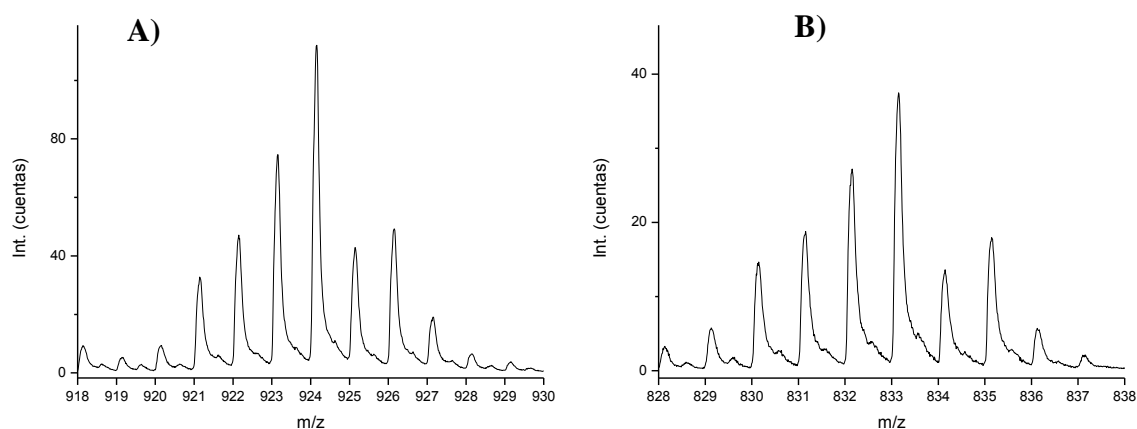
*Figura 24.* (A) Ión a  $m/z$  1095.2; (B) Espectro calculado a esa masa

En la Figura 23 también se observa a  $m/z$  548.1 el ión molecular doblemente cargado del aducto ASR3-dGMP anteriormente descrito y otro ión doble cargado a  $m/z$  559.1 que correspondería a su aducto con sodio. Ambos picos exhiben el perfil isotópico de rutenio característico, como se observa mejor en los espectros de masas ampliados de la Figura 25.



**Figura 25.** Zonas del espectro ampliadas. Asignadas a (A) doble cargado del aducto; (B) doble cargado del aducto con un catión  $\text{Na}^+$

Además, en el espectro de masas de la Figura 23 aparecen también iones con menor intensidad a  $m/z$  923.8 (Figura 26A) y  $m/z$  833.8 (Figura 26B) que podrían corresponder a aductos en los que el complejo de rutenio ha perdido al formar el aducto el ligando 1- $\text{CH}_3$ -PTA (Figura 26A), o el  $-\text{PPh}_3$  (Figura 26B).



**Figura 26.** Zonas del espectro ampliadas. Asignadas a (A) aducto que ha perdido el ligando 1- $\text{CH}_3$ -PTA y (B) aducto que ha perdido el ligando  $\text{PPh}_3$

En la Tabla VII se recogen todos los iones correspondientes al espectro de masas del ASR3-dGMP que se han podido identificar a partir del espectro de masas de la Figura 23.

