



TESIS DOCTORAL

**PAPEL MODULADOR DE LA MELATONINA EN LA
ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA DE COMPUESTOS
DE COORDINACIÓN DERIVADOS DEL CISPLATINO EN
LÍNEAS CELULARES TUMORALES**

Samuel Estirado Rivera

**Biología Celular y Molecular, Biomedicina y
Biotecnología**

Conformidad de los directores:

José Antonio Pariente Llanos

Javier Espino Palma

Francisco Luna Giles

Esta tesis cuenta con la autorización del director y codirectores de la misma y de la Comisión Académica del programa. Dichas autorizaciones constan en el Servicio de la Escuela Internacional de Doctorado de la Universidad de Extremadura.

2024



UNIVERSIDAD DE EXTREMADURA

FACULTAD DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA

JOSE ANTONIO PARIENTE LLANOS, Catedrático del Departamento de Fisiología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Extremadura, JAVIER ESPINO PALMA, Profesor Contratado Doctor del Departamento de Fisiología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Extremadura, y FRANCISCO LUNA GILES, Profesor Titular del Departamento de Química Orgánica e Inorgánica de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Extremadura,

INFORMAN:

Que la presente Tesis Doctoral, presentada por D. Samuel Estirado Rivera, con el título: **PAPEL MODULADOR DE LA MELATONINA EN LA ACTIVIDAD ANTICANCERÍGENA DE COMPUESTOS DE COORDINACIÓN DERIVADOS DEL CISPLATINO EN LÍNEAS CELULARES TUMORALES**, ha sido realizada bajo nuestra dirección en el Departamento de Fisiología y en el Departamento de Química Orgánica e Inorgánica de la Universidad de Extremadura, entendiendo que se encuentra finalizada y que reúne los requisitos de originalidad, autorizan su presentación para ser juzgada ante el tribunal correspondiente.

Y para que conste a los efectos oportunos, firman la presente conjuntamente en Badajoz, a 12 de abril de 2024.

José Antonio Pariente Llanos

Javier Espino Palma

Francisco Luna Giles

La realización de esta Tesis Doctoral se ha llevado a cabo gracias al apoyo económico de las siguientes entidades:

- Proyectos de Investigación en los Centros Públicos de I+D+i de la Comunidad Autónoma de Extremadura (IB18013)
- Ayudas para la realización de actividades de investigación y desarrollo tecnológico, de divulgación y transferencia de conocimiento por los Grupos de Investigación de Extremadura (GR18040, GR18062, GR21042, GR21075).

JUNTA DE EXTREMADURA

Consejería de Economía, Ciencia y Agenda Digital



UNIÓN EUROPEA

Fondo Europeo de Desarrollo Regional

Una manera de hacer Europa

Producción científica resultante de esta Tesis Doctoral:

1. *Artículos científicos*

Samuel Estirado, Elena Fernández-Delgado, Emilio Viñuelas-Zahínos, Francisco Luna-Giles, Ana B. Rodríguez, José A. Pariente, Javier Espino. Pro-Apoptotic and Anti-Migration Properties of a Thiazoline-Containing Platinum(II) Complex in MDA-MB-231 Breast Cancer Cells: The Role of Melatonin as a Synergistic Agent. *Antioxidants*. 2022, 11, 1971.

Samuel Estirado, Diana Díaz-García, Elena Fernández-Delgado, Emilio Viñuelas-Zahínos, Santiago Gómez-Ruiz, Sanjiv Prashar, Ana B. Rodríguez, Francisco Luna-Giles, José A. Pariente, Javier Espino. Melatonin derivative-conjugated formulations of Pd(II) and Pt(II) thiazoline complexes onto mesoporous silica to enhance the cytotoxicity and apoptosis against HeLa cells. *Pharmaceutics*. 2024, 16(1), 92.

2. *Comunicaciones en congresos*

2.1 *Orales*

Samuel Estirado, Elena Fernández-Delgado, Emilio Viñuelas-Zahínos, Santiago Gómez-Ruiz, Diana Díaz-García, Francisco Luna-Giles, José A Pariente, Javier Espino. Melatonin-conjugated formulations of metallodrug-functionalized mesoporous silica drug delivery systems produce cytotoxicity and apoptosis in HeLa cells. *XL Congreso de la Sociedad Española de Ciencias Fisiológicas (SECF)*. 19- 22 septiembre de 2022, Badajoz.

Samuel Estirado Rivera, Elena Fernández Delgado, Emilio Viñuelas-Zahínos, Francisco Luna Giles, Ana Beatriz Rodríguez José Antonio Pariente, Javier Espino Palma. Pro-apoptotic and anti-migration properties of a thiazoline-containing platinum(II) complex in MDA-MB-231 breast cancer cells: role of melatonin as synergistic agent. *The 8th Internacional Electronic Conference on Medicinal Chemistry*. 01-30 noviembre 2022. Online.

2.2 Poster

Samuel Estirado Rivera, Elena Fernández Delgado, Emilio Viñuelas-Zahínos, Francisco Luna Giles, Ana Beatriz Rodríguez José Antonio Pariente, Javier Espino Palma. Pro-apoptotic and anti-migration properties of a thiazoline-containing Pt(II) complex in triple-negative breast cancer cells: role of melatonin as synergistic agent. *43rd Annual Meeting of the Spanish Society of Biochemistry & Molecular Biology*. 19-22 Julio (2021). Online.

En el viaje del conocimiento cada nueva experiencia es un faro que ilumina el camino hacia horizontes inexplorados, aprendizajes enriquecedores y oportunidades que dan forma a nuestro crecimiento personal y profesional. Un viaje que inicio con la travesía de un navegante que se adentró en aguas desconocidas, de incertidumbre y desasosiego que consiguió ver tierra. En este periplo de cuatro años de largo trabajo, quisiera expresar mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas que han intervenido tanto de manera directa como indirecta en la presente Tesis Doctoral.

En primer lugar, agradecer a mis tres directores, el Dr. José Antonio Pariente Llanos, Dr. Javier Espino Palma y Dr. Francisco Luna Giles por el apoyo, la paciencia y dedicación que han mostrado en todos y cada uno de los momentos de esta etapa formativa. No tengo palabras para agradeceros toda vuestra implicación. Vuestra sabiduría y consejos han sido fundamentales para mi desarrollo académico. Una mención especial al Dr. Javier Espino Palma, has sido como hermano científico que me ha adentrado en el mundo de la investigación y me inculcado tantos valores en tan poco tiempo. Gracias hacerme ver siempre el lado positivo de las cosas.

A la Dr. Ana Beatriz Rodríguez Moratinos por su incondicional ayuda, dedicación y estar siempre pendiente de todo. Has sido mi madre científica.

A el Dr. Emilio Viñuelas Zahínos por su disposición a compartirme sus conocimientos del maravilloso mundo de la cristalización y a la Dr. María Garrido por sus sabios consejos y divertidas andaduras en la divulgación científica.

A Elena Circujano por tener todo listo cuando llegamos al departamento y preocuparse por facilitarnos el día a día. A mis compañeros de laboratorio, Elena, Patricia, Marta, Esther y Sergio por su colaboración, compañerismo y trabajo en equipo que han hecho que esta Tesis sea una experiencia gratificante y enriquecedora.

Al servicio de apoyo a la Investigación de la UEx (SAIUEx) y en especial a Alberto Álvarez Barrientos y Esther María Pérez Rosa por sus medidas biológicas y químicas.

A todos y cada uno de los miembros del grupo de investigación “Química de la Coordinación” del área de Química Inorgánica y “Neuroinmunofisiología y Crononutrición” del área de Fisiología de la Facultad de Ciencias de la UEx, grandes

grupos científicos tanto en lo humano como en lo profesional. Ha sido un auténtico placer compartir con vosotros estos años de trabajo y buenos ratos.

Al grupo de investigación “COMET-NANO” del Departamento de Biología y Geología, Física y Química Inorgánica de la Universidad Rey Juan Carlos y en especial al Dr. Santiago Gómez Ruiz y Dr. Diana Díaz García por su colaboración en la síntesis y caracterización de nanopartículas.

A mis amigos, gracias por animarme y sacarme de la rutina en los momentos más difíciles. A Miri, por estar siempre ahí para escucharme, motivarme y brindarme apoyo emocional durante este arduo proceso.

Y finalmente, a mis padres y mis hermanos por su apoyo y sacrificio para que pudiera llegar hasta este momento. Gracias por inculcarnos lecciones de vida y trabajo para salir adelante. No hay ni dinero ni tiempo que pague los esfuerzos que habéis realizado para darnos la mejor formación y educación posible.

ABREVIATURAS

AFMK: N-acetil-N-formil-5-metoxi-quinurenamina

AIF: Factor inductor de la apoptosis

AMK: N-acetil-5-metoxi-quinurenamina

AMPc: Adenosín monofosfato cíclico

ATP: Adenosín trifosfato

Bcl-2: B-cell lymphoma 2

BET: Fisisorción de gases en sólidos

BP: Paso de banda

CAR-T: Receptor de antígeno quimérico T

CARD: Caspase Recruitment Domain

CisPt: Cisplatino

CMTN: Cáncer de mama triple negativo

CSD: Cambridge Structural Database

CTAB: Bromuro de hexadeciltrimetilamonio

DDS: Sistemas de liberación de fármacos

DCFH: 2',7'-Diclorodihidrofluoresceína diacetato

DED: Death Effector Domain

DISC: Complejo de señalización inductor de muerte

DMEM: medio de Eagle modificado por Dulbecco

DMF: Dimetilformamida

DMF-d₇: Dimetilformamida deuterada

DMSO: Dimetilsulfóxido

DPhPzTn: 2-(3,5-difenil-1-pirazolil)-2-tiazolina

DPhPzTz: 2-(3,5-difenil-1-pirazolil)-1,3-tiazina

DRX: Difracción de rayos X

EDAC: 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida

EGF: Factor de crecimiento epidérmico

ERCC1: Excision Repair Complementing defective in Chinese hamster 1

ERO: Especies reactivas de oxígeno

ERN: Especies reactivas de nitrógeno

FBS: Suero bovino fetal

FDA: Administración de Alimentos y Medicamentos

FITC: Isotiocianato de fluoresceína

FS-ADN: Ácido desoxirribonucleico de espermatozoos de pez

GMPC: Guanosín monofosfato cíclico

GSH: Glutatión reducido

¹H-RMN: Resonancia magnética nuclear

IAPs: Proteínas inhibidoras de la apoptosis

IC: Índice de combinación

ICP-AES: Espectrometría de emisión atómica de plasma acoplado por inducción

ICP-MS: Espectrometría de masas de plasma acoplado por inducción

IR: Infrarrojo

LMA: Leucemia mieloide aguda

MEB: Microscopia electrónica de barrido

MES: Ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico

MET: Microscopia electrónica de transmisión

MP: 3-mercaptopropiltriétoxilano

mPTP: Poro de permeabilidad transitoria de la membrana mitocondrial

MSNs: Nanopartículas mesoporosas de sílice

MTS: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfonil)-2H-tetrazolio

NAS: N-acetilserotonina

NER: Sistema de reparación por escisión de nucleótidos

NHS: N-hidroxisuccinimida

NP: Nanopartículas

PBS: Solución salina tamponada con fosfato

PCD: Muerte celular programada

Pd: Paladio

PdTdTn: Dicloro-2-(3,4-diclorofenil)imino-N-(2-tiazolin-2-il)tiazolidina-paladio(II)

PI: Yoduro de propidio

Pt: Platino

PtDPhPzTn: Dicloro-(2-(3,5-difenil-1-pirazolil)-2-tiazolina)-platino(II)

PtDPhPzTz: Dicloro-(2-(3,5-difenil-1-pirazolil)-1,3-tiazina)-platino(II)

PtPzTn: Dicloro-(2-(1-pirazolil)-2-tiazolina)-platino(II)

PtPzTz: Dicloro-(2-(1-pirazolil)-1,3-tiazolina)-platino(II)

PtTdTn: Dicloro-2-(3,4-diclorofenil)imino-N-(2-tiazolin-2-il)tiazolidina-platino(II)

PzTn: 2-(1-pirazolil)-2-tiazolina

PzTz: 2-(1-pirazolil)-1,3-tiazina

RPMI: Roswell Park Memorial Institute

SDBS: Spectral Database for Organic Compounds

SDS: Dodecil sulfato sódico

TEDTS: Sal trisódica del ácido triacético N-(3-trimetoxisililpropil)etilendiamina

TEOS: Ortosilicato de tetraetilo de sílice

TdTn: 2-(3,4-diclorofenil)imino-N-(2-tiazolin-2-il)tiazolidina

TG: Termogravimetría

TNF: Factor de necrosis tumoral

UV-Vis: Espectro ultravioleta visible

5MT: 5-metoxitriptamina

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Cáncer	3
1.1.1. Terapias contra el cáncer	5
1.2. Muerte celular	7
1.2.1. Muerte celular programada (PCD) o apoptosis	8
1.2.1.1. Caspasas	9
1.2.1.2. Proteínas de la familia Bcl-2	11
1.2.1.3. Vías de inducción de la apoptosis	13
1.2.1.4. Especies reactivas de oxígeno (ERO) en la apoptosis	14
1.3. Quimioterapia	16
1.3.1. Cisplatino (CisPt)	16
1.3.2. Derivados del CisPt	19
1.3.2.1. Derivados de $[\text{PtCl}_2(\text{N-N})]$ (N-N = ligandos bidentados)	21
1.3.2.2. Derivados de $[\text{PtCl}_2(\text{NH}_2\text{R})(\text{NH}_3)]$ (R = grupo alquilo o arilo)	24
1.3.3. Complejos de paladio(II) (Pd)	26
1.4. Nanotecnología	27
1.4.1. Nanomedicina	28
1.4.1.1. Nanopartículas mesoporosas de sílice (MSNs)	30
a) Sistemas de liberación de fármacos	31
b) MSN funcionalizadas con complejos de Pt(II) y Pd(II)	32
1.5. Melatonina	34
1.5.1. Estructura y síntesis	34
1.5.2. Mecanismo de acción	36
1.5.3. Otros índoles hormonales	38
1.5.4. Efecto coadyuvante de la melatonina en el cáncer	40
2. JUSTIFICACION Y OBJETIVOS	41
3. MATERIALES Y MÉTODOS	47
3.1. Lista de reactivos	49
3.1.1. Líneas celulares y medios de cultivo	49
3.1.2. Fluoróforos	50
3.1.3. Reactivos químicos de síntesis	50
3.1.4. Disolventes	51
3.1.5. Otros reactivos	51

3.2. Preparación y caracterización de complejos de Pt(II) y Pd(II).....	52
3.2.1. Síntesis del precursor cis-[PtCl ₂ (DMSO) ₂].....	52
3.2.2. Síntesis de ligandos.....	53
3.2.2.1. Síntesis de (2-(1-pirazolil)-1,3-tiazina) (PzTz) y 2-(1-pirazolil)-2-tiazolina) (PzTn).....	53
3.2.2.2. Síntesis de (2-(3,5-difenil-1-pirazolil)-1,3-tiazina) (DPhPzTz) y (2-(3,5-difenil-1-pirazolil)-2-tiazolina) (DPhPzTn).....	53
3.2.2.3. Síntesis de 2-(3,4-diclorofenil)imino-N-(2-tiazolin-2-il)tiazolidina (TdTn).....	54
3.2.3. Síntesis de complejos de Pt(II) y Pd(II).....	55
3.2.3.1. Síntesis de complejos [PtCl ₂ L] (L=PzTn, DPhPzTn, PzTz, DPhPzTz) (PtPzTn), (PtDPhPzTn), (PtPzTz) y (PtDPhPzTz).....	55
3.2.3.2. Síntesis de [PtCl ₂ (TdTn)] (PtTdTn) y [PdCl ₂ (TdTn)] (PdTdTn).....	55
3.2.3.3. Síntesis de cis-[PtCl ₂ (3,4-dicloroanilina)(NH ₃)].....	56
3.2.3.3.a Síntesis de cis-diamminadichloroplatino(II) (CisPt).....	56
3.2.3.3.b Síntesis de amminatrichloroplatinato(II) de potasio.....	57
3.2.3.3.c Síntesis de cis-amminacloro(3,4-dicloroanilina)yodoplatino(II).....	58
3.2.3.3.d Síntesis de cis-amminadichloro(3,4-dicloroanilina)platino(II).....	59
3.2.4. Caracterización de complejos de Pt(II).....	60
3.2.4.1. Difracción de rayos X de monocristal.....	60
3.2.4.2. Espectro de infrarrojo (IR).....	61
3.2.4.3. Espectro de resonancia magnética nuclear (RMN).....	61
3.3. Preparación y caracterización de nanopartículas mesoporosas de sílice (MSNs) 61	
3.3.1. Síntesis del material inicial de sílice mesoporosa.....	61
3.3.2. Funcionalización de las MSN con ligandos de silano.....	62
3.3.3. Incorporación del derivado de melatonina 5MT.....	62
3.3.4. Funcionalización de las MSNs con agentes quimioterapéuticos.....	63
3.3.5. Técnicas de caracterización de las MSNs.....	64
3.3.5.1. Patrón de difracción de rayos X (DRX).....	64
3.3.5.2. Espectro ultravioleta visible (UV-Vis).....	64
3.3.5.3. Termogravimetría (TG).....	65
3.3.5.4. Espectrometría de emisión atómica de plasma acoplado por inducción (ICP-AES).....	65
3.3.5.5. Fisisorción de gases en sólidos (BET).....	65
3.3.5.6. Microscopia electrónica de transmisión (MET).....	65
3.3.5.7. Microscopia electrónica de barrido (MEB).....	66

3.3.5.8. Estudio de estabilidad de los materiales finales: Análisis de liberación.	66
3.3.5.9. Estudio de la interacción de los materiales con el ADN.....	66
3.4. Ensayos biológicos	67
3.4.1. Cultivos celulares	67
3.4.2. Viabilidad celular	68
3.4.3. Determinación de células apoptóticas	69
3.4.4. Análisis de actividad caspasa	70
3.4.4.1. Actividad caspasa-3	71
3.4.4.2. Actividad caspasa-9	71
3.4.5. Medida de especies reactivas de oxígeno (ERO).....	71
3.4.6. Análisis del ciclo celular	72
3.4.7. Determinación de migración celular	72
3.4.7.1. Ensayo de cierre de herida.....	72
3.4.7.2. Ensayo de migración transwell.....	73
3.4.8. Captación y acumulación celular	73
3.4.9. Análisis estadístico.....	74
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	77
4.1. Efecto coadyuvante de la melatonina sobre la capacidad citotóxica de complejos de Pt(II) con ligandos bidentados derivados de heterociclos S,N y pirazol en la línea celular de cáncer de mama humano MDA-MB-231	81
4.2. Papel modulador del derivado de melatonina 5MT sobre la actividad citotóxica y pro-apoptótica de MSNs funcionalizadas con dos complejos de Pt(II) y Pd(II) con ligandos derivados de 2-tiazolina en la línea celular de cáncer de cuello uterino humano HeLa.....	95
4.3. Síntesis y caracterización estructural de un complejo derivado de CisPt con una amina primaria del tipo [PtCl ₂ (NH ₃)(NH ₂ R)]. Capacidad de la melatonina para potenciar la actividad citotóxica de este compuesto sobre las líneas celulares de cáncer de cuello uterino humano HeLa, cáncer de mama humano MDA-MB-231 y leucemia promielocítica humana HL-60.	113
5. CONCLUSIONES	133
6. BIBLIOGRAFÍA	137
7. ANEXOS	175

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Cáncer

El cáncer es una de las principales causas de muerte y un obstáculo importante para aumentar la esperanza de vida en todos los países del mundo. En términos generales, el cáncer se refiere a un conjunto de enfermedades caracterizadas por el crecimiento descontrolado y anormal de células en el cuerpo. Estas células cancerosas tienen la capacidad de dividirse y proliferar de manera desmedida, invadiendo tejidos circundantes y, en algunos casos, diseminándose a otras partes del organismo, en un proceso conocido como metástasis (Hanahan & Weinberg, 2011).

Existen más de 100 tipos de cáncer, cada uno con características específicas en función del crecimiento, comportamiento y tratamiento. Entre los cánceres más comunes se encuentran el cáncer de mama (11,7%), el de pulmón (11,4%) y el colorrectal (10%), con una tasa de mortalidad mayor en el cáncer de pulmón (18%) (Figura 1.1.). El cáncer de mama es el tumor más diagnosticado del mundo, siendo la quinta causa de mortalidad por cáncer (Figura 1.1.) (Sung et al., 2021). El cáncer de mama triple negativo (CMTN) es el tipo menos frecuente de cáncer de mama, representa el 15-20% de todos los casos, pero suele ser más agresivo y difícil de tratar debido a la falta de dianas moleculares eficaces, como el receptor de estrógenos, el receptor de progesterona y el receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2) (Garrido-Castro et al., 2019). Por otro lado, el cáncer de cuello uterino es el cuarto cáncer más frecuentemente diagnosticado y la cuarta causa principal de muerte por cáncer en mujeres (8%) (Sung et al., 2021). La mayoría de los cánceres forman tumores sólidos, pero los cánceres de la sangre, como la leucemia, generalmente no lo hacen. Entre las leucemias agudas, la leucemia mieloide aguda (LMA) es el tipo más común y causa una alta mortalidad (Short et al., 2018). Según la *American Cancer Society*, el número estimado de muertes en todo el mundo debido a la leucemia fue de 60.650 personas en 2022. En el caso de la LMA, aunque en la mayoría de los pacientes se consigue una remisión completa de la enfermedad, cabe destacar que muchos de ellos sufren una recaída por resistencia a la quimioterapia.