**Tabla VII:** Iones identificados en el espectro ESI-Q-TOF-MS del aducto ASR3-dGMP

m/z	z	m/z esperado	Especie	Ligandos perdidos
1095.2	+1	1095.8	[Ru{κ <sup>3</sup> (N,N,N)-Tp}(PPh <sub>3</sub> )(1-CH <sub>3</sub> -PTA)(dGMP)] <sup>+</sup>	Cl
924.1	+1	923.8	[Ru{κ <sup>3</sup> (N,N,N)-Tp}(PPh <sub>3</sub> )(dGMP)] <sup>+</sup>	Cl, 1-CH <sub>3</sub> -PTA
833.2	+1	833.8	[Ru{κ <sup>3</sup> (N,N,N)-Tp}(1-CH <sub>3</sub> -PTA)(dGMP)] <sup>+</sup>	Cl, PPh <sub>3</sub>
559.1	+2	559.4	{[Ru{κ <sup>3</sup> (N,N,N)-Tp}(PPh <sub>3</sub> )(1-CH <sub>3</sub> -PTA)(dGMP)]+Na} <sup>2+</sup>	Cl
548.1	+2	548.4	{[Ru{κ <sup>3</sup> (N,N,N)-Tp}(PPh <sub>3</sub> )(1-CH <sub>3</sub> -PTA)(dGMP)]+H} <sup>2+</sup>	Cl
374.6	+2	374.3	[Ru{κ <sup>3</sup> (N,N,N)-Tp}(PPh <sub>3</sub> )(1-CH <sub>3</sub> -PTA)] <sup>2+</sup>	Cl

### Aductos ASR3-oligonucleótido

La Figura 27 muestra el espectro de masas obtenido para la incubación de ASR3 con el oligo 5'-TCCTGTCC-3':

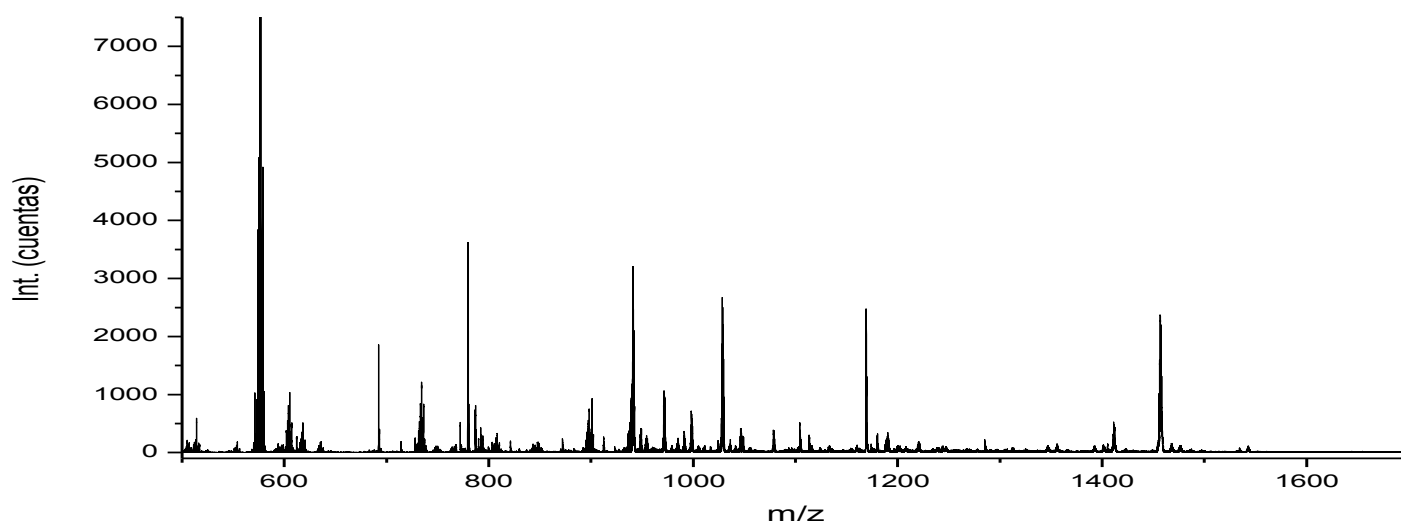
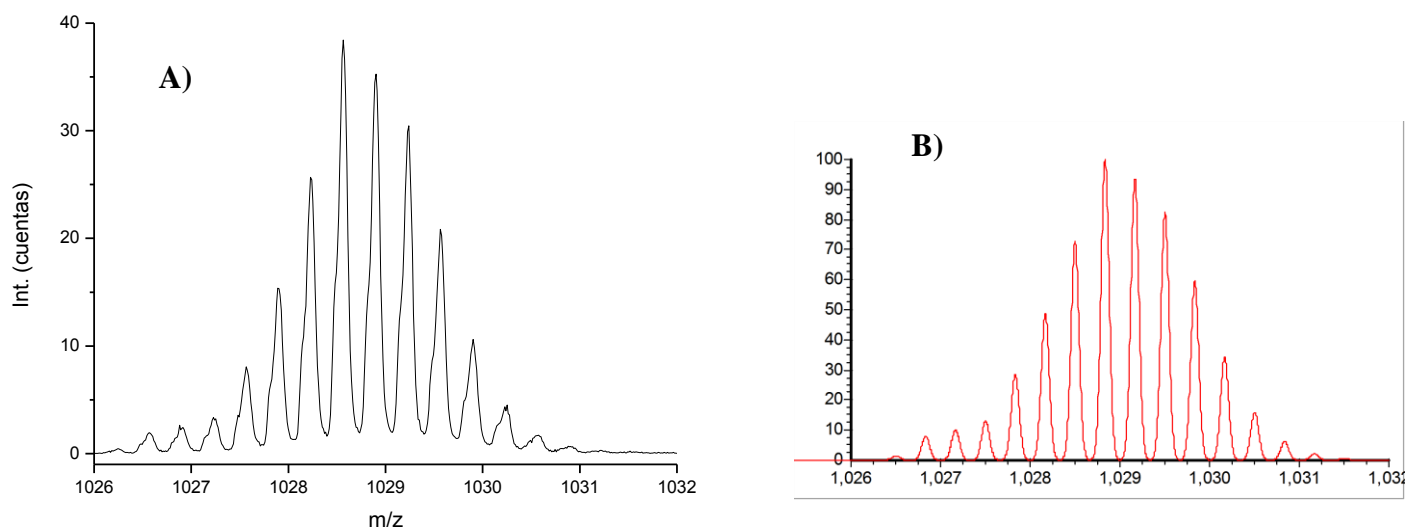


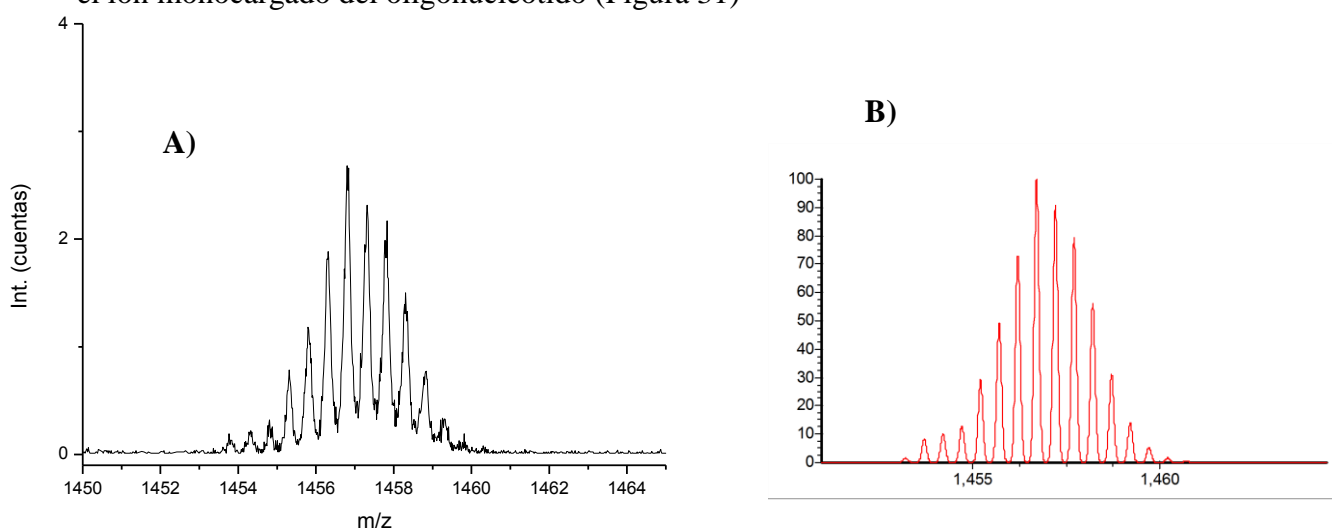
Figura 27. Espectro de masas del producto de la incubación de ASR3 con el oligo 5'-TCCTGTCC-3'