Asimismo, según estimaciones de GLOBOCAN 2020, se documentaron 19,3 millones de nuevos casos de cáncer, cifras que se esperan que aumenten aproximadamente un 47% (hasta los 28,4 millones de nuevos casos) para 2040 (Sung et al., 2021). Además, a pesar de los procedimientos de tratamiento como la cirugía, la

quimioterapia y la radioterapia, se registraron 9,9 millones de muertes en todo el mundo en 2020 (Figura 1.1.) (Sung et al., 2021). Por lo tanto, una estadística como esta enfatiza que el régimen de tratamiento en la actualidad puede no ser lo suficientemente eficaz y preciso para manejar todos los casos de cáncer.

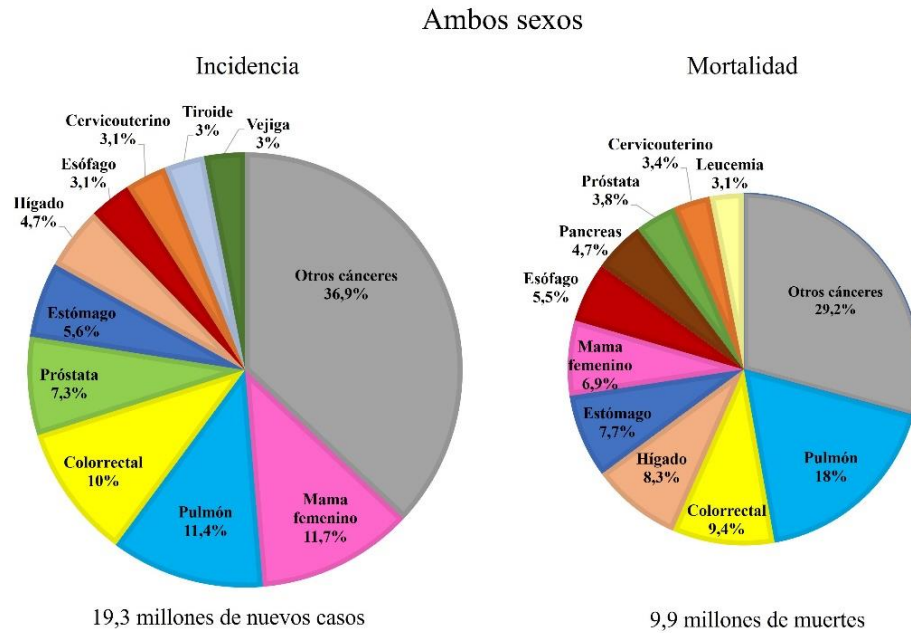


Figura 1.1. Incidencia y mortalidad de cáncer en ambos sexos en 2020 (Sung et al., 2021).

El desarrollo del cáncer es un proceso de varios pasos, donde se produce una proliferación continua que conduce a una transformación progresiva de células normales a malignas. Además, este tipo de células intentan evadir los genes supresores de tumores, son resistentes a la muerte celular, favorecen una inmortalidad replicativa, inducen la angiogénesis, y activan la invasión y metástasis (Figura 1.2.) (Hanahan & Weinberg, 2011). Todo este tipo de características vienen dadas por alteraciones genéticas moleculares que pueden ser originadas por factores extrínsecos, activación de protooncogenes o la formación de proteínas de fusión oncogénicas. La inflamación también se relaciona con el cáncer a través de factores intrínsecos que involucran factores inmunes y microambiente tumoral. Además, la pérdida de control sobre tipos únicos o mixtos de muerte celular puede desencadenar el cáncer (Tang et al., 2019). Esta desregulación de la maquinaria de muerte celular es responsable no sólo del desarrollo y la progresión del tumor sino también de la resistencia del tumor a las terapias (Pistritto et al., 2016). Por eso, es importante conocer los distintos tipos de muerte celular y terapias

1. Introducción

contra el cáncer para comprender mejor esta enfermedad y buscar tratamientos más eficaces.

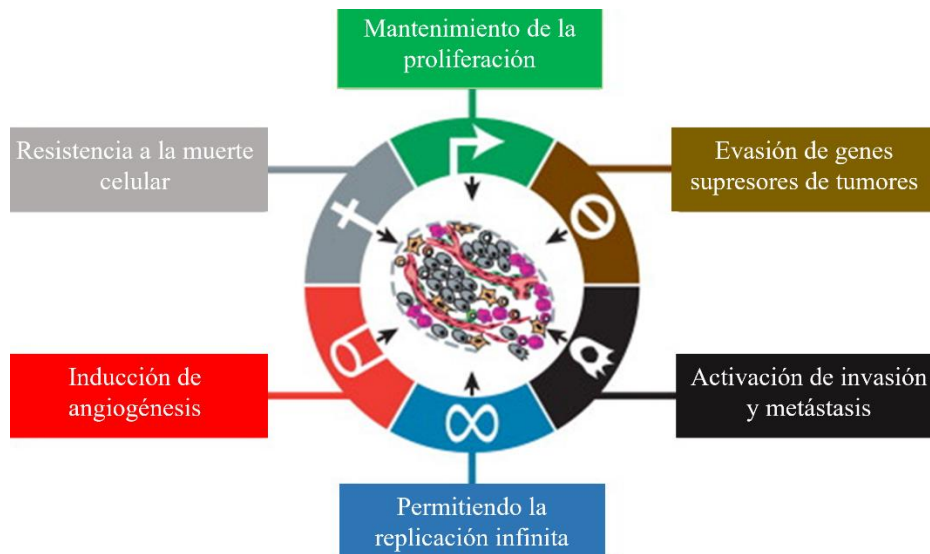


Figura 1.2. Características del cáncer. Traducida y modificada (Hanahan & Weinberg, 2011).

1.1.1. Terapias contra el cáncer

Hoy en día, hay muchos tipos de tratamientos que dependen de los distintos tipos de cáncer, edad y polimorfismos genéticos (Feldman, 2015). Los enfoques terapéuticos incluyen cirugía, radioterapia, quimioterapia, terapias dirigidas, inmunoterapia y otras terapias específicas según el tipo y estadio del cáncer:

- La cirugía se utiliza para extirpar el tumor canceroso y una parte del tejido circundante. Es efectiva cuando el cáncer está localizado y no se ha diseminado a otras áreas.
- La radioterapia junto con la cirugía es el tratamiento de elección si el cáncer se diagnostica en una etapa temprana. Puede ser utilizada antes o después de la cirugía para reducir el tamaño del tumor o eliminar células cancerosas restantes, respectivamente.
- Uno de los principales tratamientos es la quimioterapia, que consiste en el uso de fármacos para destruir las células cancerosas inhibiendo su proliferación y división. Los fármacos se introducen por vía oral o intravenosa para el alcance a todas las células cancerosas. Puede ser utilizada como tratamiento primario, adyuvante o combinado con otras terapias (American Society of Clinical Oncology (ASCO), 2024).

- Las terapias dirigidas constituyen otro tipo de tratamiento que se dirige a moléculas específicas (dianas moleculares) para bloquear el crecimiento y la propagación de las células cancerosas. Se pueden clasificar en moléculas pequeñas (como los inhibidores de quinasas), anticuerpos monoclonales, nanopartículas y terapias génicas (Y. T. Lee et al., 2018). Las nanopartículas se pueden aplicar como vehículos para la administración de fármacos y como diagnóstico (Gavas et al., 2021), mientras que las terapias génicas intentan alterar el material genético en las células cancerosas para destruir o inhibir su crecimiento a través de viroterapia oncolítica, modulación de microambientes e interferencia de ARN, entre otros (Sadelain, 2016). Otros tipos de dianas moleculares muy importantes pueden ser la inducción de apoptosis mediante vías reguladoras como las proteínas de la familia Bcl-2 (Zhu & Almasan, 2017), las caspasas y las proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAPs) (De Almagro & Vucic, 2012; Y. T. Lee et al., 2018).
- Otra alternativa son los trasplantes alogénicos de células madre hematopoyéticas, que consisten en la transfusión de células formadoras de sangre (células madre) de un donante con características genéticas similares al paciente. Este tratamiento suele darse como última instancia, puesto que es más tóxico que la quimioterapia y la terapia inmunosupresora (Takami, 2018).
- Finalmente, han surgido nuevas terapias adoptivas como el receptor de antígeno quimérico T (CAR-T). En este tipo de inmunoterapia, se extraen las células T de un paciente, se modifican *ex vivo* para reconocer un antígeno específico y se vuelven a infundir en el paciente. De esta manera, el receptor de anticuerpos reconoce el antígeno diana y el receptor CAR-T envía señales a través de los receptores de linfocitos T (TCR) para activar la destrucción tumoral mediada por células T (Ma et al., 2019). También existen inmunoterapias con células Natural Killer (NK), que interactúan con las células de cánceres hematológicos a través de receptores de activación e inhibidores. La activación normal depende del equilibrio entre los ligandos en las células diana (Lulla et al., 2019). Sin embargo, este tipo de terapias en tumores malignos sólidos presentan varias limitaciones, a pesar de la rectificación en el tratamiento de los tumores hematológicos (Lohiya et al., 2023).

1.2. Muerte celular

La muerte celular es un proceso crítico y activo en una amplia gama de procesos biológicos que incluyen la proliferación celular, la diferenciación y la morfogénesis, e interviene en el desarrollo de organismos, la homeostasis y la autodefensa. Clásicamente, se reconocen tres tipos de muerte celular, definidos en gran parte por la aparición de la célula moribunda: apoptosis (también conocida como muerte celular de tipo I), muerte celular autofágica (tipo II), y necrosis (tipo III) (Galluzzi et al., 2012). No obstante, la autofagia, a diferencia de la apoptosis y la necrosis que son tipos claros de muerte celular, desempeña un papel vital a favor de la supervivencia en la homeostasis celular, por lo que su papel en la muerte celular debe considerarse cuidadosamente (Ou et al., 2017). En ocasiones, hay células en estado intermedio entre uno y otro tipo, pero existen diferentes rasgos específicos para diferenciar los procesos.

La apoptosis o muerte celular programada (PCD) tiene lugar en el desarrollo embrionario y es esencial para la formación de extremidades y para otros procesos organogénicos. Este fenómeno implica un mecanismo molecular por el que la célula condensa la cromatina, fragmenta la cromatina y rompe el núcleo, forma evaginaciones citoplasmáticas que resultan en vesículas, y se descompone en pequeños fragmentos denominados cuerpos apoptóticos (Pistritto et al., 2016). Además, se ha identificado una forma alternativa de apoptosis denominada piroptosis, que sigue una serie programada dependiente de caspasas, pero es proinflamatoria (D'Arcy, 2019).

Otro tipo de PCD, como ya se ha comentado, es la muerte por autofagia, un mecanismo de degradación intracelular dirigido a la eliminación de orgánulos defectuosos, en exceso o aberrantes. Los orgánulos son envueltos en estructuras de doble membrana derivados del retículo endoplasmático denominados autofagosomas. Estos se fusionan con lisosomas para una degradación completa. Notablemente, la macroautofagia es típicamente un mecanismo protector y anti-apoptótico, y, por lo tanto, la muerte autofágica puede implicar una hiperactivación de un proceso normalmente beneficioso (Tower, 2015).

La ruta de la necrosis es una muerte accidental que se caracteriza por pérdida de la permeabilidad de la membrana plasmática. En este proceso, se liberan orgánulos y contenido citosólico al medio, dando lugar a una respuesta inflamatoria. También pueden

existir algunas formas de muerte celular derivadas como la necroptosis, una categoría de necrosis altamente regulada, o la oncosis, un mecanismo de conmutación entre apoptosis, autofagia y necrosis (D'Arcy, 2019).

1.2.1. Muerte celular programada (PCD) o apoptosis

La PCD o apoptosis es un proceso típico de organismos pluricelulares donde el contenido celular se autodestruye sin desencadenar reacciones de inflamación y provocando la eliminación ordenada de las células dañadas de los tejidos sin inducir daños colaterales a las células circundantes. Por lo tanto, es considerada como un proceso fisiológico de muerte celular iniciado por estímulos del desarrollo o ambientales que activan un programa genético que controla, diseña e inicia una cascada de eventos que dirige la destrucción ordenada y silenciosa de la célula. Este fenómeno es un proceso activo que requiere energía en forma de adenosín trifosfato (ATP) sin iniciar una respuesta inflamatoria, permitiendo así la eliminación de la célula apoptótica de un determinado tejido sin modificar la fisiología del mismo (Plati et al., 2011).

La apoptosis es un mecanismo primordial para mantener un equilibrio homeostático entre el número de nuevas células que se generan y el número de células dañadas o no requeridas que se eliminan del cuerpo. Está altamente regulada dependiendo de la recepción de múltiples señales extracelulares e intracelulares, la integración y amplificación de estas señales por segundos mensajeros y, por último, la activación de las proteasas efectoras de la muerte. Así, la proliferación celular incontrolada puede conducir a situaciones patológicas como el cáncer que puede resultar en la muerte del organismo, mientras que un nivel excesivo de muerte celular puede resultar en enfermedades como el Alzheimer, la enfermedad de Parkinson o la artritis reumatoide (D'Arcy, 2019; Dragovich et al., 1998; Zakeri & Ahuja, 1997).

La apoptosis se caracteriza por una serie de cambios morfológicos y moleculares como son la disminución del tamaño celular (picnosis) debido a la condensación del núcleo y el citoplasma, seguido de una fragmentación y degradación del ADN internucleosomal, y la formación de “burbujas” en la superficie celular sin destrucción de la membrana celular (zeiosis). La reducción del volumen celular origina vesículas que envuelven el material intracelular denominadas cuerpos apoptóticos. In vivo, los macrófagos fagocitan estos cuerpos apoptóticos, atraídos por ligandos específicos como

1. Introducción

la fosfatidilserina (Jitkaew et al., 2009). In vitro, tanto los cuerpos apoptóticos como los fragmentos de células restantes se hinchan y se lisan. Esta fase terminal de muerte celular in vitro ha sido denominada “necrosis secundaria” (Galluzzi & Kroemer, 2017) (Figura 1.3.).

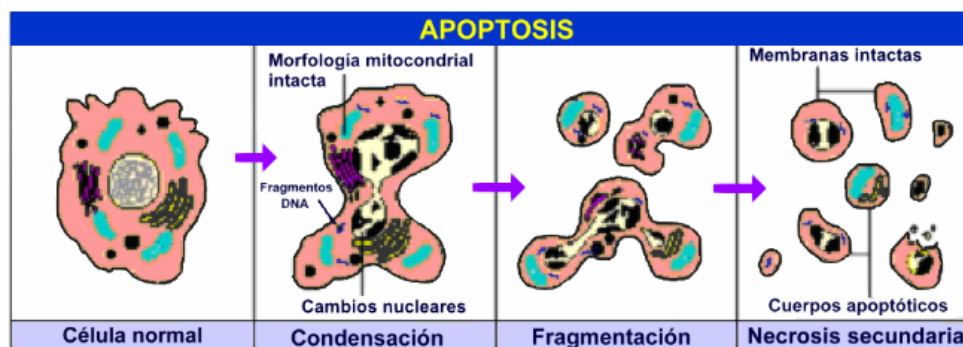


Figura 1.3. Representación esquemática del proceso de muerte por apoptosis: condensación de los orgánulos, fragmentación nuclear y formación de cuerpos apoptóticos junto con la necrosis secundaria (Cascales Angosto, 2003).

La muerte celular apoptótica tiene una estrecha relación con las mitocondrias puesto que son el sitio intracelular primario del consumo de oxígeno y la principal fuente de especies reactivas de oxígeno (ERO), la mayoría de las cuales se originan a partir de la cadena respiratoria mitocondrial (Marí et al., 2009). La mitocondria amplifica la respuesta apoptótica liberando inductores apoptóticos con capacidad de iniciar la cascada de caspasas y la permeabilización de la membrana mitocondrial. Los efectores de la apoptosis mitocondrial se encuentran en todos los tipos celulares y parece que se conservan incluso en las células tumorales. Esta relación se asocia frecuentemente con la generación de ERO y las alteraciones redox, que implican un componente importante en la señalización (Carmody & Cotter, 2001).

1.2.1.1. Caspasas

Las caspasas son una familia de genes importantes para mantener la homeostasis mediante la regulación de la muerte celular y la inflamación. Se trata de un grupo de proteínas citosólicas que presentan una similitud en la secuencia de aminoácidos, en la estructura, y en la especificidad por el sustrato (Green, 2022b). Reciben este nombre ya que todas tienen un grupo cisteína altamente conservado en el centro activo y, además, la mayoría de ellas reconocen una secuencia de 4 aminoácidos (x-Glu-x-Asp) y cortan el

enlace peptídico del lado carboxilo del aspártico. Otro aspecto en común es el hecho de que son hidrolasas. En conjunto, sus características le dan el nombre de caspasa (C-isteína ASP-ártico hidrol-ASA) (Boice & Bouchier-Hayes, 2020).

La mayoría de las caspasas son expresadas como proenzimas que contienen tres dominios: un prodominio N-terminal de longitud variable, seguido de una subunidad mayor de 20 kDa y una subunidad menor de 10 kDa en el extremo C-terminal. Desde el punto de vista funcional, las caspasas se pueden clasificar en dos grupos, las caspasas inflamatorias (-1, -4, -5) y las caspasas apoptóticas. Estas últimas, a su vez, se subdividen en iniciadoras (-2, -8, -9 y -10) o efectoras (-3, -6, y -7), según su función en las diversas cascadas de señalización intracelular (McIlwain et al., 2013) (Figura 1.4.).

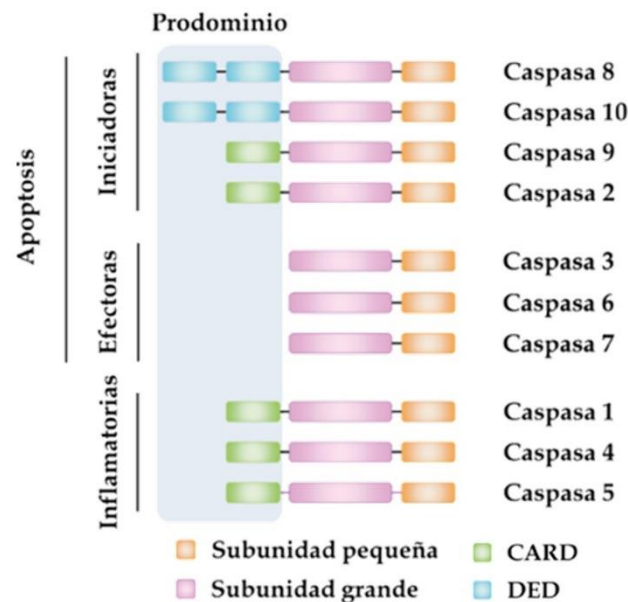


Figura 1.4. Clasificación y estructura de caspasas (Cade & Clark, 2015).

Las caspasas iniciadoras se activan por auto-proteólisis y actúan activando los elementos efectoras en respuestas a estímulos pro-apoptóticos. Tienen un prodominio terminal que puede contener el dominio DED (Death Effector Domain) o el dominio CARD (Caspase Recruitment Domain), que les permiten interactuar con otras moléculas que regulan su activación (Sun, 2024). Por otro lado, las caspasas efectoras actúan en el desensamblaje de la célula y tienen un prodominio de 20-30 aminoácidos eliminados por proteólisis sin dominios estructurales. La proteólisis que las activan suele ser llevada a cabo por las caspasas iniciadoras.

1. Introducción

La activación de las pro-caspasas implica el procesamiento proteolítico en los residuos de ácido aspártico que separa cada uno de estos tres dominios de la proenzima. Tras la proteólisis se produce una asociación entre la subunidad mayor y la menor para formar un heterodímero, y dos heterodímeros se asocian para formar un tetrámero con dos sitios catalíticos independientes. Dentro de cada sitio catalítico ambas subunidades unidas contribuyen a la unión del sustrato y a su catálisis (Green, 2022a) (Figura 1.5.).

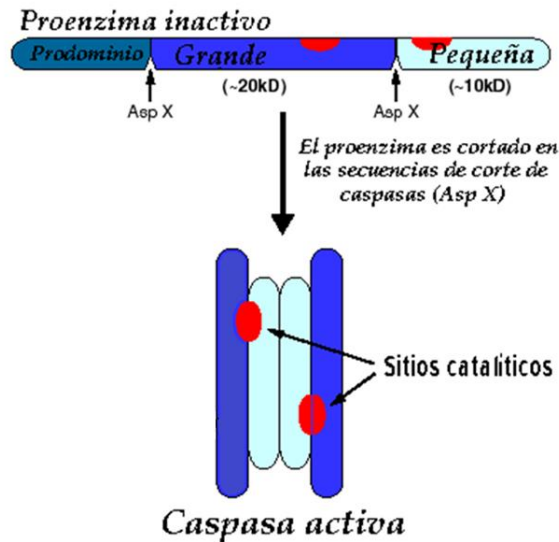


Figura 1.5. Activación de las procaspasas (Montoliu Ferrera, 2000).

Todas las caspasas son sintetizadas como zimógenos (aunque se ha visto que la caspasa-8 tiene cierta actividad incluso antes de ser separada por su prodominio). Se localizan principalmente en el citosol, aunque pueden estar también en el núcleo y en la mitocondria. Su actividad se inhibe por proteínas anti-apoptóticas como Bcl-2 o las IAPs, entre otras (Boice & Bouchier-Hayes, 2020; Sun, 2024).

1.2.1.2. Proteínas de la familia Bcl-2

Las Bcl-2 son una familia de proteínas importantes en los procesos de permeabilización de la membrana mitocondrial y es un punto crucial en la vía intrínseca de la apoptosis. Su nombre deriva del protooncogén Bcl-2 (B-cell lymphoma 2), importante en el bloqueo de la muerte celular. La familia está compuesta aproximadamente por 25 miembros, y se caracterizan por tener cuatro dominios de homología estructuralmente conservados: BH1, BH2 y BH3, los cuales se requieren para

interaccionar con otros miembros de la familia Bcl-2, mientras que el dominio BH4 media funciones de control del ciclo celular (Czabotar et al., 2014; Gillies & Kuwana, 2014).

La familia de las proteínas Bcl-2 se puede dividir en tres grupos basados en su estructura y función (Czabotar et al., 2014; Shubach et al., 2015):

1. Las proteínas anti-apoptóticas, que en general contienen los cuatro dominios de homología. Dentro de este grupo se encuentran Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, y Mcl-1, que bloquean la apoptosis inhibiendo a sus homólogos pro-apoptóticos.

2. Las proteínas pro-apoptóticas Bax/Bak o proteínas efectoras multidominio que comparten homología en los dominios BH 1-3.

3. Las proteínas de dominio único BH3, que comparten homología únicamente en el dominio corto y vigilan el bienestar de la célula, siendo las más relacionadas con los mecanismos de supervivencia celular, ya sea por la inhibición o activación de miembros apoptóticos. Dentro de este grupo se encuentran las proteínas Bim, Puma, Bad y Noxa, entre otras (Figura 1.6.) (Czabotar et al., 2014; Shubach et al., 2015).

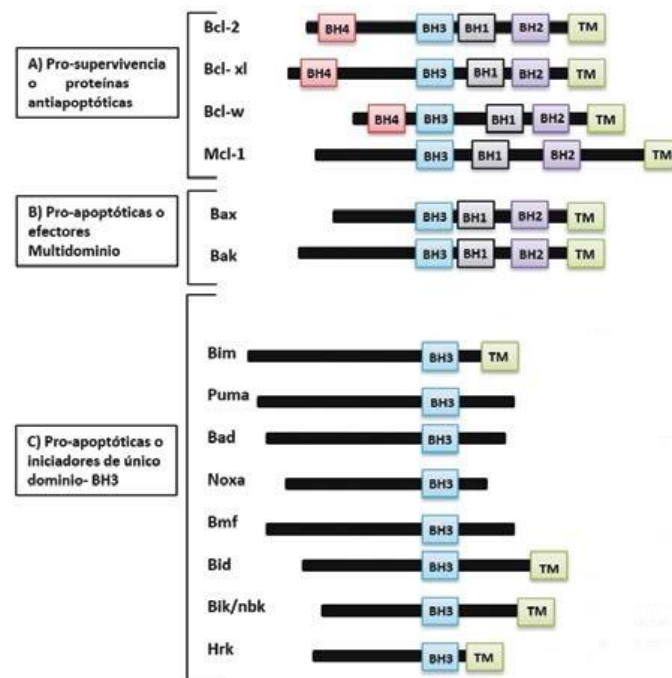


Figura 1.6. Clasificación de la familia de proteínas Bcl-2 según su estructura y función (Shubach et al., 2015).

1. Introducción

1.2.1.3. Vías de inducción de la apoptosis

Existen dos vías clásicas de señalización que conducen a la activación de la PCD: 1) la ruta de los receptores de muerte o extrínseca, que implica la activación de determinados miembros de la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral (TNF), como las rutas de Fas-R/FasL o TRAIL-R/TRAIL, que tienen un papel fundamental en la inflamación e inmunidad; y 2) la ruta mitocondrial o intrínseca, inducida por distintas formas de estrés celular, como puede ser el causado por la ausencia de factores de crecimiento, pérdida de adhesión del sustrato, daño al ADN, activación de oncogenes, infección viral, radiaciones ionizantes, radiaciones ultravioletas, etc. Las dos vías pueden solaparse, aunque la transducción de señales es diferente (Elmore, 2007).

En la ruta apoptótica extrínseca o mediada por receptores, las células pueden entrar en apoptosis en respuesta a un estímulo inducido por la unión de los denominados ligandos de muerte a sus receptores específicos (proteínas transmembrana). Tras la unión del ligando, los receptores de muerte se unen a través de sus dominios de muerte a proteínas adaptadoras. Estas proteínas adaptadoras tienen dominios DED que interactúan con los dominios DED de las caspasas iniciadoras. En este momento, se desarrolla un complejo de señalización inductor de muerte (DISC) que conduce a la activación autocatalítica de la pro-caspasa-8. Posteriormente, la caspasa-8 activa las caspasas ejecutoras desencadenando la apoptosis (Wong, 2011) (Figura 1.7.).

Por otro lado, la muerte celular por apoptosis intrínseca o mitocondrial puede ser desencadenada por distintas condiciones que dan lugar a estrés intracelular, incluyendo daño en el ADN, estrés oxidativo, y sobrecarga de Ca^{2+} en el citosol (Espino et al., 2011a; Espino et al., 2011b; Espino et al., 2010c), entre otras. La señal apoptótica induce la desfosforilación de la proteína Bad, la cual no puede ser retenida por el chaperón 14-3-3 y se libera. Una vez liberada, Bad se une a la proteína anti-apoptótica Bcl-2 en la superficie mitocondrial y la inactiva. Esto libera a la proteína Bax (pro-apoptótica), la cual provoca un cambio en el potencial de membrana mitocondrial (Bejarano et al., 2009b) y la apertura del poro de permeabilidad transitoria de la membrana mitocondrial (mPTP). Esto provoca la salida de citocromo c y otras proteínas mitocondriales, como el factor inductor de la apoptosis (AIF), la endonucleasa G, Smac/DIABLO y la proteasa de serina Omi/HtrA2, desde el espacio intermembrana hacia el citosol. Posteriormente, el citocromo c citosólico se une a la proteína Apaf1 y se desencadena la formación de un

complejo llamado apoptosoma, que recluta a la pro-caspasa-9, lo que permite su activación por auto-proteólisis. La caspasa-9, a su vez, activa a las caspasas ejecutoras (3, 6, y/o 7) que actuaran sobre otros sustratos, iniciando así la cadena de eventos apoptóticos posteriores (D'Arcy, 2019; Pistritto et al., 2016; Willis et al., 2007) (Figura 1.7).

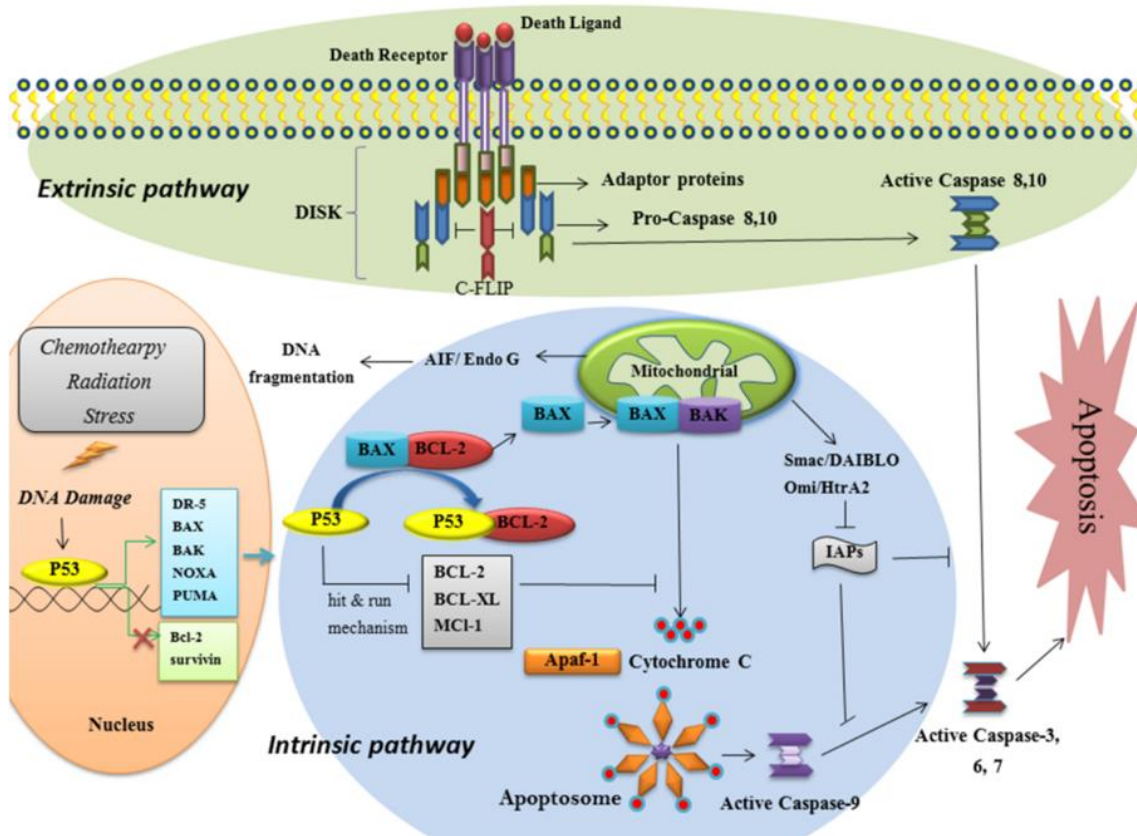


Figura 1.7. Diagrama esquemático de las vías intrínseca y extrínseca de la apoptosis (Goldar et al., 2015).

En cuanto a las proteínas mitocondriales liberadas, tanto la AIF como la endonucleasa G estimulan la apoptosis independiente de caspasas, mientras que Smac/DIABLO y Omi/HtrA2 inhiben la acción de las IAPs (Gillies & Kuwana, 2014; Goldar et al., 2015).

1.2.1.4. Especies reactivas de oxígeno (ERO) en la apoptosis

Las ERO son moléculas altamente reactivas que contienen oxígeno, superóxidos, peróxidos y radicales hidroxilos. Las ERO intracelulares son producidas principalmente por las mitocondrias, en gran medida, por la velocidad del flujo de electrones a través de los complejos de la cadena respiratoria (Poyton et al., 2009; J.

1. Introducción

Zhang et al., 2016). Clásicamente, las ERO se consideran como moléculas defensoras del huésped liberadas por los neutrófilos para destruir patógenos, aunque pueden conducir al estrés oxidativo en las mitocondrias e inducir la apoptosis.

Las ERO se asocian frecuentemente con la citotoxicidad, pero también activan o desactivan una variedad de receptores, proteínas, iones y otras moléculas de señalización asociadas al estado redox celular (Yu et al., 2016). Los miembros de la vía apoptótica mitocondrial son potencialmente excelentes dianas para terapias inducidas por apoptosis, ya que la mitocondria integra señales de vías de supervivencia (citoquinas y Bad) y de muerte (p53 y Bax). Por eso, algunos estudios han reportado que agentes oxidantes como el H₂O₂ desencadenan la activación de la proteína pro-apoptótica Bid y un aumento de la externalización de la fosfatidilserina y fragmentación del ADN (Bejarano et al., 2009a; Bejarano et al., 2011).

Por otro lado, las ERO regulan la apertura del mPTP, un canal grande y no específico que abarca la membrana mitocondrial interna y la membrana mitocondrial externa, y que media los cambios de permeabilidad que inician la muerte celular por la vía mitocondrial (Basañez et al., 2012; Y. Liu & Chen, 2013). Esto ocurre cuando el mPTP se abre en respuesta a varias señales de permeabilidad mitocondrial, lo cual altera el gradiente electroquímico de protones, impulsa la producción de más ERO y, en última instancia, induce la hinchazón y la ruptura del orgánulo. Las ERO modulan directamente la apertura del mPTP oxidando el propio canal, aunque también lo hacen indirectamente al aumentar la concentración de Ca²⁺ mitocondrial que, a su vez, favorece la producción de ATP y la generación de más ERO durante la fosforilación oxidativa (Voronina et al., 2014). En la vía extrínseca de la apoptosis, las ERO son producidas por el ligando Fas como un evento anterior para la activación del receptor Fas mediante fosforilación, lo que es a su vez necesario para el posterior reclutamiento de proteínas asociadas con Fas que, finalmente, desencadenan la apoptosis (S. C. Gupta et al., 2012).

En definitiva, la permeabilización de las membranas debido al estrés oxidativo persistente juega un papel crítico en los mecanismos de diversos agentes quimioterapéuticos y, por lo tanto, estas terapias dirigidas a las mitocondrias pueden ser útiles en enfermedades proliferativas como el cáncer, usando la apoptosis como una herramienta eliminadora (Poyton et al., 2009; Y. Zhou et al., 2017).

1.3. Quimioterapia

En los últimos 40 años, la quimioterapia se ha convertido en una de las modalidades más utilizadas en el tratamiento del cáncer con una amplia variedad de fármacos. La quimioterapia consiste en el uso de sustancias con capacidad para destruir células y tejidos cancerosos, con el fin de lograr la reducción de la enfermedad. Los agentes quimioterápicos suelen ser efectivos en células neoplásicas, ya que tienen un metabolismo alterado y más rápido que las células sanas, pero también provocan efectos secundarios como nefrotoxicidad, cardiotoxicidad y neurotoxicidad. Entre los quimioterápicos más usados se encuentran aquellos que contienen metales. De hecho, el uso de metaloides en medicina posee ya una larga trayectoria histórica, pero todavía continua el desafío de conseguir una mayor selectividad hacia las células tumorales.

1.3.1. Cisplatino (CisPt)

El CisPt también nombrado cis-diamminadichloroplatino(II) es un compuesto metálico con una geometría molecular plano cuadrada (Figura 1.8.) En 1965, Rosenberg descubrió la capacidad del CisPt de inhibir la división celular de *Escherichia coli*, a partir de lo cual surgió la idea de utilizar este compuesto para impedir el desarrollo de células cancerígenas (Rosenberg et al., 1965). Fue el primer compuesto de platino (Pt) aprobado por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) para el tratamiento del cáncer en 1978. En condiciones generales es estable, pero puede transformarse lentamente en el isómero trans (Kelland, 2007). Se trata de un fármaco efectivo contra ciertos tipos de cáncer como el de testículo, con el que se consigue entre un 70% y 90% de éxito. Entre otros tipos de cáncer con los cuales es efectivo este compuesto están el cáncer de ovario, carcinomas útero-cervicales, cáncer de pulmón y otros tipos de tumores como osteosarcoma y neuroblastoma (Dasari & Bernard Tchounwou, 2014; Florea & Büsselberg, 2011; Pariente et al., 2016). Actualmente, este compuesto se utiliza en combinación con otros fármacos (5-fluorouracilo o paclitaxel) en el tratamiento de otros tipos de tumores como melanomas o el cáncer de mama (Tsvetkova & Ivanova, 2022).

1. Introducción

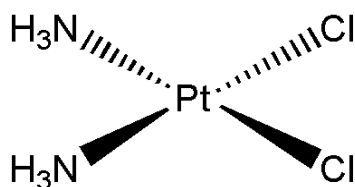


Figura 1.8. *Cis-diamminadichloroplatino(II) (CisPt).*

El CisPt se administra por vía intravenosa y, una vez dentro de la célula, se convierte en una forma altamente reactiva. Puede reaccionar con una variedad de sustratos citoplasmáticos, especialmente con nucleófilos endógenos como glutatión reducido (GSH), metionina, metalotioneínas y otras proteínas a través de sus cisteínas (Macciò & Madeddu, 2013). En cuanto al mecanismo de acción propuesto para el CisPt, se considera que, una vez que el compuesto se encuentra en el compartimento intracelular, sufre un proceso de hidrólisis a través del cual uno o los dos ligandos cloro son sustituidos por moléculas de agua formándose los cationes $[\text{PtCl}(\text{H}_2\text{O})(\text{NH}_3)_2]^+$ o $[\text{Pt}(\text{H}_2\text{O})_2(\text{NH}_3)_2]^+$, respectivamente, los cuales, al estar cargados positivamente, no pueden salir de la célula. La diferencia que existe entre la concentración de cloruros en el interior celular ($\sim 4\text{-}20$ mM) y la alta concentración de agua (~ 50 mM) favorece que se lleven a cabo las reacciones de hidrólisis del compuesto, dando lugar a las mencionadas acuospecies catiónicas, las cuales interaccionarán con el ADN en un paso posterior. Por lo tanto, tras la activación del CisPt, el producto hidrolizado con capacidad de reaccionar con cualquier nucleófilo se enlaza con el centro reactivo N7 de un residuo de una base púrica, especialmente guanina, lo que conduce a la torsión de la doble hélice del ADN que da lugar a la formación de los llamados aductos Pt-ADN. Este tipo de unión conduce aproximadamente al 90% del total de los aductos responsables de los efectos citotóxicos del complejo metálico (Ahmad, 2010), provocando cambios en la estructura secundaria del ADN e inhibiendo los procesos de replicación y transcripción celular (Jamieson & Lippard, 1999). Por tanto, y como se ha indicado anteriormente en la sección 1.2.1.3., se puede concluir que el CisPt provoca principalmente la muerte celular por apoptosis (Jamieson & Lippard, 1999).

También se pueden formar distintos tipos de aductos entre el CisPt y la molécula de ADN, desde la reacción del monoaducto hasta cruzamientos tanto intercatenarios como intracatenarios con el ADN. En la Figura 1.9. se muestra la mayoría de los posibles aductos CisPt-ADN (Crul et al., 2002). El mayor porcentaje de aductos se produce entre

guaninas adyacentes 1,2-d(GpG) (60-65%) (figura 1.9.d), los cuales son los que confieren las propiedades antitumorales al CisPt. El resto de los aductos CisPt-ADN se establecen por la unión de guaninas con adeninas del tipo 1,2-d(ApG) (~20%) y uniones cruzadas 1,3-intracatenarias, intercatenarias o de enlaces con los residuos de cisteína de las proteínas (Figura 1.9.).

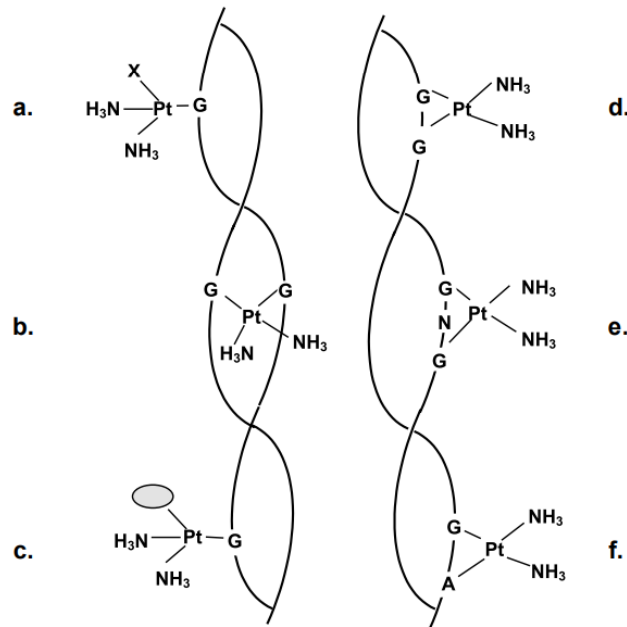


Figura 1.9. Posibles aductos del CisPt con el ADN (CisPt-ADN). a) CisPt unido a la guanina (*X* puede ser el ligando cloro original, o un ligando agua); b) enlace cruzado entre cadenas; c) enlace CisPt-guanina-proteína; d) enlace cruzado intracatenario GpG; e) enlace cruzado intracatenario GpNpG (*N* representa una base nitrogenada); f) enlace cruzado intracatenario ApG (Crul et al., 2002).

El CisPt es uno de los fármacos más atractivos entre los diferentes medicamentos de quimioterapia que se usan ampliamente para el cáncer; no obstante, su uso está limitado por la resistencia intrínseca o adquirida por varios tipos de cáncer, así como los efectos tóxicos secundarios que provoca en célula sanas.

Hay multitud de factores que intervienen en la resistencia del CisPt dependiendo de la línea celular y los tipos de cánceres. Algunos de los más importantes implican una disminución de la cantidad de CisPt intranuclear debido a una menor captación celular y un aumento del flujo de salida del complejo. El CisPt puede ingresar en la célula por mecanismos de transporte activo a través de canales transmembrana. Principalmente, la entrada de CisPt esta mediada por el canal CTR1, un transportador de cobre de alta afinidad. En este sentido, en líneas celulares resistentes al CisPt, este transportador se

1. Introducción

expresa en menor medida por lo que se forman menos enlaces bifuncionales en el ADN provocando una resistencia adquirida (Makovec, 2019).

Se han descrito otros tipos de mecanismos por los cuales las células cancerosas se pueden volver resistentes al CisPt, como por ejemplo el aumento de la actividad del sistema de reparación por escisión de nucleótidos (NER). El NER repara el ADN eliminando aductos de Pt-ADN, disminuyendo así la eficacia del CisPt (Friedberg et al., 2006). Existen numerosas evidencias de que, entre todas las proteínas implicadas en este sistema de reparación, la sobreexpresión de la proteína de reparación por escisión del ADN ERCC1 (Excision Repair Complementing defective in Chinese hamster 1) es crítica en la resistencia al CisPt (H. W. Lee et al., 2009). En pacientes con tumores gástricos, se ha encontrado un mayor nivel de expresión de ERCC1 en aquellos con resistencia al quimioterápico (Y. P. Liu et al., 2013). En otros tipos de tumores, como el cáncer de ovario (Dabholkar et al., 1994), el cáncer de pulmón de células no pequeñas (W. Zhou et al., 2004) y el cáncer testicular de células germinales, se han obtenido resultados similares (Mendoza et al., 2013).