En el espectro de masas de la Figura 27 se puede observar un ión con  $m/z$  1028.6 triplemente cargado, que se puede asignar al ión molecular del aducto 1:1 formado entre el oligo y e ASR3 cuando el ASR3 pierde su contraión  $OTf^-$  y el ligando  $Cl^-$ , posición que utilizaría para la unión, posiblemente, al N7 de la guanina del oligo. Además, este ión presenta el perfil isotópico teórico como el que se muestra en la Figura 28.



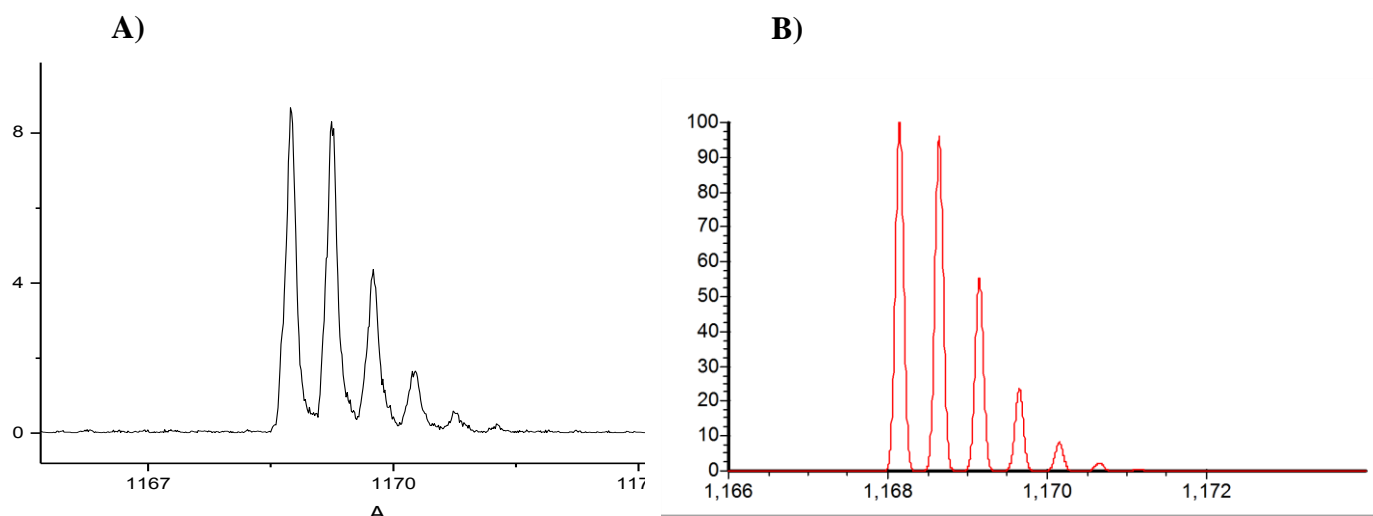
**Figura 28.** Ampliación del ión a  $m/z$  1028.6 donde se observa el patrón isotópico (A) y su patrón isotópico calculado mediante el programa informático IsoPro (B)

En el espectro de masas de la Figura 27 se han podido identificar, además, otros iones como el que se muestra ampliado en la Figura 29, en el que el complejo ASR3 ha perdido, también, el ligando 1- $CH_3$ -PTA al formar el aducto con el oligo e, incluso, gracias a las condiciones utilizadas para la estabilización de los iones positivos, se ha podido identificar el ión monocargado del oligonucleótido (Figura 31)