Además, la inactivación del CisPt se considera otra contribución notable a la resistencia al CisPt. Una vez que el complejo metálico se hidroliza, interactúa con centros nucleófilos de moléculas endógenas como el GSH, la metionina y algunas proteínas en el citosol. Así, una vez que el CisPt entra en la célula, puede ser inactivado por estas interacciones (Rabik & Dolan, 2007). Se ha observado que algunas líneas celulares tumorales resistentes al CisPt, como la línea de carcinoma de pulmón A549/CisPt, poseen niveles más altos de GSH y, por tanto, acumulan menos fármaco que las líneas sensibles, como la línea celular A549 (W. J. Wu et al., 2013). Finalmente, la resistencia a CisPt también parece implicar alteraciones genéticas y epigenéticas de los componentes de esta red de señalización compleja, como las proteínas de la familia Bcl-2, survivina, caspasas o p53 (Makovec, 2019).

1.3.2. Derivados del CisPt

Muchos fármacos derivados del CisPt han entrado en ensayos clínicos, pero solamente dos han sido aprobados para su uso a nivel mundial: carboplatino y oxaliplatino (Wheate et al., 2010). Asimismo, existen otros compuestos de Pt con licencia para su uso

como quimioterápico en países asiáticos como son el nedaplatino (Japón), el heptaplatino (Corea) y el loboplatino (China) (Figura 1.10.) (Dilruba & Kalayda, 2016).

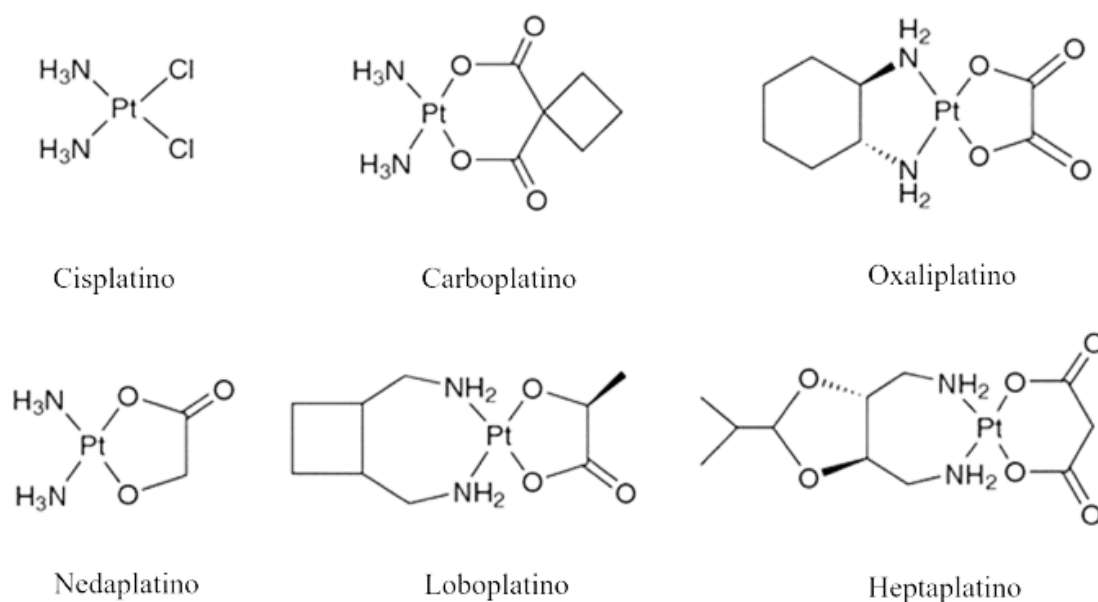


Figura 1.10. Estructura química de los fármacos de Pt utilizados clínicamente (Dilruba & Kalayda, 2016).

Aunque los compuestos de Pt(II) siguen siendo los más usados para el tratamiento de entre el 50-70% de los casos de cáncer, los problemas de efectos secundarios adversos y resistencia al tratamiento de algunos tipos de cáncer siguen persistiendo. Este hecho evidenció la necesidad de marcar una serie de pautas para establecer una relación estructura-actividad y mejorar el número de complejos bioactivos.

Así, para diseñar nuevos fármacos anticancerígenos de Pt(II), se pueden modificar varias características estructurales. Como muestra la Figura 1.11., estos compuestos presentan en su estructura dos tipos de ligandos. Los ligandos L suelen contener átomos de nitrógeno dadores de electrones y se les considera grupos no lábiles porque forman enlaces termodinámicamente estables con el átomo de Pt y aparecen en el aducto final Pt-ADN. Las modificaciones de estos ligandos afectan directamente a la naturaleza de los aductos resultantes y, por tanto, a la forma en que los mecanismos de reparación celulares responden a estos aductos. Por otra parte, los ligandos X desaparecen en el aducto final Pt-ADN, por ello se les considera grupos lábiles. Las modificaciones de estos ligandos pueden alterar tanto la estequiometría como la cinética de reacción del compuesto antitumoral (Wilson & Lippard, 2014).

1. Introducción

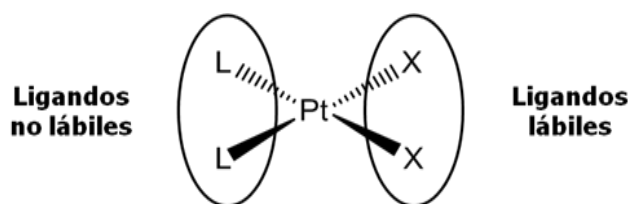


Figura 1.11. Tipos de ligandos en los compuestos quimioterapéuticos de Pt(II).

Inicialmente, se consideró que solo podían tener actividad antitumoral los complejos de Pt que tuvieran como ligandos no lábiles aminas con al menos un hidrógeno sin sustituir, es decir, aminas primarias o secundarias, ya que era necesario que la amina tuviera un mínimo de átomos de hidrógeno que pudieran enlazar al ADN mediante enlace por puente de hidrógeno. Actualmente, se considera que la presencia de estas aminas pocos sustituidas en los quimioterápicos es solo un hecho deseable para que no se den impedimentos estéricos entre el complejo de Pt y el ADN al formarse el aducto entre ellos (Hambley, 1997).

En relación a los ligandos lábiles, la toxicidad de los fármacos de Pt está directamente relacionada con la hidrólisis de los mismos, es decir, con la facilidad con la que estos grupos son sustituidos por moléculas de agua en su estructura. Así, por ejemplo, la sustitución de los ligandos cloro por un dicarboxilato reduce significativamente la velocidad de hidrólisis de los complejos de Pt, lo que se traduce en una menor toxicidad de estos últimos (Wheate et al., 2010). Como consecuencia, carboplatino y oxaliplatino exhiben menor reactividad y menor cinética de unión al ADN que CisPt, lo que se traduce en menos efectos secundarios (Cui et al., 2014).

Por tanto, es necesario seguir sintetizando y estudiando la actividad citotóxica de complejos de Pt(II) estructuralmente similares al CisPt, de forma que con pequeñas variaciones estructurales se puedan obtener relaciones estructura-actividad que faciliten el diseño de nuevos fármacos con aplicación clínica. En este trabajo, se ha optado por utilizar complejos de Pt(II) ya sintetizados o de nueva síntesis con modificaciones en los ligandos no lábiles respecto del CisPt.

1.3.2.1. Derivados de $[PtCl_2(N-N)]$ ($N-N =$ ligandos bidentados)

Una de las estrategias que se viene siguiendo y de las más utilizadas para el desarrollo de fármacos anticancerígenos de Pt(II) es la coordinación de ligandos

bioactivos o potencialmente bioactivos al centro metálico, ya que este enlace puede influir en las propiedades químicas y biológicas de estos ligandos (Chiang et al., 2012). Entre estos ligandos bioactivos podemos encontrar derivados de tiazolinas, tiazinas y pirazol. Las tiazolinas son heterociclos de cinco miembros derivados del tiazol que contienen un átomo de nitrógeno y un átomo de azufre. Presentan un doble enlace y se pueden clasificar en función de la posición relativa de dicho enlace (Figura 1.12.A). Las tiazinas son heterociclos orgánicos que están formados por seis átomos con la presencia de dos heteroátomos, uno de azufre y otro de nitrógeno, los cuales pueden encontrarse en distintas posiciones del anillo (Figura 1.12.B). Y, por último, el pirazol es un compuesto orgánico heterocíclico que consiste en un anillo aromático simple de tres átomos de carbono y dos nitrógenos en posiciones adyacentes (Figura 1.12.C).

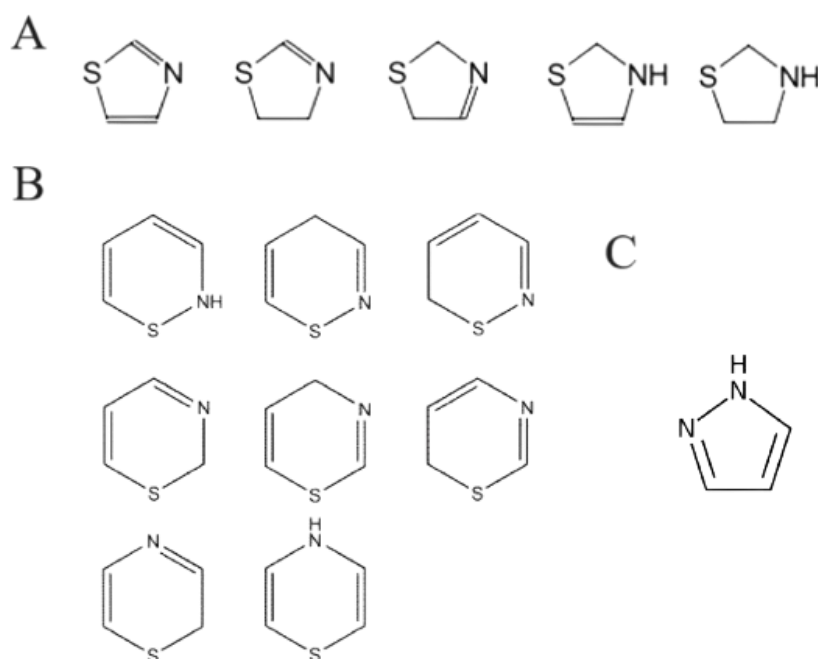


Figura 1.12. (A) Estructura química del tiazol y sus derivados (tiazolinas). (B) Estructura química de las tiazinas. (C) Estructura química del pirazol.

En cuanto a las propiedades biológicas de compuestos que contengan estos heterociclos se han encontrado productos naturales con actividad anticancerígena, como por ejemplo los tantazoles (Figura 1.13.) (Alsharif & Alam, 2017), compuestos que contienen en su estructura anillos de 2-tiazolina.

1. Introducción

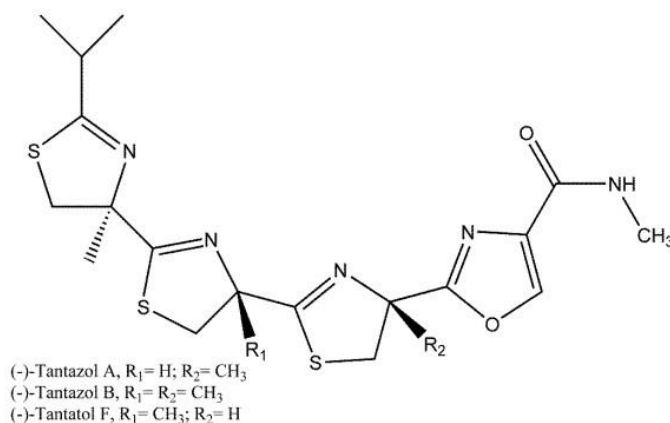


Figura 1.13. Estructura química general del tantazol.

Por otro lado, se han sintetizado oligómeros sintéticos derivados de la 2-tiazolina que pueden inhibir el crecimiento celular en cáncer de páncreas, próstata y colon (Sondhi et al., 2009). Asimismo, se han obtenido compuestos de coordinación de cobre(II) con ligandos derivados de tiazolina que han mostrado cierto potencial citotóxico frente a las líneas celulares HT-29, T47D, L929 y HeLa (Bolos et al., 2002), al tiempo que inducen acciones antiinflamatorias y antitumorales in vivo (Chaviara et al., 2005).

Igualmente, los derivados de 1,3-tiazina (Figura 1.14.) han demostrado ser potentes agentes citotóxicos contra líneas celulares de mama, esófago (Nagendra Prasad et al., 2019) y leucemia (Ferreira et al., 2013).

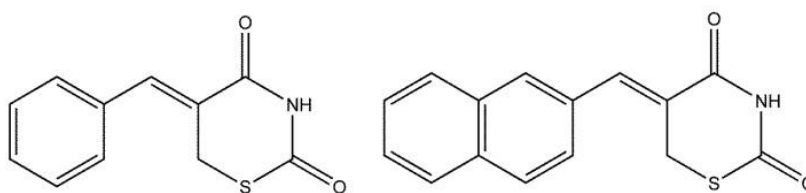


Figura 1.14. Estructura química de los derivados de 1,3-tiazina con actividad antitumoral.

Con relación al anillo de pirazol descrito anteriormente, este presenta una relevancia biológica única, siendo bien conocidas las propiedades anticancerígenas de varios derivados de este heterociclo (Faria et al., 2017; Keter & Darkwa, 2012). Así, algunos complejos de Pt(II) con ligandos derivados de difenil-pirazol (Figura 1.15.) mostraron propiedades citotóxicas similares al CisPt y fueron capaces de esquivar la albumina y el glutatión como mecanismos de resistencia (Querino et al., 2020).

Finalmente, se ha descrito que complejos de Pt(II) que contienen pirazol pueden desencadenar una actividad pro-apoptótica, por lo que estos ligandos bioactivos se podrían considerar candidatos prometedores para el desarrollo de fármacos contra el cáncer (Czarnomysy et al., 2018).

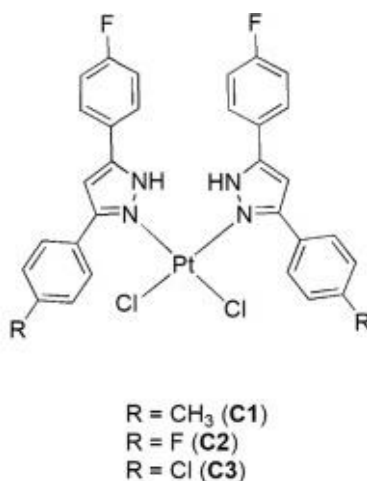


Figura 1.15. Complejo de Pt(II) con ligandos derivados de difenil-pirazol.

Por consiguiente, una vez puesto de manifiesto el interés biológico que muestran los anillos de pirazol, 1,3-tiazina y 2-tiazolina, en la presente memoria se ha efectuado la síntesis de compuestos de coordinación de Pt(II) con ligandos bidentados potencialmente bioactivos que contengan en su estructura uno o dos de los heterociclos mencionados en este apartado.

1.3.2.2. Derivados de $[\text{PtCl}_2(\text{NH}_2\text{R})(\text{NH}_3)]$ ($R = \text{grupo alquilo o arilo}$)

La síntesis de complejos de Pt(II) de fórmula general $[\text{PtCl}_2(\text{NH}_2\text{R})(\text{NH}_3)]$ representan una estrategia novedosa a la hora de obtener nuevos derivados de CisPt. Así, cuando un ligando NH_3 del CisPt se sustituye por ligandos monodentados, los compuestos pueden adquirir una reducción de su hidrólisis, y una mayor solubilidad y estabilidad cinética (Hambley, 1997).

Investigaciones en este sentido han conducido a la obtención de un complejo de Pt(II), picoplatino (Figura 1.16.), el cual ha demostrado su eficacia en ensayos clínicos en fase III para el tratamiento de cáncer colorrectal, prostático y diversos linfomas (Wheate et al., 2010).

1. Introducción

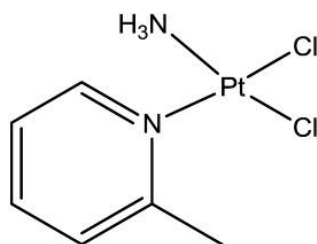


Figura 1.16. Estructura química del picoplatino.

Además, en algunos estudios mediante la sustitución de un NH_3 por aminas primarias, las propiedades antitumorales se han visto mejoradas con respecto al fármaco de referencia CisPt, especialmente con aminas cíclicas (Rochon & Buculei, 2005). Como ejemplo de aminas primarias, se encuentran las cloroanilinas, las cuales, en algunos complejos de Pt(II), han mejorado las propiedades citostáticas y antitumorales in vitro e in vivo frente a células de leucemia y melanoma con respecto al CisPt (Craciunescu et al., 1985). Además, en trabajos anteriores realizados por los grupos de investigación de “Química de la Coordinación” del área de Química Inorgánica y “Neuroinmunofisiología y Crononutrición” del área de Fisiología de la Universidad de Extremadura, se ha comprobado que la presencia o no de un derivado 3,4-dicloroanilina en ligandos estructuralmente similares enlazados a Pt(II) determina la mayor o menor actividad biológica de los respectivos complejos (Figura 1.17.). Así, la presencia de este derivado ha tenido la capacidad de mejorar la actividad biológica en líneas celulares de cáncer de colon HT-29 y leucemia U-937 (Fernández-Delgado et al., 2020; Fernando J. Barros et al., 2015).

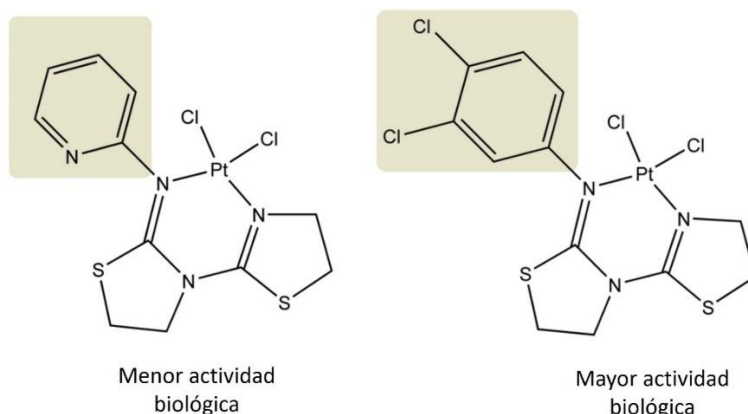


Figura 1.17. Complejos de Pt(II) similares en presencia o no de un derivado de anilina.

1.3.3. Complejos de paladio(II) (Pd)

El desarrollo de compuestos de coordinación de Pt(II) como ion metálico central ha promovido la síntesis de nuevos complejos de iones metálicos diferentes con actividad antitumoral. Así, en los últimos años se han sintetizado varios complejos de Pd(II) debido a la similitud de la química de coordinación entre los iones metálicos Pt(II) y Pd(II), los cuales muestran propiedades citotóxicas (Kapdi & Fairlamb, 2014; Lazarević et al., 2017).

Estos complejos de Pd(II) reaccionan más rápido que sus análogos de Pt(II) y, aunque son algo menos estables tanto desde el punto de vista termodinámico como cinético, presentan una mayor solubilidad (Bugarčić et al., 2015). El hecho de que estos complejos de Pd(II) presenten una mayor reactividad conduce a la formación de especies químicas no deseadas antes de alcanzar las biomoléculas dianas e incluso una baja actividad antitumoral. Estos inconvenientes pueden superarse utilizando agentes quelantes adecuados para formar complejos estables que reduzcan la reactividad del ion Pd(II) (Fanelli et al., 2016; Vojtek et al., 2019). La investigación en este sentido ya ha conducido al descubrimiento de un complejo de Pd(II), la padeliporfina (TOOKAD[®]), el cual ya ha sido aprobado para uso clínico (Azzouzi et al., 2015). Un estudio reciente indica que en general podría lograrse una mayor actividad en los complejos de Pd(II) utilizando ligandos más voluminosos o bidentados disminuyendo la reactividad de los compuestos (Alam & Huq, 2016). Por lo tanto, la formación de nuevos complejos metálicos con ligandos polidentados bioactivos que contengan en su estructura heterociclos con átomos N- y S- dadores, como pueden ser las tiazolinas y tiazinas descritas previamente, puede ser una buena estrategia en la búsqueda de fármacos de Pd(II). Asimismo, en estudios previos se han descritos varios complejos de Pd(II) que contienen anillos de tiazolina, tiazina o pirazol con propiedades citotóxicas (Akhmetova et al., 2020; Dehand et al., 1975). Así, en trabajos anteriores realizados por nuestros grupos de investigación, se pudo comprobar que un complejo de Pd(II) basado en tiazolina disminuía la viabilidad celular, desencadenaba la apoptosis dependiente de caspasa-9 y provocaba daño oxidativo en el ADN de células leucémicas humanas HL-60, sin afectar a la viabilidad de leucocitos humanos recién aislados (Figura 1.18.) (Espino et al., 2020).

1. Introducción

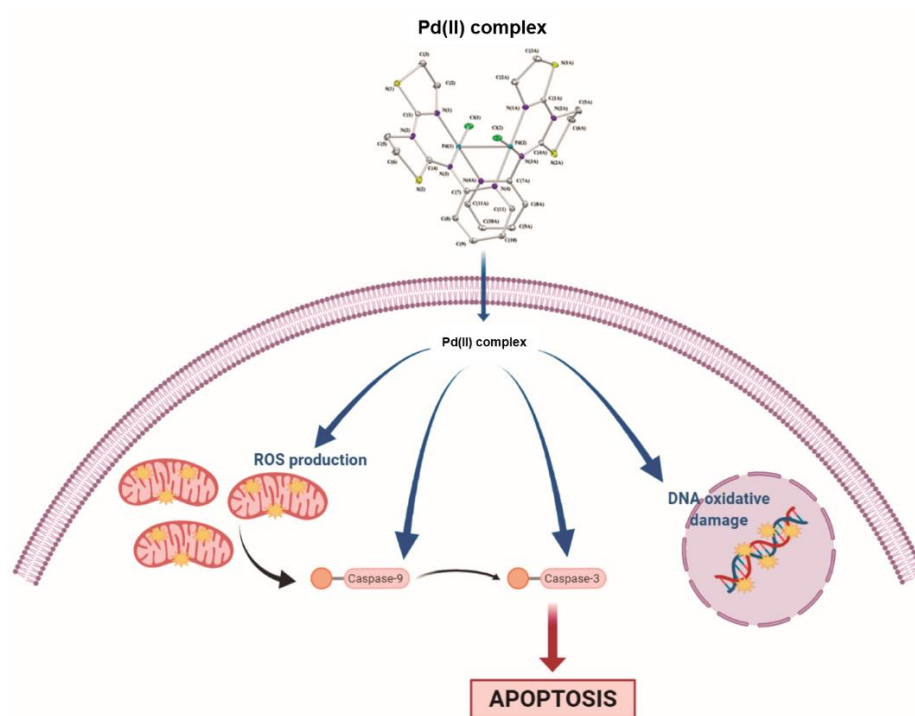


Figura 1.18. Diferentes mecanismos de acción de los complejos de Pd(II) (Espino et al., 2020).