**Figura 29.** Ampliación del ión a  $m/z$  1456.8 donde se observa el patrón isotópico (A) y su patrón isotópico calculado mediante el programa informático IsoPro (B)

Incluso, gracias a las condiciones utilizadas para la estabilización de los iones positivos, se ha podido identificar el ión monocargado del oligonucleótido (Figura 30)



**Figura 30.** Ampliación del ión a  $m/z$  1168.7 donde se observa el patrón isotópico (A) y su patrón isotópico calculado mediante el programa informático IsoPro (B)

En el espectro de la Figura 27 aparecen, también, otros iones con menor intensidad, cuya naturaleza se recoge en la Tabla VIII:

**Tabla VIII.** Iones identificados en el espectro ESI-Q-TOF-MS del producto de incubación del oligo con ASR3

<b>m/z</b>	<b>z</b>	<b>Especie</b>	<b>Ligandos perdidos</b>
1542.3	2	$[\text{RuCl}\{\kappa^3(\text{N,N,N})\text{-Tp}\}(\text{PPh}_3)(1\text{-CH}_3\text{-PTA})(\text{Oligo})]^{2+}$	$\text{OTf}^-$ , $\text{Cl}^-$
1028.6	3	$[\text{RuCl}\{\kappa^3(\text{N,N,N})\text{-Tp}\}(\text{PPh}_3)(1\text{-CH}_3\text{-PTA})(\text{Oligo})]^{3+}$	$\text{OTf}^-$ , $\text{Cl}^-$
1456.8	2	$[\text{RuCl}\{\kappa^3(\text{N,N,N})\text{-Tp}\}(\text{PPh}_3)(\text{Oligo})]^{2+}$	$\text{OTf}^-$ , $\text{Cl}^-$ , 1- $\text{CH}_3\text{-PTA}$
971.5	3	$[\text{RuCl}\{\kappa^3(\text{N,N,N})\text{-Tp}\}(\text{PPh}_3)(\text{Oligo})]^{3+}$	$\text{OTf}^-$ , $\text{Cl}^-$ , 1- $\text{CH}_3\text{-PTA}$
1411.3	2	$[\text{RuCl}\{\kappa^3(\text{N,N,N})\text{-Tp}\}(1\text{-CH}_3\text{-PTA})(\text{Oligo})]^{2+}$	$\text{OTf}^-$ , $\text{Cl}^-$ , $\text{PPh}_3$
941.2	3	$[\text{RuCl}\{\kappa^3(\text{N,N,N})\text{-Tp}\}(1\text{-CH}_3\text{-PTA})(\text{Oligo})]^{3+}$	$\text{OTf}^-$ , $\text{Cl}^-$ , $\text{PPh}_3$
1168.7	2	$[\text{Oligo}]^{2+}$	$\text{RuCl}\{\kappa^3(\text{N,N,N})\text{-Tp}\}(\text{PPh}_3)(1\text{-CH}_3\text{-PTA})$
779.5	3	$[\text{Oligo}]^{3+}$	
577.1	1	$[\text{RuCl}\{\kappa^3(\text{N,N,N})\text{-Tp}\}(\text{PPh}_3)]^+$	$\text{OTf}^-$ , $\text{Cl}^-$ , 1- $\text{CH}_3\text{-PTA}$

## **4. Conclusiones**

---

## 4. Conclusiones

Como resultado de los estudios realizados a lo largo del presente Trabajo de Fin de Máster, se pueden extraer las siguientes conclusiones:

- 1) Se han desarrollado metodologías de HPLC-VIS/UV y de  $\mu$ HPLC-ICP-MS que permiten la separación y detección de los aductos formados al interaccionar los complejos de rutenio ASR3, ASR7 y ASR12 con los nucleótidos del ADN
- 2) Se ha demostrado que dichos complejos interaccionan únicamente con el nucleótido desoxiguanosina monofosfato y que el complejo ASR3 es el más reactivo de todos.
- 3) Se ha llevado a cabo la caracterización de los aductos formados por la interacción del complejo ASR3 y el nucleótido dGMP mediante ESI-Q-TOF-MS, estableciéndose que se forman diferentes aductos, todos ellos de estequiometría 1:1, en los cuales el complejo pierde su ligando  $\text{Cl}^-$  para unirse al nucleótido, pudiendo, además, perder otros ligandos.
- 4) Se han estudiado los aductos formados por la interacción del complejo ASR3 con el oligonucleótido de cadena sencilla 5'-TCCTGTCC-3' mediante HPLC-VIS/UV. Los aductos formados se han caracterizado mediante ESI-Q-TOF-MS, estableciéndose que se forman varios tipos de aductos de estequiometría 1:1 que se diferencian en función del número de ligandos que pierde el complejo de rutenio al unirse al oligo.



## **5. Bibliografía**

---

### 5. Bibliografía

<sup>1</sup> R.A. Willis. The Spread of Tumors in the Human Body. Butterworth & Company Medical Publications, Canada (1952)

<sup>2</sup> T. Reya, S.J. Morrison, M.F. Clarke. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*, 2001, 414, 105

<sup>3</sup> Organización Mundial de la Salud (OMS) . Nota descriptiva N°297 (Febrero de 2013). Accesible Online en <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/index.html>> [Consultado 5/6/2013]

<sup>4</sup> S.N. Gardner, A mechanistic, predictive model of dose-response curves for cell cycle phase-specific and -nonspecific drugs. *Cancer Research*, 2000, 60, 1417

<sup>5</sup> C.H. Takimoto, E. Calvo. Principles of Oncology Pharmacotherapy. In Cancer Management: A Multidisciplinary Approach. 11th Ed. Padzur R., Wagman L.D., Kamphausen K.A., Hoskins W.J., The Oncology Group, 2008, pp 23-42

<sup>6</sup> N.J. Wheate, S. Walker, G.E. Craig, R. Oun, The status of platinum anticancer drugs in the clinic and in clinical trials, *Dalton Trans.*, 2010, 39, 8113

<sup>7</sup> B. Rosenberg, L. Van Camp, T. Krigas, Inhibition of cell division in *Escherichia coli* by electrolysis products from a platinum electrode, *Nature*, 1965, 205, 698

<sup>8</sup> Approval summary for cisplatin for metastatic ovarian tumors. *FDA Oncology Tools, Center for Drug Evaluation and Research* (1978) 12

<sup>9</sup> C. N. Lloyd, H. W. Morgan, B. K. Nicholson, R. S. Ronimus, The composition of Ehrlich's Salvarsan: Resolution of a Century-Old Debate. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 2005, 44, 941.

<sup>10</sup> S.C. Sweetman, Martindale: The Complete Drug Reference (36th Edition). *Pharmaceutical Press London*. (2009)

<sup>11</sup> S.E. Miller, D.A. House, The hydrolysis products of *cis*-dichlorodiammineplatinum(II). 2. The kinetics of formation and anation of the *cis*-diamminedi(aqua)platinum(II) cation. *Inorganica Chimica Acta*, 1989, 166, 189

<sup>12</sup> J. Reedijk, Why does cisplatin reach guanine-N<sub>7</sub> with competing S-donor ligands available in the cell?, *Chemical Reviews*, 1999, 99, 2499

<sup>13</sup> J. Reedijk, New clues for platinum antitumor chemistry: kinetically controlled metal binding to DNA, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2003, 100, 3611

<sup>14</sup> A.M. Pizarro, P.J. Sadler, Unusual binding modes for metal anticancer complexes, *Biochimie*, 2009, 91, 1198

<sup>15</sup> E.R. Jamieson, S.J. Lippard, Structure, recognition and processing of cisplatin-DNA adducts, *Chemical Reviews*, 1999, 99, 2467