1.4. Nanotecnología

Desde finales del siglo XX, se ha producido un crecimiento significativo en la nanotecnología y la nanociencia. En 1974, el profesor japonés Norio Taniguchi fue el primero en usar el término nanotecnología, aunque ya en 1959 el físico estadounidense Richard Feynman, conocido como el padre de la nanotecnología, mencionó en su discurso "There's Plenty of Room at the Bottom" las enormes posibilidades del uso de la nanotecnología y la nanociencia, que aún no han sido exploradas por completo. La nanociencia es el estudio de partículas en la escala nanométrica ($1 \cdot 10^{-9}$ m), mientras que la nanotecnología representa su aplicación en el uso práctico (Bayda et al., 2020).

El papel significativo que la nanotecnología ha adquirido en las últimas décadas se ha debido a la constante evolución científica en la búsqueda de soluciones más simples y avanzadas. Este rápido crecimiento del valor de los nanomateriales y de la aplicación de la nanotecnología se basa en cambios dinámicos y efectivos en la industria y uso adaptable de nanomateriales en el sector médico, farmacéutico, agricultura, industria alimentaria, construcción, cosmética, sector energético, electrónica, etc. (X. He et al., 2019; Laux et al., 2018).

1.4.1. Nanomedicina

La nanomedicina, en particular, es un área de investigación que combina la nanotecnología con las ciencias farmacéuticas y médicas. El diseño y estudio de nuevos fármacos, agentes de imagen y materiales a escala nanométrica, también conocidos como nanofármacos, son parte de esta nueva disciplina. El uso de estos sistemas nanoparticulados en medicina ha generado grandes expectativas porque podrían resolver muchos de los problemas de los tratamientos convencionales.

Las nanopartículas (NP) son una nueva categoría de portadores con un tamaño de partícula de 10-1000 nm (Arsalan & Younus, 2018), que les confiere propiedades físicas y químicas únicas, haciéndolos indispensables en diversos campos. Así, las NP se pueden emplear como sistemas de administración dirigidos a dianas específicas, capaces de transportar suficientes terapias a células específicas liberando el fármaco de forma controlada. Los nanomateriales más empleados en estas terapias son: liposomas, micelas poliméricas, nanotubos de carbono, dendrímeros, partículas inorgánicas y materiales a base de sílice (Figura 1.19.).

- Los liposomas son vesículas esféricas compuestas por un núcleo hidrófilo y una bicapa de fosfolípidos hidrófobos con una baja toxicidad intrínseca. Debido a esta composición, se dispersan de forma espontánea en medios acuosos, y permiten incorporar una gran carga de fármaco en su interior. De hecho, la FDA aprobó en 1995 el primer fármaco que contenía este tipo de nanopartículas con el nombre de Doxil[®] para el tratamiento del sarcoma de Kaposi, cáncer de ovario y de mama (Barenholz, 2012). Desde entonces, ha habido docenas de combinaciones de liposomas y nanopartículas lipídicas con una aprobación para terapias contra el cáncer. A pesar de ello, existen algunas dificultades debido a la baja lipofiliidad de algunos compuestos (Newman et al., 1999) o su baja estabilidad postfuncionalización ante la presencia de disolventes orgánicos (Castillo et al., 2017).
- Las NP poliméricas están constituidas por macromoléculas coloidales formadas por diferentes monómeros originando una nanoesfera o nanocapsula (Fereig et al., 2020). Se utilizan para la administración de fármacos que se encuentran dispersos en la matriz polimérica protegiéndolos del exterior. Esta protección de las moléculas cargadas conduce a un mayor tiempo de circulación sanguínea antes de

1. Introducción

su llegada a la diana terapéutica. Sin embargo, la encapsulación con fármacos como el CisPt es un proceso complicado debido a las diferencias de hidrofobicidad (Avgoustakis et al., 2002) y sitios de carga no deseados, mostrando una actividad menor que los correspondientes complejos de Pt(II) libres (Moreno et al., 2008).

- Por otro lado, los dendrímeros son macromoléculas poliméricas esféricas y ramificadas empleadas tanto en diagnóstico como en administración de fármacos debido a sus propiedades físicas y químicas estables (Gavas et al., 2021). Dichas estructuras se han funcionalizado con moléculas utilizadas en terapias antineoplásicas, como paclitaxel, 5-fluorouracilo y doxorubicina, mostrando un aumento de su actividad farmacológica (Dichwalkar et al., 2017; Mi et al., 2013; Zhong & Da Rocha, 2016). Sin embargo, la toxicidad de los diferentes dendrímeros constituye una limitación para sus aplicaciones en biomedicina (Aurelia Chis et al., 2020).
- La mayor parte de metales pueden sintetizarse como partículas inorgánicas, sin embargo, en nanomedicina las que más destacan son las NP de cobre y plata para aplicaciones antibacterianas, las NP de oro para transportar fármacos y fototérmicos, y las NP de magnetita para diagnóstico (Fereig et al., 2020). La formación de materiales híbridos o incluso combinaciones de la misma naturaleza es también una estrategia empleada en nanomedicina. Así, por ejemplo, NP de óxido de hierro se modificaron con dendrímeros y se cargaron con doxorubicina, combinando así quimioterapia magnética e hipertermia y consiguiendo inhibir la viabilidad de células HeLa (Nigam & Bahadur, 2017).
- Las NP de carbono se aplican en medicina en la encapsulación de fármacos debido a sus propiedades ópticas, mecánicas y electrónicas. Los nanotubos de carbono son unos de los más empleados y son utilizados como vehículo de fármacos, proteínas y ácidos nucleicos. Estos materiales mejoran la biodisponibilidad de los complejos metálicos como el CisPt provocando una liberación lenta a lo largo de días (Ajima et al., 2005; Almeida et al., 2024). Además, provocan una mayor entrada en las células comparada con los compuestos libres (Tripisciano et al., 2009). Sin embargo, todavía se encuentran en las primeras etapas de aplicabilidad.
- Finalmente, las NP mesoporosas de sílice (MSNs) se estudian hoy en día con fines biológicos como portadores de fármacos debido a sus propiedades

farmacocinéticas, siendo de las opciones más prometedoras de nanomaterial inorgánico.

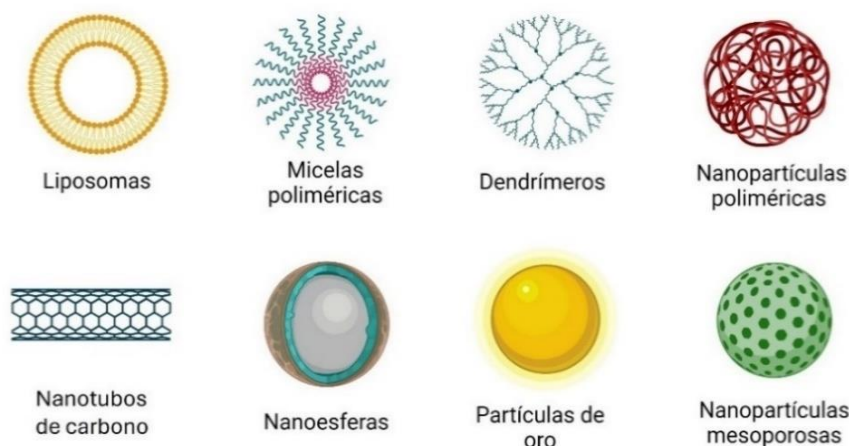


Figura 1.19. Nanopartículas más comúnmente utilizadas en sistemas de administración de fármacos. Creada con BioRender.

1.4.1.1. Nanopartículas mesoporosas de sílice (MSNs)

Las sílices mesoporosas se empezaron a investigar como posible opción terapéutica a finales de los años 2000 y, desde entonces, se han ido desarrollando y optimizando diferentes métodos sintéticos con el fin de estudiar la influencia de la naturaleza de la sílice, morfología, tamaño y distribución interna.

Las sílices mesoporosas son una forma del dióxido de silicio (SiO_2), natural o sintético, constituido por un material sólido poroso de un diámetro de 2-50 nm (Jafari et al., 2019). Las MSNs se sintetizan mediante un método dirigido por plantilla (Cai et al., 1999) en presencia de un tensioactivo que se ensambla generando una estructura supramolecular que actúa como molde director de estructura obteniendo nanopartículas con un ordenamiento interno (Figura 1.20.) (Nam et al., 2018). Las MSNs más comunes son el MCM-41 hexagonal 2D y el SBA-15 cúbico 3D que muestran una variedad de tamaños de poro (2-10 nm) (Yang et al., 2012), con una gran superficie y volumen para la adsorción y carga de fármacos dentro de los canales de poros. Una buena estructura mesoporosa y tamaño de poro ajustable permiten un mejor control de la cinética de carga y liberación de fármacos. Además, la sílice está generalmente reconocida como segura por la FDA cuando se utiliza en estudios *in vitro* o *in vivo* (Chen et al., 2013; Li et al.,

1. Introducción

2019) y las evaluaciones de bioseguridad in vivo sobre citotoxicidad, biodegradación, biodistribución y excreción han arrojado resultados satisfactorios (Bruckmann et al., 2022; Wang et al., 2015). Por lo tanto, todas estas características postulan a las MSN como buenos candidatos para transportar fármacos.

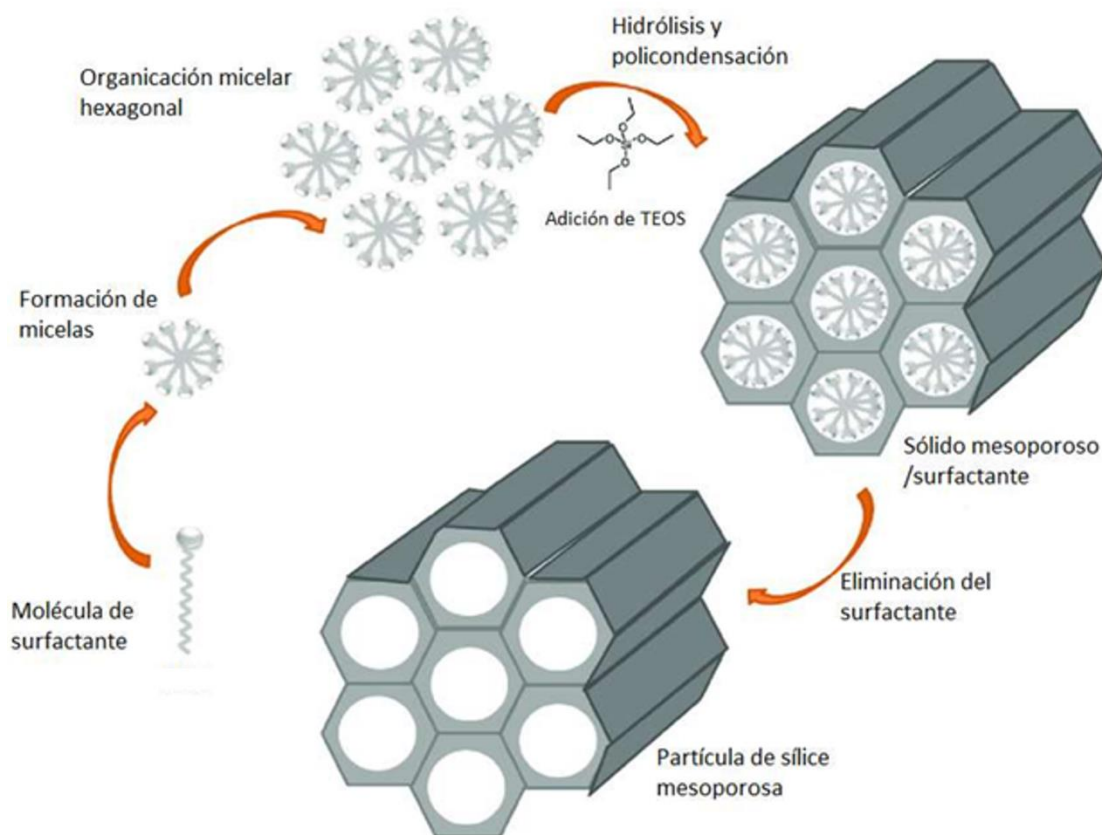


Figura 1.20. Formación de materiales mesoporosos de sílice a partir de un surfactante como agente director (Nam et al., 2018) . TEOS: Ortosilicato de tetraetilo de sílice.

a) Sistemas de liberación de fármacos

Los sistemas de liberación de fármacos (DDS) permiten controlar el momento y la zona de liberación del principio activo suministrado de manera óptima. Para que un nuevo nanomaterial sea candidato para su empleo como DDS debe ser biocompatible y biodegradable y, además, debe tener una gran capacidad de funcionalización/carga y no producir una liberación precoz. En este contexto, existen varias formas de incorporación de complejos metálicos en materiales nanoestructurados para obtener sistemas de liberación de fármacos (J. Gupta et al., 2023). La más común es la preparación de sistemas "clásicos", que consiste en una simple adsorción del complejo en los poros de la sílice

(Kankala et al., 2019). Esta forma clásica de carga mejora la cantidad de carga en el nanomaterial; sin embargo, requiere de "compuertas" para controlar que la liberación del fármaco no se produzca antes de lo deseado (Méndez et al., 2012; Siddiqui et al., 2022). Este tipo de sistemas emplea diferentes estrategias mediante un fenómeno estímulo-respuesta, ya sea a través de estímulos internos (pH, temperatura, estados redox o reacciones enzimáticas) o externos (radiación, campos magnéticos o ultrasonidos). Por otro lado, un enfoque alternativo para la incorporación de complejos metálicos en la sílice es el uso de la unión covalente con la nanoestructura de sílice. Estos sistemas denominados "no clásicos" no requieren una liberación de la carga citotóxica, sino que pueden actuar directamente en el interior de la célula debido a la internalización y acumulación en la zona afectada (Ovejero-Paredes et al., 2022). Mediante este procedimiento de funcionalización covalente es posible la incorporación de otras moléculas de interés, por ejemplo, una molécula diana para aumentar la selectividad de los sistemas diseñados (Colilla & Vallet-Regí, 2020; Gisbert-Garzarán et al., 2020; Torabi et al., 2023). Asimismo, sistemas basados en sílice funcionalizada con proteínas (Díaz-García et al., 2021; Song et al., 2019), vitaminas (Mai et al., 2017; Ugalde-Arbizu et al., 2023) o azúcares (Niemelä et al., 2015; Sodagar Taleghani et al., 2019) se han preparado y han demostrado aumentar su actividad citotóxica debido principalmente a una mayor acumulación en la zona diana en comparación con aquellos sistemas que no tienen la molécula diana.

b) MSN funcionalizadas con complejos de Pt(II) y Pd(II)

Son muchos los sistemas de administración utilizados en el transporte de complejos metálicos, como vesículas poliméricas o dendrímeros (Castillo et al., 2017); sin embargo, el uso de MSNs como sistemas de administración de fármacos está ganando terreno por su versatilidad. La incorporación de complejos metálicos en este tipo de sistemas nanoparticulados permite solventar muchos de los inconvenientes asociados al uso de complejos metálicos libres, mejorando su biodisponibilidad.

El carboplatino fue uno de los primeros compuestos empleados para ser adsorbido en disolución acuosa sobre nanomateriales de sílice, aunque se comprobó que la cantidad de carboplatino adsorbida para estas NP era baja en comparación con la cantidad adsorbida de otros fármacos (Di Pasqua et al., 2009). Debido a esto, y con el

1. Introducción

objetivo de aumentar la cantidad de metalofármaco adsorbido sobre estos materiales, se ha desarrollado otra estrategia para fijar la carga de las NP de forma más efectiva y en mayor cantidad. Esta consiste en funcionalizar la superficie de las MSNs con silanos, como por ejemplo el 3-mercaptopropiltrietoxisilano, lo que permite la interacción tanto física como química entre grupos funcionales presentes en dichos silanos y las moléculas del fármaco, consiguiéndose así mejorar la incorporación de los metalofármacos en las NP (Díaz-García et al., 2023; Galabova, 2021).

Además, los silanos utilizados para funcionalizar la superficie de las MSN pueden ser modificados para que presenten grupos dicarboxílicos que puedan actuar como ligandos bidentados (Figura 1.21.A) uniéndose, por ejemplo, a especies activas de Pt(II) derivados del oxaliplatino, como el bis(nitrato)(1,2-diamminodiclorohexano)platino(II). De esta manera, se obtienen MSNs funcionalizadas con esta especie activada de oxaliplatino mostrando una citotoxicidad y captación intracelular mejorada en relación con el oxaliplatino libre (Figura 1.21.B) (H. He et al., 2014).

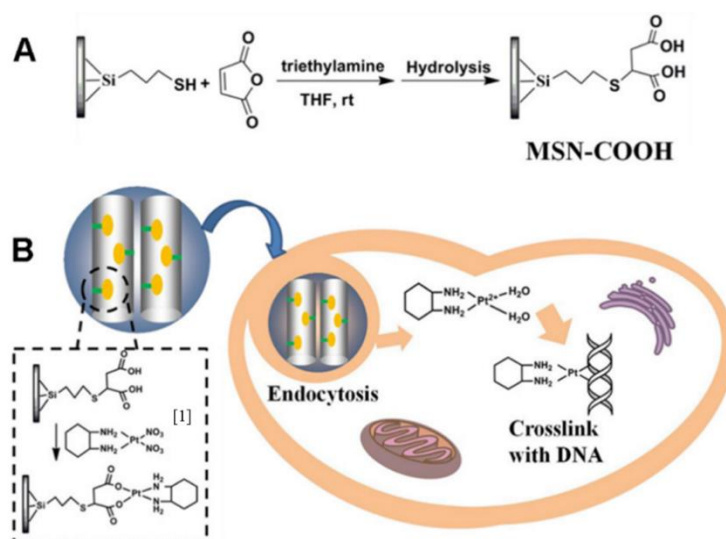


Figura 1.21. Nanopartículas mesoporosas de sílice (MSNs) funcionalizadas con las especies activas de oxaliplatino. (A) Modificación de grupos carboxilo 1,2-bidentados en las MSNs; (B) MSN funcionalizadas con la especie activa y liberación intracelular del fármaco de Pt. [1] bis(nitrato)(1,2-diamminodiclorohexano)platino(II). (H. He et al., 2014).

Por otro lado, el uso de MSNs como sistemas de administración de complejos de Pd(II) como fármacos se encuentra en estadios iniciales. No obstante, se ha estudiado algún compuesto in vitro frente a células cancerosas como el [PdCl₂(cod)] (cod = 1,5-

ciclooctadieno) observándose una citotoxicidad dosis dependiente en todas las líneas tumorales, por lo que se han postulado como potenciales tratamientos terapéuticos (Balbín et al., 2014). Sin embargo, es necesario realizar más estudios sobre los aspectos mecanísticos de la inducción de la muerte celular promovida por estas NP.

Por último, cabe mencionar que los materiales de sílice funcionalizados con compuestos metálicos pueden ofrecer una protección a dichos complejos frente a ataques nucleofílicos por parte del agua u otras moléculas. Esto es consecuencia de la unión de las MSNs con los compuestos de coordinación con actividad biológica que bloquea los ligandos lábiles frente a procesos de solvólisis o sustitución confiriendo al compuesto una vida media de reacción considerablemente elevada, lo que aumenta su eficacia terapéutica con una dosis menor del compuesto bioactivo (Díaz-García et al., 2023; Kankala et al., 2019).

1.5. Melatonina

La melatonina, también conocida como N-acetil-5-metoxitriptamina, fue aislada e identificada por primera vez en 1958 por Lerner y colaboradores en el tejido de la glándula pineal bovina (Reiter, 1993). La melatonina es un indol de bajo peso molecular presente de manera ubicua en todos los organismos vivos. A pesar de tener una estructura simple, es una molécula pleiotrópica con importantes funciones biológicas desde bacterias hasta mamíferos (Hardeland et al., 2011). A este respecto, se trata de una hormona que regula el ciclo de sueño-vigilia (Arendt & Skene, 2005), tiene propiedades antioxidantes y puede ayudar a proteger a los organismos del estrés oxidativo al reaccionar con ERO y especies reactivas de nitrógeno (ERN) (Reiter et al., 2010).

1.5.1. Estructura y síntesis

La melatonina es una indolamina cuyos dos grupos funcionales son cruciales para la especificidad de la unión al receptor (Figura 1.22.). Además, su naturaleza anfipática y química de oxidación permiten que la molécula entre en cualquier célula, compartimento o fluido del cuerpo (Poeggeler et al., 2002). Este indol pineal es sintetizado y secretado principalmente por la glándula pineal siguiendo un patrón circadiano (Hardeland et al., 2012).