- <sup>16</sup> M. Kartalou, J.M. Essigmann, Mechanisms of resistance to cisplatin. *Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of mutagenesis*, 2001, 478, 23
- <sup>17</sup> D.D. Vonhoff, R. Schilsky, C.M. Reichert, Toxic effects of cis-dichlorodiammineplatinum(II) in man, *Cancer Treatment Reports*, 1979, 63, 1527
- <sup>18</sup> R.J. Parker, A. Eastman, F. Bostick-Bruton, E. Reed, Acquired cisplatin resistance in human ovarian cancer cells is associated with enhanced repair of cisplatin-DNA lesions and reduced drug accumulation, *Journal of Clinical Investigation*, 1991, 87, 772
- <sup>19</sup> D. Wang, S.J. Lippard, Cellular processing of platinum anticancer drugs, *Nature reviews drug discovery*, (2005), 14, 1033
- <sup>20</sup> L.J. Anghileri et.al., The in vivo inhibition of tumor growth by ruthenium red: its relationship with the metabolism of calcium in the tumor, *Cancer Res. Clin. Oncol.*, 1975, 83, 213
- <sup>21</sup> G. Sava, S. Zorzet, T. Giraldi, G. Mestroni, G. Zassinovich, Antineoplastic activity and toxicity of an organometallic complex of ruthenium(II) in comparison with cis-PDD in mice bearing solid malignant neoplasms, *European Journal of Cancer and Clinical Oncology*, 1977, 20, 841
- <sup>22</sup> S. E. Antonarakis, A. Emadi, Ruthenium-based chemotherapeutics: are they ready for prime time?, *Cancer Chemother Pharmacol*, 2010, 66, 1
- <sup>23</sup> J. Reedijk, New clues for platinum antitumor chemistry: kinetically controlled metal binding to DNA, *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100, 3611
- <sup>24</sup> P. Schluga, C.G. Hartinger, A. Egger, E. Reisner, M. Galanski, Redox behavior of tumor-inhibiting ruthenium(III) complexes and effects of physiological reductants on their binding to GMP, *Dalton Trans*, 2006, 14, 1796
- <sup>25</sup> F. Kratz, L. Messori, Spectral characterization of ruthenium(III) transferrin, *J Inorg Biochem*, 1993, 49, 79
- <sup>26</sup> G. Sava, A. Bergamo, Ruthenium-based compounds and tumour growth control (review), *Int J Oncol*, 2000, 17, 353
- <sup>27</sup> M. Groessl, Y.O. Tsybin, Ruthenium versus platinum: interactions of anticancer metallodrugs with duplex oligonucleotides characterized by electrospray ionization mass spectrometry, *J Biol Inorg Chem*, 2010, 15, 677
- <sup>28</sup> S.H. van Rijt, P.J. Sadler, Current applications and future potential for bioinorganic chemistry in the development of anticancer drugs, *Drug Discovery Today*, 2009, 14, 1089
- <sup>29</sup> H. Chen, J.A. Parkinson, S. Parsons, R.A. Coxall, R.O. Gould, P.J. Sadler, Organometallic Ruthenium(II) diamine anticancer complexes: arene-nucleobase stacking and stereospecific hydrogen-bonding in guanine adducts, *J. Am. Chem. Soc.*, 2002, 124, 3064

- <sup>30</sup> A. Bergamo, C. Gaiddon, J.H.M. Schellens, J.H. Beijnen, G. Sava, Approaching tumour therapy beyond platinum drugs. Status of the art and perspectives of ruthenium drug candidates, *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2012, 106, 90
- <sup>31</sup> M. Galanski, V.B. Arion, M.A. Jakupec, B.K. Keppler, Recent developments in the field of tumor-inhibiting metal complexes, *Curr. Pharm. Des.*, 2003, 9, 2078
- <sup>32</sup> C.G. Hartinger, S. Zorbas-Seifried, M.A. Jakupec, B. Kynast, H. Zorbas, B. K. Keppler, From bench to bedside – preclinical and early clinical development of the anticancer agent indazolium *trans*-[tetrachlorobis(1*H*-indazole)ruthenate(III)] (KP1019 or FFC14A), *J. Inorg. Biochem.*, 2006, 100, 891
- <sup>33</sup> H. Chem, J.A. Parkinson, R.E. Morris, P.J. Sadler, Highly selective binding of organometallic ruthenium ethylenediamine complexes to nucleic acids: novel recognition mechanisms, *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, 125, 173
- <sup>34</sup> A. Renfrew, Ruthenium(II) arene compounds as versatile anticancer agents, *Chimia*, 2009, 63 (4), 217
- <sup>35</sup> C.A. Vock, A. Renfrew, R. Scopelliti, L. Juillerat-Jeanneret, P.J. Dyson, Influence of the Diketonato Ligand on the Cytotoxicities of  $[\text{Ru}(\eta^6\text{-p-cymene})(\text{R}_2\text{acac})(\text{PTA})]^+$  Complexes, *Eur. J. Inorg. Chem.*, 2008, 1661
- <sup>36</sup> C. Scolaro, A. Bergamo, L. Berscacin, R. Delfino, M. Cocchietto, G. Laurency, T.J. Geldbach, G. Sava, P.J. Dyson, In vitro and in vivo evaluation of Ruthenium(II)-arene PTA complexes, *J. Med. Chem.*, 2005, 48, 4161
- <sup>37</sup> C. Scolaro, A.B. Chaplin, C.G. Hartinger, A. Bergamo, M. Cocchietto, B.K. Keppler, G. Sava, P.J. Dyson, Tuning the hydrophobicity of ruthenium(II)-arene (RAPTA) drugs to modify uptake, biomolecular interactions and efficacy, *Dalton Trans.*, 2007, 5065
- <sup>38</sup> A. Habtemariam, M. Melchart, R. Fernández, S. Parsons, I.D.H. Oswald, A. Parkin, F.P.A. Fabbiani, J.E. Davidson, A. Dawson, R.E. Aird, D.I. Jodrell, P.J. Sadler, Structure-activity relationships for cytotoxic ruthenium(II) arene complexes containing N,N-, N,O-, and O,O-chelating ligands, *J. Med. Chem.*, 2006, 49, 6858
- <sup>39</sup> A.K. Renfrew, A.D. Phillips, A.E. Egger, C.G. Hartinger, S.S. Bosquain, A.A. Nazarov, B.K. Keppler, L. Gonsalvi, M. Peruzzini, P.J. Dyson, Influence of structural variation on the anticancer activity of RAPTA-type complexes: ptn versus pta, *Organometallics*, 2009, 28, 1165
- <sup>40</sup> A. García-Fernández, J. Díez, Á. Manteca, J. Sánchez, R. García-Navas, B.G. Sierra, F. Mollinedo, M.P. Gamasa, E. Lastra, Antitumor activity of new hydridotris(pyrazolyl)borate ruthenium(II) complexes containing the phosphanes PTA and 1-CH<sub>3</sub>-PTA, *Dalton Trans.*, 2010, 39, 10186
- <sup>41</sup> A. García-Fernández, J. Díez, Á. Manteca, J. Sánchez, M.P. Gamasa, E. Lastra, Novel hydridotris(pyrazolyl)borate ruthenium (II) complexes containing the water-soluble phosphane 1,3,5-triaza-7-phosphaadamantane: Synthesis and evaluation of DNA binding properties, *Polyhedron*, 2008, 27, 1214

<sup>42</sup> K.A. Sannes-Lowery, D.P. Mack, P. Hu, H.Y. Mei, J.A. Loo, Positive ion electrospray ionization mass spectrometry of oligonucleotides, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 1997, 8, 90