1. Introducción

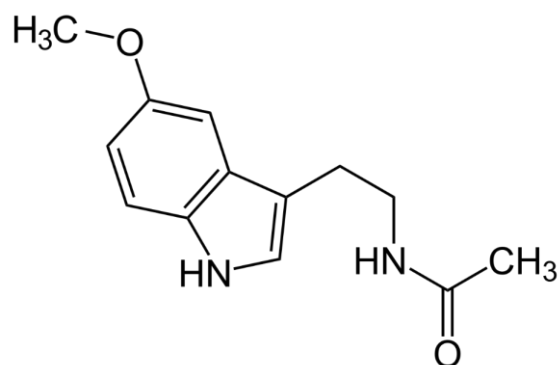


Figura 1.22. Estructura química de la melatonina.

La biosíntesis de melatonina (Figura 1.23.) comienza con la captación de su precursor, el aminoácido esencial L-triptófano, que es tomado de la sangre por los pinealocitos. A continuación, el triptófano se transforma en 5-hidroxitriptófano mediante una hidroxilación. Posteriormente, el 5-hidroxitriptófano es descarboxilado para producir serotonina. Los niveles de serotonina en la glándula pineal, que son de manera general mucho mayores que en el resto del cerebro, son especialmente elevados durante el día, y caen marcadamente durante la noche como consecuencia de su conversión a melatonina. Esta conversión nocturna implica un proceso enzimático de dos pasos, en el cual, la serotonina se transforma en N-acetilserotonina (NAS), y posteriormente, tras una metilación, se convierte en N-acetil-5-metoxitriptamina, más comúnmente conocida como melatonina.

En cuanto a la farmacocinética, la melatonina tiene una cinética lineal. Su absorción es rápida y alcanza el pico de dosis a los 40 minutos. Más del 60% de la melatonina circulante se metaboliza en el hígado. En primer lugar, es catabolizada en 6-hidroximelatonina y excretada por la orina en forma de sulfatos y, en menor medida, ácido glucurónico. Otra vía metabólica importante es la formación de la N-acetil-N-formil-5-metoxi-quinurenamina (AFMK) y N-acetil-5-metoxi-quinurenamina (AMK). Estos metabolitos de la melatonina son farmacológicamente activos y pueden inducir actividad de muerte celular por apoptosis. Asimismo, un 25% de la melatonina se excreta sin cambios (Boutin et al., 2005; Poza et al., 2022).

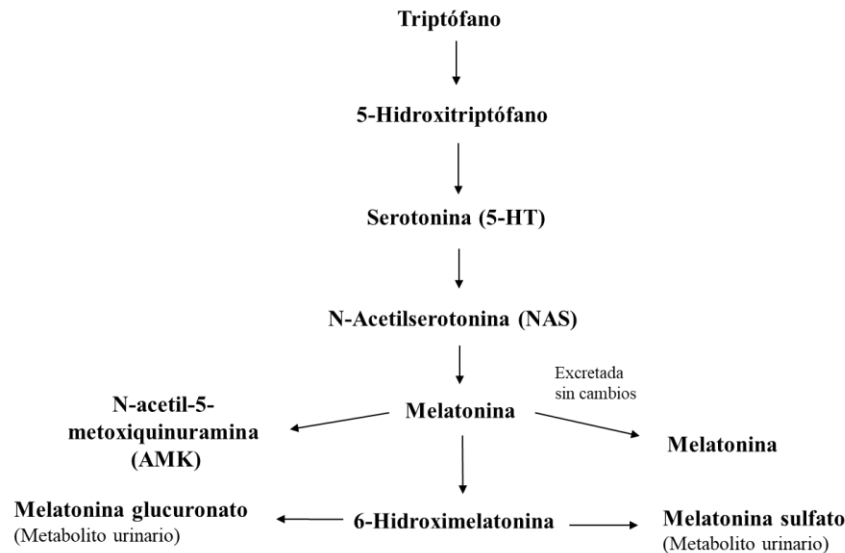


Figura 1.23. Ruta biosintética de la melatonina a partir del aminoácido triptófano.

La melatonina no se almacena en el lugar de síntesis, sino que se secreta directamente tanto al líquido cefalorraquídeo como al torrente sanguíneo por difusión pasiva (Reiter et al., 2010).

1.5.2. Mecanismo de acción

Muchas investigaciones han destacado la capacidad de la melatonina en la regulación de procesos fisiológicos y bioquímicos (Pandi-Perumal et al., 2006). Parece que algunas de estas acciones dependen de la potente capacidad antioxidante y sequestradora de radicales libres de la melatonina. Sin embargo, la melatonina también puede actuar en mamíferos mediante la interacción con proteínas intracelulares, como la calmodulina, o mediante la unión a receptores específicos. Por lo tanto, la melatonina tiene mecanismos de acción múltiples actuando sobre receptores de membrana (MT1 y MT2), receptores nucleares (ROR/RZR), proteínas citosólicas dependientes de calcio (calmodulina, calreticulina), y la mitocondria, manteniendo la homeostasis mitocondrial y depurando radicales libres allí donde se produzcan.

Los receptores de membrana (MT1 y MT2) pertenecen a la familia de receptores acoplados a proteína G (Dubocovich & Markowska, 2005; Reppert et al., 1994, 1995). Estos receptores metabotrópicos constituidos por siete dominios transmembrana comparten el 55% de la similitud de secuencia de aminoácidos y se unen a la melatonina con alta afinidad (Kinker et al., 2021). La activación de los receptores MT1 por la

1. Introducción

melatonina conduce a diferentes respuestas, la mayoría de ellas dependientes de la inhibición del adenosín monofosfato cíclico (AMPc) a través de las proteínas G, y mediante aumentos del calcio citosólico. La unión de la melatonina a los receptores MT2 conduce a la inhibición del nucleótido guanosín monofosfato cíclico (GMPc) y AMPc en menor medida. Tanto los receptores MT1 como MT2 pueden acoplarse también a vías dependientes de la fosfolipasa C (PLC) (Acuña-Castroviejo et al., 2014; Kinker et al., 2021; J. Liu et al., 2016). Estos receptores de melatonina pueden influir en la patología del cáncer modulando el efecto oncostático de la melatonina en modelos de cáncer de mama, próstata (J. Liu et al., 2016) glioma y meduloblastoma humanos (Kinker et al., 2021), entre otros.

Además de los receptores de membrana mencionados anteriormente, existe un tercer sitio de unión de melatonina, anteriormente conocido como MT3, que ha sido identificado como una quinasa reductasa 2, con un perfil farmacológico distinto a MT1 y MT2 (Boutin & Ferry, 2019). Este sitio de unión presenta una afinidad "baja" por la melatonina (rango nanomolar) y una rápida cinética de asociación/disociación. Aunque se cree que dicho receptor interviene en los procesos de toxicación y detoxificación, aún se desconoce su papel fisiológico (Boutin & Ferry, 2019; Jockers et al., 2008).

Existen también otras dianas que fueron identificadas como receptores nucleares hormonales, llamados RZR/ROR. Estos receptores son mediadores de la señalización nuclear de la melatonina y se pueden distinguir tres subtipos: RZR/ROR α , RZR/ROR β y ROR γ . Estudios previos han constatado que tienen la capacidad de controlar varios procesos fisiológicos y patológicos, como la respuesta inmunológica y el estrés oxidativo (Ding et al., 2019; Farez et al., 2016; Y. Zhang et al., 2022).

Por otro lado, la melatonina posee acciones que no dependen de la interacción con sus receptores debido a su capacidad antioxidante y como secuestrador de radicales libres (Espino et al., 2010a; Espino et al., 2011b; Espino et al., 2010b). Su estructura indólica y un potencial redox elevado hacen que la melatonina ceda electrones fácilmente y actúe como un potente agente reductor. Tras la interacción de la melatonina con el radical $\cdot\text{OH}$ o el anión superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), estos radicales libres de oxígeno se eliminan, y la melatonina se transforma en otros metabolitos como son las quinurenaminas AFMK y AMK. Ambos metabolitos, AFMK y AMK, son, a su vez, antioxidantes potentes y constituyen, junto a la melatonina, la denominada cascada antioxidante que puede depurar hasta cuatro ERO. Asimismo, la melatonina también es capaz de depurar ERN tales como

el anión peroxinitrito (ONOO⁻). Junto con sus propiedades secuestradoras de radicales libres, la melatonina protege las mitocondrias contra el estrés oxidativo al influir en el potencial de la membrana mitocondrial, facilitando así los procesos antioxidantes de transferencia de electrones dentro de la célula (Tan et al., 2016). Además, la melatonina actúa indirectamente como antioxidante regulando la actividad de enzimas como la glutatión peroxidasa (GPx), la glutatión reductasa (GRd), la superóxido dismutasa (SOD) y la catalasa (CAT), manteniendo unos niveles adecuados de GSH dentro de la célula y la mitocondria.

Cada vez hay más pruebas que respaldan el efecto antiinflamatorio de la melatonina en los procesos inflamatorios tanto agudos como crónicos (Carrasco et al., 2013; Carrasco, et al., 2014a; Carrasco et al., 2014b). Mediante la inducción de sepsis (proceso pro-inflamatorio que conduce a una disfunción orgánica) en modelos murinos a través de lipopolisacáridos, la melatonina ha demostrado una disminución de la respuesta inflamatoria (J. Zhang et al., 2020), una reducción de las citocinas proinflamatorias interleucina-1 β (IL-1 β) y TNF- α (Carrillo-Vico et al., 2005; Shang et al., 2009), así como un aumento en los niveles de la citocina antiinflamatoria IL-4 en suero (Carrasco et al., 2013; El-Shenawy et al., 2002).

Por otro lado, los mecanismos de acción de la melatonina pueden ser mediados por la interacción de ésta con proteínas intracelulares, como la calmodulina. La alta afinidad de unión de la melatonina a la calmodulina sugiere que la hormona es capaz de modular la actividad celular uniéndose intracelularmente a la calmodulina en rangos fisiológicos (Benítez-King et al., 1993). Mediante este mecanismo, la melatonina puede inhibir in vivo la actividad de la calmodulina quinasa II (Fukunaga et al., 2002) y de la óxido nítrico sintasa neuronal (nNOS) relacionándolo con un efecto antiexcitotóxico y anticonvulsionante (León et al., 2000).

1.5.3. Otros indoles hormonales

Como ya hemos descrito anteriormente, la melatonina puede dar lugar a una cascada oxidativa depurando ERO o ERN, y transformarse en otros metabolitos activos. Además, la glándula pineal produce otras hormonas polipeptídicas e indolaminas que pueden llegar a tener un interés terapéutico y prometedor como la 5-metoxitriptamina (5-MT).

1. Introducción

La 5-MT, también conocida como mexamina, es un derivado de la triptamina estrechamente relacionado con la serotonina y la melatonina (Figura 1.24.) (Galzin et al., 1988). Se ha demostrado que la 5-MT se produce naturalmente en animales en bajos niveles (Beck et al., 1982) y se biosintetiza a través de la monoaminoxidasa A, responsable de la desaminación oxidativa de la 5-MT en la glándula pineal (Galzin et al., 1988; Raynaud & Pévet, 1991). La 5-MT actúa como un agonista total en diversos receptores de serotonina (Boess et al., 1997; P. H. Wu et al., 1988; Yamada et al., 1997) y parece seguir un ritmo biológico del mismo tipo que la serotonina, ya que los niveles máximos de este metabolito se producen por el día (en fase opuesta a la melatonina) (Galzin et al., 1988).

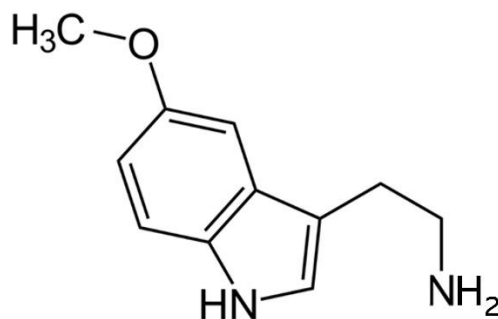


Figura 1.24. Estructura química de la 5-metoxitriptamina.

Este indol pineal puede mostrar propiedades anticancerígenas teniendo, al igual que la melatonina, una variedad de funciones, incluyendo la eliminación de radicales libres y la inducción de mecanismos de protección/repación en las células (Kleszczyński et al., 2018). Además, se ha comprobado que la 5-MT puede ejercer, en dosis bajas, el mismo efecto terapéutico anticancerígeno en combinación con la quimioterapia que puede obtenerse mediante dosis farmacológicas de melatonina (Lissoni, 2007). Asimismo, en pacientes con cáncer metastásico, la combinación de 5-MT con melatonina indujo una estabilización del 29% de la enfermedad (Lissoni et al., 2012) y, además, redujo algunos efectos secundarios relacionados con la quimioterapia, como la trombocitopenia y la neurotoxicidad (Lissoni, 2007; Lissoni et al., 2003).

1.5.4. Efecto coadyuvante de la melatonina en el cáncer

Durante las últimas décadas, se ha examinado el potencial antitumoral de la melatonina. Esta neurohormona se considera un agente anticancerígeno debido a sus acciones antiproliferativas, antimigratorias y/o pro-apoptóticas contra varios tipos de cáncer, especialmente en tumores de mama hormono-dependientes (Reiter et al., 2017). La melatonina aplica sus capacidades anticancerígenas a través de múltiples mecanismos, incluyendo la promoción de la apoptosis y/o autofagia, la modulación de la angiogénesis (Mehrzadi et al., 2021) y la inducción selectiva de estrés oxidativo debido a sus efectos prooxidantes en las células cancerígenas (Petroněk et al., 2021; H. M. Zhang & Zhang, 2014).

Cabe destacar que hay varios aspectos de la investigación sobre la melatonina en el tratamiento del cáncer que podrían tener aplicaciones clínicas inmediatas. Por ejemplo, muchos estudios han demostrado que la melatonina administrada junto con fármacos convencionales (por ejemplo, CisPt, 5-fluorouracilo y doxorrubicina) aumenta la sensibilidad de los cánceres (por ejemplo, colorrectal, cervical y pancreático) a la inducción de la muerte celular (González-González et al., 2020; Jadid et al., 2021; Pariente et al., 2016, 2017, 2018; Uguz et al., 2012). La melatonina también es capaz de interferir con la metástasis tumoral en una variedad de cánceres mediante el empleo de múltiples mecanismos, como la transición epitelio-mesénquima, la reorganización del citoesqueleto y la remodelación de la matriz extracelular (Su et al., 2017). Además, la indolamina hace que los tumores malignos resistentes al tratamiento se vuelvan susceptibles tanto a la terapia endocrina como a la quimioterapia (Dauchy et al., 2014; Xiang et al., 2015).

Por otro lado, la capacidad de la melatonina para reducir los efectos secundarios de las terapias contra el cáncer también merece una mayor atención, ya que se ha demostrado que la indolamina mitiga el daño celular en numerosos paradigmas experimentales, como por ejemplo, la mucositis oral debida a la radiación ionizante (Ortiz et al., 2015) o la toxicidad cardio-hepática y renal de diferentes fármacos (Kilic et al., 2013). Por lo tanto, cada vez hay más pruebas que sugieren la conveniencia de utilizar la melatonina como terapia adyuvante para el tratamiento del cáncer, lo que superaría con creces las mejoras en el bienestar de los pacientes.

2. JUSTIFICACION Y OBJETIVOS

2. *Justificación y objetivos*

La apoptosis, o PCD, es un mecanismo fisiológico regulado genéticamente a través del cual se produce la eliminación ordenada de las células dañadas de los tejidos sin inducir daños colaterales a las células circundantes. Este modo de muerte celular es un mecanismo primordial para mantener un equilibrio homeostático entre el número de nuevas células que se generan y el número de células dañadas o no requeridas que se eliminan del cuerpo. Por lo tanto, una alteración o proliferación celular incontrolada puede conducir a situaciones patológicas como el cáncer que pueden resultar en la muerte del organismo (D'Arcy, 2019; Plati et al., 2011).

La quimioterapia es una de las modalidades terapéuticas más empleadas en el tratamiento del cáncer, y engloba a una gran variedad de fármacos. Tiene como objetivo eliminar las células que componen el tumor, con el fin de lograr la regresión del mismo. La mayoría de las terapias antitumorales basadas en metales, como el caso del CisPt, juegan un papel fundamental en el tratamiento clínico de muchos tipos de cáncer, como el cáncer de testículo, con tasas de éxito del tratamiento que oscilan entre el 70% y el 90%. El CisPt también es eficaz contra el cáncer de ovario, carcinoma de cuello uterino, cáncer de pulmón, osteosarcoma y neuroblastoma, entre otros. Actualmente, este compuesto también se usa en combinación con otros fármacos para el tratamiento del melanoma y el cáncer de mama (Dasari & Bernard Tchounwou, 2014; Florea & Büsselberg, 2011; Pariente et al., 2016). Sin embargo, el uso del CisPt está limitado por la resistencia intrínseca o adquirida de varios tipos de cáncer, así como por sus efectos secundarios, que incluyen nefrotoxicidad, náuseas y vómitos. Aunque algunos problemas se reducen al combinar el CisPt con otros fármacos, los problemas de neurotoxicidad persisten (Makovec, 2019).

Con el objetivo de superar los efectos secundarios no deseados de la terapia con CisPt, en los últimos años se han sintetizado metaloides de Pt(II) con estructura similar. Una de las estrategias que se viene siguiendo y de las más utilizadas para el desarrollo de fármacos anticancerígenos de Pt(II) es la coordinación de ligandos bioactivos o potencialmente bioactivos con metales de transición, ya que influyen en sus propiedades químicas y biológicas (Chiang et al., 2012). Entre estos ligandos bioactivos existen moléculas con actividad anticancerígena y citotóxica en diferentes líneas tumorales que se han encontrado en productos naturales que contienen en su estructura heterociclos como las tiazolinas, tiazinas o pirazoles (Alsharif & Alam, 2017; Faria et al., 2017; Keter & Darkwa, 2012). Por lo tanto, la combinación de estos ligandos potencialmente

bioactivos con metales de transición podría ser una alternativa para el desarrollo de fármacos contra el cáncer.

Actualmente, se conoce que el desarrollo de la nanotecnología está directamente ligada a la investigación en liberación de fármacos, más concretamente, a la búsqueda de sistemas basados en NP con una elevada capacidad de funcionalización (X. He et al., 2019; Laux et al., 2018). Los nanomateriales más empleados en estas terapias suelen ser los liposomas, micelas poliméricas, nanotubos de carbono, dendrímeros y partículas inorgánicas, entre otras. Sin embargo, las MSNs han ido ganando terreno debido a sus propiedades farmacocinéticas (biodegradabilidad adecuada, biocompatibilidad, alta carga de fármaco y estabilidad química y mecánica) siendo una de las opciones más prometedoras (Bruckmann et al., 2022; Wang et al., 2015).

La melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) es un indol de bajo peso molecular presente de manera ubicua en todos los organismos, siendo el principal producto secretor de la glándula pineal. Además, dicha glándula produce otras hormonas polipeptídicas e indolaminas que pueden llegar a tener un interés terapéutico prometedor. La melatonina es una molécula pleiotrópica y coordina múltiples funciones corporales (Hardeland et al., 2011). El interés por la melatonina ha crecido enormemente debido a su influencia sobre el proceso apoptótico en células tumorales. En este sentido, varios estudios han informado que la melatonina puede ser un candidato excelente como agente anticancerígeno o como terapia combinada debido a su actividad antiproliferativa, antimigratoria y/o proapoptótica contra varios tipos de cáncer, como el gástrico, de mama, de cuello uterino y de próstata, entre otros (González-González et al., 2020; Jadid et al., 2021; Pariente et al., 2016, 2017, 2018; Uguz et al., 2012). Además, la capacidad de la melatonina para reducir los efectos secundarios de las terapias contra el cáncer también merece una mayor atención, ya que se ha demostrado que la indolamina mitiga el daño celular en numerosos paradigmas experimentales (Kilic et al., 2013; Ortiz et al., 2015).

2. Justificación y objetivos

Teniendo en cuenta la literatura revisada, el **Objetivo General** de la presente Tesis Doctoral es estudiar el efecto coadyuvante de la melatonina en la actividad quimioterapéutica de complejos metálicos derivados de CisPt. Para ello, se han utilizado células procedentes tanto de tumores sólidos (líneas celulares de cáncer cervicouterino humano HeLa y de cáncer de mama humano MDA-MB-231), como de tumores hematológicos (línea celular de leucemia promielocítica aguda humana HL-60).

Este Objetivo General ha sido desglosado en los siguientes **Objetivos Específicos**:

1. Evaluar el efecto potencial de la melatonina como coadyuvante sobre la capacidad citotóxica de complejos de Pt(II) con ligandos bidentados derivados de heterociclos S,N y pirazol frente a la línea celular MDA-MB-231.
2. Estudiar el papel modulador de un derivado de melatonina (5-MT) sobre la actividad citotóxica y pro-apoptótica de nanopartículas de sílice mesoporosas funcionalizadas con dos complejos metálicos derivados de Pt(II) y Pd(II) en la línea celular HeLa.
3. Realizar la síntesis y caracterización estructural de complejos derivados de CisPt con aminas primarias del tipo $[PtCl_2(NH_3)(NH_2R)]$ comprobando la capacidad de la melatonina para potenciar la actividad citotóxica de estos compuestos sobre las líneas celulares HeLa, HL-60 y MDA-MB-231.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Lista de reactivos

Los reactivos empleados en el desarrollo de los experimentos descritos en este apartado se muestran a continuación, agrupados según la función que presentan.

3.1.1. Líneas celulares y medios de cultivo

- Factor de crecimiento epidérmico (EGF; Sigma Aldrich; Madrid, España).
- Hidrocortisona (Sigma Aldrich; Madrid, España).
- Insulina (Sigma Aldrich; Madrid, España).
- L-glutamina (ThermoFisher Scientific; Barcelona, España).
- Línea celular de adenocarcinoma epitelial de cuello uterino humano (HeLa; European Collection of Authenticated Cell Cultures [ECACC], Dorset, Reino Unido).
- Línea celular de adenocarcinoma epitelial de mama humano (MDA-MB-231; [ECACC], Dorset, Reino Unido).
- Línea celular de epitelio mamario humano (MCF10A; American Type Culture Collection, [ATCC]; Barcelona, España).
- Línea celular de leucemia promielocítica humana (HL-60; [ECACC], Dorset, Reino Unido).
- Medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM; ThermoFisher Scientific; Barcelona, España).
- DMEM F-12 (ThermoFisher Scientific; Barcelona, España).
- Medio Roswell Park Memorial Institute-1640 (RPMI-1640; ThermoFisher Scientific; Barcelona, España).
- Penicilina/Estreptomicina (ThermoFisher Scientific; Barcelona, España).
- Suero bovino fetal (FBS; ThermoFisher Scientific; Barcelona, España).
- Suero de caballo (ThermoFisher Scientific; Barcelona, España).
- Toxina del cólera (Sigma Aldrich; Madrid, España).

3.1.2. Fluoróforos

- 2',7'-Diclorodihidrofluoresceína diacetato (DCFH; Life Technologies, Barcelona, España).
- Anexina V conjugada con isotiocianato de fluoresceína (FITC), kit de detección de apoptosis (eBioscience Dx; Barcelona, España).
- Caspase-9 staining, kit de detección (Abnova; Barcelona, España).
- Hoechst 33258 (Sigma Aldrich S.A.; Madrid, España).
- Kit de caspasa-3 con fluoresceína CaspGLOW™ (Sigma Aldrich S.A.; Madrid, España).

3.1.3. Reactivos químicos de síntesis

- 2-Cloropropilisocianato 99% (2-CIEtNCS; abcr GmbH; Karlsruhe, Alemania).
- 3-Cloropropilisocianato 98% (3-CIEtNCS; abcr GmbH; Karlsruhe, Alemania).
- 3,4-Dicloroanilina 98% (Sigma Aldrich; Darmstadt, Alemania).
- 3,5-Difenilpirazol 98% (Sigma Aldrich; Darmstadt, Alemania).
- Carbón activo (Scharlab. S.L; Barcelona, España).
- Cloruro de potasio 99,5% (KCl; Panreac Química S.L.U; Barcelona, España).
- Cloruro de sodio 99,8% (NaCl; Labkem; Barcelona, España).
- Cloruro de tetraetilamonio 98% (Et₄NCl; ThermoFisher Scientific; Barcelona, España).
- Hidruro de sodio 60% (HNa; Sigma Aldrich; Darmstadt, Alemania).
- Intercambiador de iones Dowex 50W-X8H⁺ (Aldrich Chemical Co. Ltd; Gillinham Dorset, Reino Unido).
- Nitrato de plata 99,9% (AgNO₃; Panreac Química S.L.U; Barcelona, España).
- Pirazol 98% (Sigma Aldrich; Darmstadt, Alemania).
- Sulfato de plata 99,5% (Ag₂SO₄; Panreac Química S.L.U; Barcelona, España).
- Sulfato de sodio anhidro ACS (Na₂SO₄; Scharlab. S.L; Barcelona, España).
- Tetracloropaladato de sodio(II) 99,5% (Na₂[PdCl₄]; abcr GmbH; Karlsruhe, Alemania).
- Tetracloroplatinato de potasio(II) 99,5% (K₂[PtCl₄]; abcr GmbH; Karlsruhe, Alemania).

3. *Materiales y Métodos*

- Trietilamina 99% (abcr GmbH; Karlsruhe, Alemania).
- Yoduro de potasio 99% (KI; Labkem; Barcelona, España).
- Yoduro de sodio 99,5% (NaI; Labkem; Barcelona, España).

3.1.4. **Disolventes**

- Acetato de etilo (Scharlab. S.L; Barcelona, España).
- Acetona (Scharlab. S.L; Barcelona, España).
- Acetonitrilo (Scharlab. S.L; Barcelona, España).
- Cloroformo (Scharlab. S.L; Barcelona, España).
- Diclorometano (Scharlab. S.L; Barcelona, España).
- Dimetilacetamida (DMAc; Aldrich Chemical Co. Ltd; Gillinham Dorset, Reino Unido).
- Dimetilformamida (DMF; Sigma Aldrich; Madrid, España).
- Dimetilsulfóxido (DMSO; Sigma Aldrich; Madrid, España).
- Etanol absoluto (EtOH; Scharlab. S.L; Barcelona, España).
- Etanol 96% (EtOH; Scharlab. S.L; Barcelona, España).
- Éter dietílico (Scharlab. S.L; Barcelona, España).
- Hexano (Scharlab. S.L; Barcelona, España).
- Metanol (MeOH; Scharlab. S.L; Barcelona, España).
- Tolueno (Scharlab. S.L; Barcelona, España).

3.1.5. **Otros reactivos**

- Azul de tripano 0,4% (Sigma Aldrich, Madrid, España).
- CellTiter 96 AQueous One Solution (Promega, Madrid, España).
- Cisplatino (CisPt; Sigma Aldrich; Madrid, España).
- Cristal violeta (Sigma Aldrich; Madrid, España).
- Deoxicolato de sodio (Panreac Química S.L.U; Barcelona, España).
- Dodecilsulfato sódico (SDS; (Sigma Aldrich; Madrid, España).
- Melatonina (Sigma Aldrich; Madrid, España).
- RNasa A (Life Technologies, Barcelona, España).
- Tampón fosfato salino (PBS; Gibco, Barcelona, España).

- Tripsina 1X (Life Technologies, Barcelona, España).
- Tripsina 10X (Life Technologies, Barcelona, España).
- Tris-HCl (Panreac Química S.L.U; Barcelona, España).
- Triton-X-100 (Sigma Aldrich; Madrid, España).
- Yoduro de propidio (PI; ThermoFisher Scientific, Barcelona, España).

Además de los reactivos especificados en estos apartados, se ha utilizado el material habitual en trabajos de este tipo disponible en los laboratorios de Fisiología Animal y de Química Inorgánica de la Universidad de Extremadura.

3.2. Preparación y caracterización de complejos de Pt(II) y Pd(II)

La síntesis de los complejos PtPzTz, PtDPhPzTz, PtPzTn, PtDPhPzTn (3.2.3.1.) y sus ligandos (3.2.2.1.; 3.2.2.2.) se ha llevado a cabo siguiendo el procedimiento de síntesis establecido en una Tesis Doctoral realizada recientemente en la UEx (Fernández Delgado, 2023). Además, los complejos PtTdTn, PdTdTn (3.2.3.2.) y su ligando TdTn (3.2.2.3.) se ha llevado a cabo siguiendo el procedimiento establecido en un TFG leído en la UEx (De La Cruz Martínez, 2014).

3.2.1. Síntesis del precursor *cis*-[PtCl₂(DMSO)₂]

La síntesis del precursor *cis*-[PtCl₂(DMSO)₂] (Figura 3.1.) se ha llevado a cabo mediante el método descrito por (Price et al., 1972). Para esta síntesis se parte de una disolución de K₂[PtCl₄] (1,25 g, 3 mmol) en agua destilada (10 mL). Seguidamente, se añade gota a gota una disolución de DMSO (0,7 mL, 9 mmol), formándose inmediatamente un sólido pulverulento de color amarillo. La mezcla se mantuvo en agitación durante 1 hora. Posteriormente, se filtra la suspensión y el sólido obtenido se lava con agua destilada y éter dietílico frío.

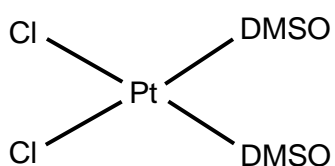


Figura 3.1. Estructura molecular de *cis*-[PtCl₂(DMSO)₂].

3.2.2. Síntesis de ligandos

La confirmación de la síntesis de los siguientes ligandos se hizo por $^1\text{H-RMN}$ y se encuentran en el Anexo (Figura A.1., A.2., A.3., A.4., A.5.).

3.2.2.1. Síntesis de (2-(1-pirazolil)-1,3-tiazina) (PzTz) y 2-(1-pirazolil)-2-tiazolina (PzTn)

En primer lugar, se disolvieron 0,695 g (10,2 mmol) de pirazol en 50 mL de tolueno, después se añadieron lentamente a la disolución 0,600 g (25,0 mmol) de hidruro de sodio al 60% y se dejó en agitación durante 3 horas a temperatura ambiente. Pasado este tiempo, se adicionó gota a gota 1 mL de 3-cloropropilisotiocianato para la síntesis de PzTz y 1 mL de 2-cloroetilisotiocianato para la síntesis de PzTn y la mezcla se calentó a reflujo durante 4 horas. Posteriormente, se dejó enfriar la mezcla y se adicionaron 5 mL de metanol.

A continuación, se evaporó el disolvente a vacío en el rotavapor y al residuo aceitoso resultante se le añadió agua para separar las fases con ayuda de un embudo de decantación. La fase acuosa se extrajo con cloroformo, y se secó la fase orgánica con sulfato de sodio anhidro. Éste se filtró por gravedad, y posteriormente, se eliminó el cloroformo en el rotavapor. El aceite resultante se recristalizó en éter dietílico/éter de petróleo 1:1 (v/v) para PzTz y 1:2 (v/v) para PzTn, obteniéndose un sólido cristalino incoloro de PzTz (0,930 g, 55,6%) y PzTn (0,850 g, 50,3%), que se filtraron y secaron al aire.

3.2.2.2. Síntesis de (2-(3,5-difenil-1-pirazolil)-1,3-tiazina) (DPhPzTz) y (2-(3,5-difenil-1-pirazolil)-2-tiazolina) (DPhPzTn)

Para llevar a cabo estas síntesis, se disolvió 3,5-difenilpirazol (2,200 g, 10 mmol) en 60 mL de tolueno con hidruro de sodio al 60% (0,600 g, 17 mmol) y la mezcla resultante se agitó durante 3 horas a temperatura ambiente. Seguidamente, se añadió gota a gota 1 mL de 3-cloropropilisotiocianato para la síntesis de DPhPzTz y 1 mL de 2-cloroetilisotiocianato para DPhPzTn y se calentó la mezcla a reflujo durante 4 horas. Transcurrido este tiempo se dejó enfriar la mezcla a temperatura ambiente y se adicionaron 5 mL de metanol.

A continuación, se evaporó el disolvente a vacío en un rotavapor y se le añadió agua destilada al residuo resultante para separar las dos fases con ayuda de un embudo de decantación. La fase acuosa se extrajo con cloroformo, y se secó la fase orgánica con sulfato de sodio anhidro. Éste se filtró por gravedad, y posteriormente, se eliminó el cloroformo en el rotavapor. El aceite amarillo resultante de ambas reacciones se purificó mediante cromatografía flash, usando una mezcla de diclorometano/éter dietílico 20:1 (v/v). Las primeras fracciones de la cromatografía en distintas reacciones contenían DPhPzTz y DPhPzTn que se recristalizó en éter dietílico/éter de petróleo 1:1 (v/v), obteniéndose cristales incoloros de DPhPzTz (1,750 g, 54,8%) y DPhPzTn (1,540 g, 50,4%).

3.2.2.3. Síntesis de 2-(3,4-diclorofenil)imino-N-(2-tiazolin-2-il)tiazolidina (TdTn)

La síntesis de TdTn se ha llevado a cabo por uno de los dos métodos descritos por (Outcalt, 1987). El procedimiento experimental seguido se describe a continuación:

Se prepara una disolución de 4,05 g (25 mmol) de 3,4-dicloroanilina y 3,5 mL (25 mmol) de trietilamina en 30 mL de cloroformo y se enfría en un baño de agua-hielo al mismo tiempo que se mantiene en agitación (unos 20 minutos). A esta disolución se añade otra formada por 3,04 g (25 mmol) de 2-cloroetilisocianato en 5 mL de cloroformo gota a gota desde un embudo de adición. Después, se retira el baño de agua-hielo y se mantiene la agitación durante 2 horas.

A continuación, se calienta la mezcla de reacción durante 3 horas a reflujo, y se deja agitando a temperatura ambiente durante 12 horas. Pasado este tiempo, se diluye la solución con diclorometano, se lava con agua destilada, se separa la fase orgánica y se seca con sulfato de sodio anhidro. Seguidamente, la disolución se concentra en el rotavapor obteniéndose un aceite. El producto se separa por cromatografía flash usando como eluyente acetato de etilo-hexano 3:1 (v/v). Las últimas fracciones de la cromatografía contienen TdTn que se obtiene por recristalización en etanol absoluto (1,5 g, 37%).

3.2.3. Síntesis de complejos de Pt(II) y Pd(II)

La confirmación de síntesis de los complejos en los apartados 3.2.3.1. y 3.2.3.2. se hizo por $^1\text{H-RMN}$ y se encuentran en el Anexo (Figura A.6., A.7., A.8., A.9., A.10., A.11.).

3.2.3.1. Síntesis de complejos $[\text{PtCl}_2\text{L}]$ ($\text{L}=\text{PzTn}$, DPhPzTn , PzTz , DPhPzTz) (PtPzTn), (PtDPhPzTn), (PtPzTz) y (PtDPhPzTz)

Para llevar a cabo la síntesis de los complejos PtPzTn , PtDPhPtPzTn , PtPzTz y PtDPhPzTz (Figura 3.2.), en primer lugar, se disuelve el precursor $\text{cis-}[\text{PtCl}_2(\text{DMSO})_2]$ (300,0 mg, 0,71 mmol) en 30 mL de etanol absoluto. Seguidamente, a esta disolución se le añade una cantidad equimolar del ligando correspondiente disuelto en 20 mL de etanol absoluto y la mezcla resultante se agita a reflujo durante 24 horas en oscuridad obteniéndose un sólido amarillo del complejo de Pt(II). El sólido obtenido se separa por filtración a vacío y posteriormente se cristaliza en DMF (para PtPzTn , PtPzTz , PtDPhPzTn) o acetonitrilo (para PtDPhPzTz). Por último, los cristales se separan por filtración, se lavan con agua destilada y éter dietílico frío, y se secan al aire.

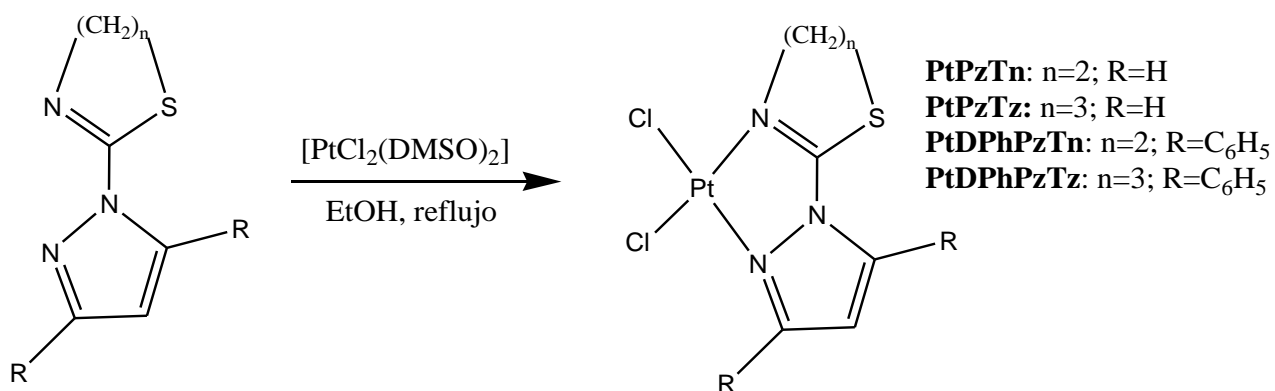


Figura 3.2. Síntesis de PtPzTn , PtDPhPzTn , PtPzTz y PtDPhPzTz .

3.2.3.2. Síntesis de $[\text{PtCl}_2(\text{TdTn})]$ (PtTdTn) y $[\text{PdCl}_2(\text{TdTn})]$ (PdTdTn)

Para realizar la síntesis de los complejos PtTdTn y PdTdTn (Figura 3.3.), se prepararon dos disoluciones con 30 mL de etanol absoluto cada una. En una se disolvió (211 mg, 0,5 mmol) del precursor $\text{cis-}[\text{PtCl}_2(\text{DMSO})_2]$ y en la otra (157 mg, 0,5 mmol)

de la sal compleja $\text{Na}_2[\text{PdCl}_4]$. A ambas soluciones se le añadieron 30 mL de TdTn (166 mg, 0,5 mmol) disuelto en etanol y se mantuvieron a reflujo durante 24 horas. Posteriormente, el sólido amarillo (PtTdTn) o naranja (PdTdTn) resultante en cada reacción se separó por filtración y se lavó con agua y éter frío. Los dos sólidos se recrystalizaron en DMF a 70°C obteniéndose, según la disolución, cristales amarillos (PtTdTn) o naranjas (PdTdTn). Los cristales se separaron por filtración, se lavaron con éter frío y se secaron al aire (PtTdTn, 237 mg, 79%; y PdTdTn, 271 mg, 90%).

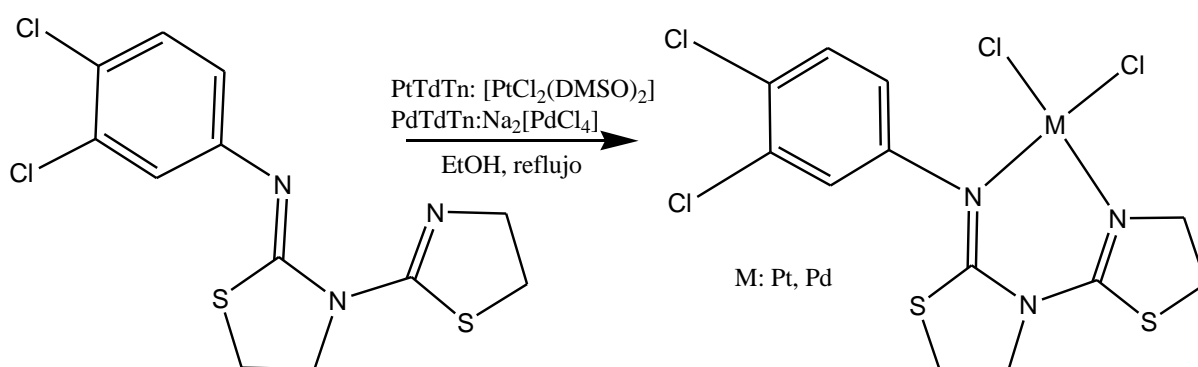


Figura 3.3. Síntesis PtTdTn y PdTdTn.

3.2.3.3. Síntesis de *cis*-[PtCl₂(3,4-dicloroanilina)(NH₃)]

3.2.3.3.a Síntesis de *cis*-diamminadicloroplatino(II) (CisPt)

Para llevar a cabo la síntesis de *cis*-diamminadiyodoplatino(II) (Figura 3.4.A), se disolvieron 0,93 g (2,24 mmol) del precursor $\text{K}_2[\text{PtCl}_4]$ en 4,5 mL de agua Mili-Q en un vaso de precipitado de 100 mL a 50°C . A esta disolución se le añadieron 2,232 g (13,45 mmol) de KI disueltos en 2,5 mL de agua Mili-Q tibia y la mezcla se calentó hasta alcanzar los 70°C en agitación, cambiando la disolución de color rojo a marrón oscuro. Tras dejar enfriar la disolución a temperatura ambiente y filtrarla a vacío, se añaden 3,7 mL de una solución acuosa 2 M de NH_3 . Posteriormente, pasado 20 minutos se obtuvo un sólido naranja-amarillo que se filtró a vacío y se lavó con una pequeña cantidad de etanol 96 % y éter dietílico frío. Se recogieron 0,923 g (rendimiento 85,4%).

A continuación (Figura 3.4.B), se disolvieron 0,473 g (1,52 mmol) de Ag_2SO_4 en 75 mL de agua Mili-Q en un vaso de precipitados de 250 mL. Una vez disuelto, se añadió lentamente el producto naranja-amarillo *cis*-[PtI₂(NH₃)₂] (0,75 g, 1.55 mmol), y

3. Materiales y Métodos

se calentó a 70°C en agitación durante 15 minutos. A continuación, una vez precipitado el yoduro de plata (AgI), se filtró la disolución y se redujo el volumen a 15 mL con un rotavapor. A dicho volumen, se agregó un exceso de KCl (2,45 g, 32,86 mmol) y se calentó a 70°C durante 10 minutos. Finalmente, se enfrió la disolución en un baño de hielo y se filtró a vacío el producto amarillo obtenido. El sólido se lavó con etanol 96% y éter dietílico frío. Se recogieron 0,36 g (77% rendimiento).

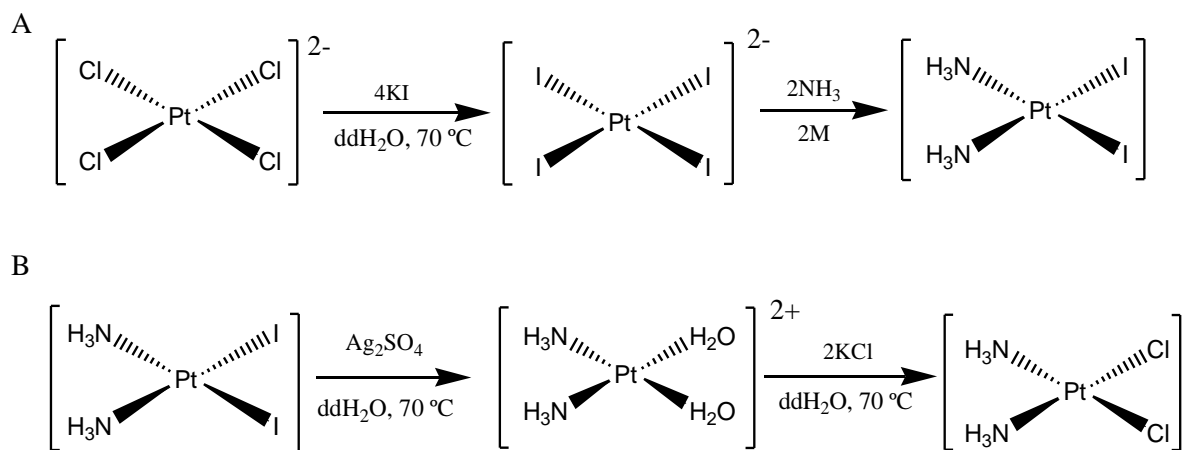


Figura 3.4. Síntesis de CisPt. (A) Síntesis de cis-diamminadiyodoplatino(II) y (B) de cis-diamminadicloroplatino(II).

3.2.3.3.b Síntesis de amminatricloroplatinato(II) de potasio

La síntesis se realizó mediante una modificación del método descrito por (Giandomenico et al., 1995) (Figura 3.5.). Inicialmente, se calentó una disolución en agitación de 1 g (3,32 mmol) de CisPt y 0,66 g (3,59 mmol) de cloruro de tetraetilamonio en 200 mL de dimetilacetamida a 100°C ($\pm 2^\circ\text{C}$) durante 8-10 horas en un vaso de precipitado de 250 mL mientras se purgaba con una corriente lenta de nitrógeno introducida por un tubo de dispersión de gases. Durante la reacción se dejó que el volumen se redujera a 50 mL. Una vez enfriada la disolución resultante de color naranja, se vertió en 450 mL de 1:1 (v/v) hexano/acetato de etilo y se enfrió a -14°C durante 12 horas. Posteriormente, apareció una capa de aceite en el fondo del vaso y se separó del resto de la disolución por decantación. Seguidamente, se disolvió el aceite de color naranja en 20 mL de agua destilada y se dejó reposar durante 1 hora para permitir la precipitación completa de una pequeña cantidad de CisPt que hubiera podido quedar sin reaccionar. Tras filtrar esta disolución, que contiene $\text{Et}_4\text{N}[\text{PtCl}_3(\text{NH}_3)]$, se agitó con 50

mL de resina de intercambio catiónico Dowex 50W-X8H⁺ durante 1 hora. A continuación, se filtró la resina y se redujo el volumen a 2 mL mediante un rotavapor. Finalmente, se añadieron 3 mL de KCl saturado y se enfrió a 4°C durante 3 horas. Se recogieron 0,47 g (40% de rendimiento) de K[PtCl₃(NH₃)], cristalino naranja.

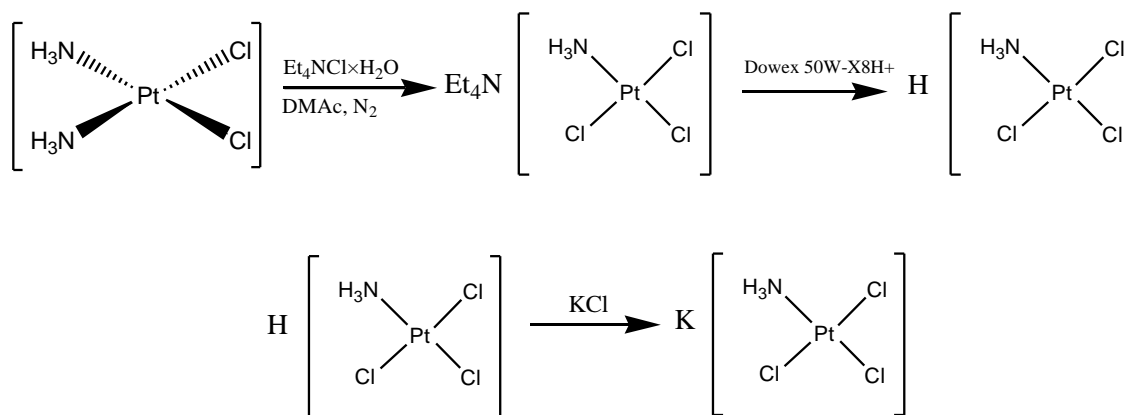


Figura 3.5. Síntesis *cis*-amminatricloroplatinato(II) de potasio.

3.2.3.3.c Síntesis de *cis*-amminacloro(3,4-dicloroanilina)yodoplatino(II)

Para la síntesis de este compuesto se disolvieron 247,32 mg (1,65 mmol) de NaI en 9 mL de una mezcla de agua Mili-Q/etanol en proporción 1:2 (v/v) y se añadió a una disolución de 300 mg (0,84 mmol) de K[PtCl₃(NH₃)] disueltos en la misma cantidad y mezcla. Por otro lado, se disolvieron 150,60 mg (0,93 mmol) de 3,4-dicloroanilina igualmente que los reactivos anteriores y se agregó a la reacción. Posteriormente, se mantuvo en agitación 4 horas a temperatura ambiente. Finalmente, se recogió el producto amarillo por filtración y se lavó con agua y cloroformo (Figura 3.6.). Se recogieron 270 mg (60% rendimiento).

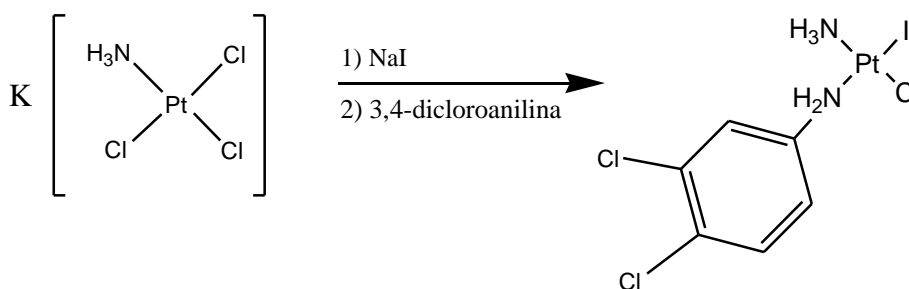


Figura 3.6. Síntesis amminacloro(3,4-dicloroanilina)yodoplatino(II).

3.2.3.3.d Síntesis de *cis*-amminadiclouro(3,4-dicloroanilina)platino(II)

La sustitución del yodo por un cloro (Figura 3.7.) se realizó añadiendo 170 mg (1 mmol) de AgNO_3 a una disolución de 326 mg (0,61 mmol) del producto obtenido anteriormente disuelto en 10 mL de agua Mili-Q. La reacción se mantuvo en agitación durante 4 horas y se comprobó la presencia de iones de plata libres según el método descrito por (Giandomenico et al., 1995). Una vez obtenida una prueba negativa, se añadió una pequeña cantidad de carbón activo y se agitó la mezcla durante 1 hora. Posteriormente, se filtró la disolución con una jeringuilla y un filtro de nylon ($0.45 \mu\text{m}$) para desechar los reactivos iniciales. A la disolución resultante coloreada de amarillo se le añadieron 10 mL de KCl saturado y se dejó reposar durante 12 horas. Finalmente, se recogió el producto por filtración a vacío y se lavó con agua y éter dietílico. Se recogieron 103 mg (38,15% de rendimiento). En la Tabla 3.1. se recogen las diferentes solubilidades del compuesto sintetizado a temperatura ambiente.

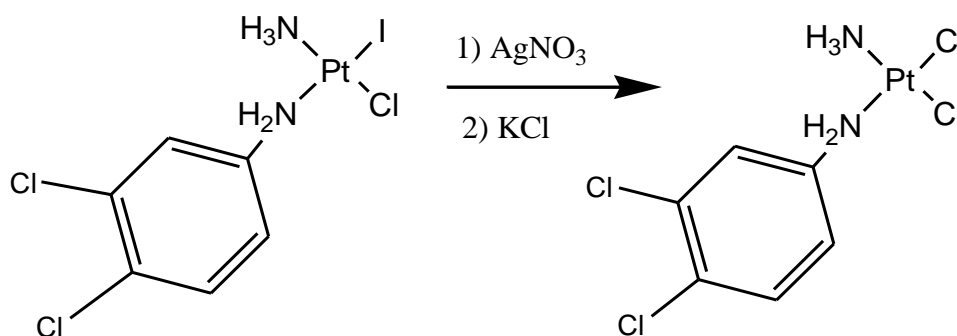


Figura 3.7. Síntesis de *cis*-amminadichloro(3,4-dicloroanilina)platino(II).

Tabla 3.1. Solubilidad de $[PtCl_2(3,4\text{-dicloroanilina})(NH_3)]$.

Solubilidad	
Agua	I
Etanol	PS
Metanol	S
Acetona	S
Acetonitrilo	S
Cloroformo	I
Diclorometano	I
Tolueno	I
Éter dietílico	I
DMSO	S
DMF	S

S: Soluble; PS: Parcialmente soluble; I: Insoluble.

3.2.4. Caracterización de complejos de Pt(II)

3.2.4.1. Difracción de rayos X de monocristal

Para realizar el estudio de los monocristales del compuesto $[PtCl_2(3,4\text{-dicloroanilina})(NH_3)]$ se ha empleado un difractómetro Bruker Kappa APEXII CCD utilizando una radiación monocromática de grafito Mo-K α ($\lambda = 0.71073 \text{ \AA}$) y técnica de barrido ω - ϕ a 296 K. Todos los datos se corrigieron en base a los efectos Lorentz y de polarización, mientras que las correcciones de absorción se realizaron mediante el programa SADABS (BRUKER, 2009). La estructura se resolvió por métodos directos y diferencias de Fourier utilizando el programa SHELXS-14 (M. Sheldrick, 2014). Posteriormente, se refinó por mínimos cuadrados de matriz completa con SHELXL-18 (G. M. Sheldrick, 2015) asumiendo parámetros de desplazamiento anisotrópicos para los átomos distintos de hidrógeno. Los átomos de hidrógeno se fijaron geoméricamente, con valores de desplazamiento isotrópicos derivados de los valores de desplazamiento equivalentes de los átomos a los que se encuentran unidos. La representación gráfica de la estructura molecular se realizó con la aplicación Mercury (Macrae et al., 2008).

3. Materiales y Métodos

3.2.4.2. Espectro de infrarrojo (IR)

Los espectros de infrarrojo (IR) se registraron en un espectrofotómetro Perkin-Elmer 100 FTIR a partir de pastillas de KBr en el rango de 4000 a 400 cm^{-1} .

3.2.4.3. Espectro de resonancia magnética nuclear (RMN)

Los espectros de ^1H -RMN se obtuvieron con un instrumento Bruker Avance III 500 MHz en DMF deuterada (DMF-d_7) para el complejo $[\text{PtCl}_2(3,4\text{-dicloroanilina})(\text{NH}_3)]$. Las señales de protones residuales del disolvente deuterado se utilizaron como referencia para las señales ^1H -RMN. En el anexo (Figura A.12.) se muestra el espectro ^1H -RMN del complejo de Pt(II) a tiempo 0 y transcurrido 7 días, evidenciándose la estabilidad del mismo durante este periodo de tiempo al no producirse cambios a temperatura ambiente.

3.3. Preparación y caracterización de nanopartículas mesoporosas de sílice (MSNs)

La obtención de MSNs se realizó en colaboración con el grupo COMET-NANO del Departamento de Biología y Geología, Física y Química Inorgánica de la Universidad Rey Juan Carlos.

3.3.1. Síntesis del material inicial de sílice mesoporosa

La síntesis de las MSNs se llevó a cabo modificando ligeramente el procedimiento experimental reportado por (Zhao et al., 2009). Inicialmente, se disolvieron 2 g (5,5 mmol) de bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB) en 480 mL de agua Mili-Q y se añadieron 7 mL de hidróxido sódico (2 M, 14 mmol). A continuación, se ajustó la temperatura a 80°C y, a continuación, se añadieron gota a gota 10 mL del precursor ortosilicato de tetraetilo de sílice (TEOS) (44,8 mmol) manteniendo la mezcla en agitación durante 2 horas adicionales a la misma temperatura. El sólido blanco resultante se separó por filtración y posteriormente se lavó con abundante agua Mili-Q y

metanol (2×50 mL) y se secó durante 24 horas a 80°C en una estufa. Finalmente, el tensioactivo se eliminó por calcinación a 550°C durante 24 horas.

3.3.2. Funcionalización de las MSN con ligandos de silano

La incorporación de los ligandos 3-mercaptopropiltrietoxisilano (MP) y la sal trisódica del ácido triacético N-(3-trimetoxisililpropil)etilendiamina (TEDTS) se realizó mediante una reacción en dos pasos (Figura 3.8.). En primer lugar, se deshidrataron 1,5 g de MSN y se activaron a vacío y a 80°C durante 12 horas. La sílice se dispersó en 40 mL de tolueno seco y se añadieron 1,53 mL (6,33 mmol, 1:1 p/p SiO_2 :MP) de MP bajo atmósfera de nitrógeno. La dispersión se mantuvo en agitación a 110°C durante 48 horas. Transcurrido ese tiempo, el sólido (MSN-MP) se aisló por centrifugación (6000 rpm, 10 min), se lavó varias veces con tolueno y éter dietílico y se secó en la estufa a 75°C .

Para la formación de MSN-MP-TEDTS, se secaron 1,3 g de MSN-MP a vacío y a 80°C durante 12 horas. La sílice activada se dispersó en 30 mL de etanol seco y se añadieron 206,3 μL (0,56 mmol, 20% de funcionalización p/p SiO_2 :TEDTS) de TEDTS bajo atmósfera de nitrógeno. La suspensión se calentó a 60°C y se agitó durante 48 horas. A continuación, se enfrió a temperatura ambiente y se separó el sólido por centrifugación (6000 rpm, 10 minutos), se lavó con abundante agua Mili-Q y metanol (2×50 mL) y se secó durante 24 horas a 80°C en la estufa.

3.3.3. Incorporación del derivado de melatonina 5MT

Para la funcionalización de los materiales con el derivado de melatonina 5MT, se realizó una reacción de acoplamiento mediada por el hidrocloreuro de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDAC) y N-hidroxisuccinimida (NHS) (Figura 3.8.). Inicialmente, se disolvieron 80 mg de 5MT (0,42 mmol, 10% de funcionalización p/p SiO_2 /5MT) en 2 mL de DMSO en un baño de ultrasonido, y a esta solución se le añadieron 80 mL de tampón ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico (MES). Tras obtener una mezcla homogénea, se añadieron 96 mg (0,50 mmol) de EDAC y 144 mg (1,25 mmol) de NHS y la solución resultante se agitó durante 15 minutos a temperatura ambiente para activar los grupos carboxílicos. Posteriormente, se añadieron 800 mg de MSN-MP-TEDTS a la mezcla resultante y se agitó durante 2 horas adicionales a temperatura ambiente.

3. Materiales y Métodos

Finalmente, el sólido resultante se centrifugó (6000 rpm, 10 minutos), se lavó con agua Mili-Q y etanol (2×50 mL) para eliminar el exceso de reactivos, y posteriormente se secó en una estufa a 75°C. El producto resultante se identificó como MSN-5MT.

3.3.4. Funcionalización de las MSNs con agentes quimioterapéuticos

La síntesis de los materiales basados en MSNs funcionalizados con los agentes quimioterapéuticos TdTn, PtTdTn o PdTdTn se realizó manteniendo la misma proporción de ligando TdTn en cada material final. Para la formación de MSN-PtTdTn, se añadieron 200 mg de MSN-MP-TEDTS y 40,15 mg de PtTdTn (10% de funcionalización p/p SiO₂/TdTn) en un tubo Schlenk y se sometieron a dos ciclos de vacío/nitrógeno (10 minutos/1 minuto). Los sólidos se dispersaron en 20 mL de tolueno seco y, posteriormente, se añadieron 18,6 µL de trietilamina. La mezcla de reacción se calentó a 110°C y se agitó durante 24 horas. Después, el sólido se centrifugó (6000 rpm, 10 minutos) y posteriormente se lavó con etanol. Para la preparación de MSN-PdTdTn se utilizaron 200 mg de MSN-MP-TEDTS y 34,22 mg de PdTdTn (10% de funcionalización p/p SiO₂/TdTn). La MSN-TdTn se sintetizó por adsorción para ser utilizada como material comparativo utilizando 200 mg de MSN-MP-TEDTS y 22,22 mg de TdTn (10% de funcionalización p/p SiO₂/TdTn).

Para la preparación de MSN-5MT-TdTn, MSN-5MT-PtTdTn y MSN-5MT-PdTdTn, las cantidades y el procedimiento sintético fueron los mismos, pero partiendo del material funcionalizado MSN-5MT (Figura 3.8.).

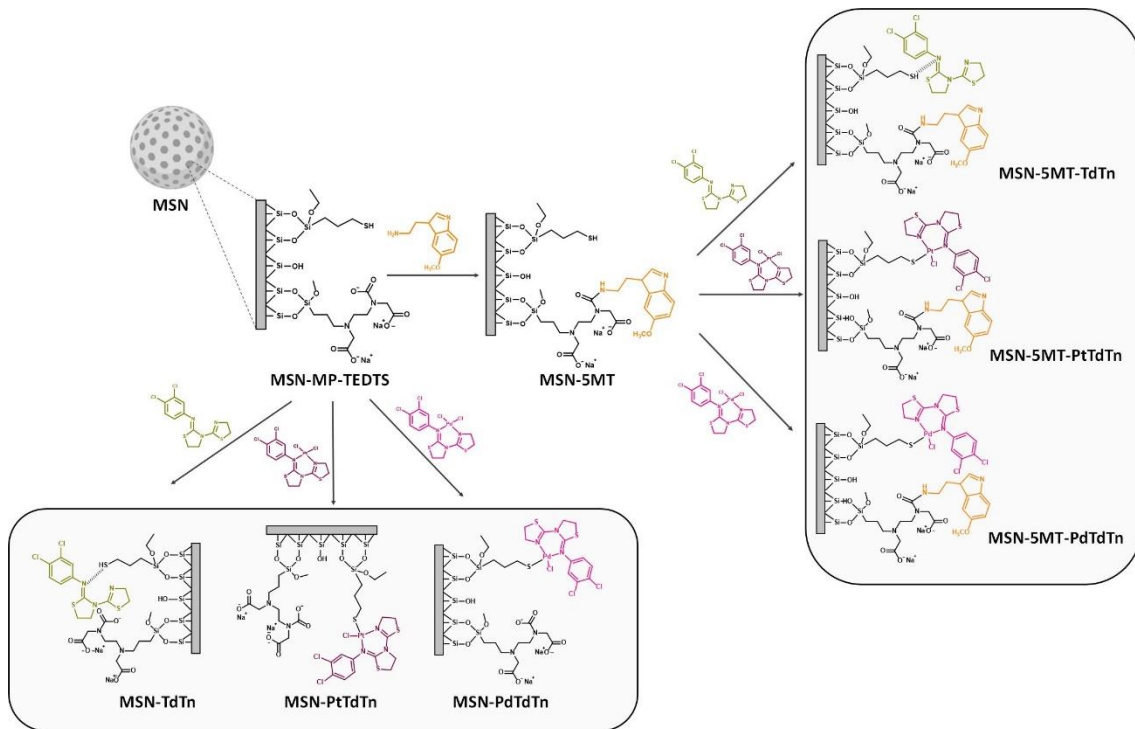


Figura 3.8. Representación esquemática de las reacciones de funcionalización para la obtención de las seis nanopartículas finales.

3.3.5. Técnicas de caracterización de las MSNs

Las técnicas de caracterización empleadas para evaluar las propiedades fisicoquímicas de los nanomateriales son muy variadas. Concretamente, en sílicas y materiales nanoestructurados en general, es esencial conocer a fondo las propiedades texturales de los mismos.

3.3.5.1. Patrón de difracción de rayos X (DRX)

Una estructura microcristalina ordenada de los materiales mesoporosos de sílice les permite obtener un patrón característico por DRX. Por lo tanto, para el análisis de difracción de rayos X en polvo se utilizó un espectrómetro Philips PW3040/00 X'Pert MPD/MRD (Philips, Países Bajos), utilizando radiación monocromática.

3.3.5.2. Espectro ultravioleta visible (UV-Vis)

Las medidas de DR UV-Vis se recogieron con un espectrofotómetro Varian Cary-500 equipado con una esfera integradora y politetrafluoroetileno (PTFE) como referencia,

3. Materiales y Métodos

obteniendo información sobre los sistemas según la capacidad de adsorción y emisión (fluorescencia) de los mismos.

3.3.5.3. Termogravimetría (TG)

Los análisis de termogravimetría (TG) se obtuvieron con un DSC/TGA Discovery SDT650 bajo atmósfera de nitrógeno para cuantificar el porcentaje de las diferentes funcionalizaciones de los materiales.

3.3.5.4. Espectrometría de emisión atómica de plasma acoplado por inducción (ICP-AES)

Los análisis de liberación de iones metálicos de todos los nanomateriales se realizaron mediante estudios de espectroscopia de emisión atómica de plasma acoplado por inducción (ICP-AES) en un Varian Vista AX Pro (λ (Pt) = 203,646 nm; λ (Pd) = 340,458 nm).

3.3.5.5. Fisorción de gases en sólidos (BET)

La BET o adsorción física se realiza para estudiar las propiedades texturales de materiales de sílice. La isoterma de adsorción-desorción de gas N₂ se realizaron mediante un analizador Micromeritics ASAP 2020. Los procesos de desgasificación previos a la determinación de la isoterma fueron de 10 horas a 90°C a 10⁻⁷ mm Hg para todos los materiales.

3.3.5.6. Microscopia electrónica de transmisión (MET)

Para determinar las propiedades físicas (morfología, dimensión y distribución) de las NP, la microscopia electrónica de transmisión (MET) se realizó con un JEOL JEM 1010 que funcionaba a 100 kV y las micrografías se trataron con el software ImageJ.

3.3.5.7. Microscopia electrónica de barrido (MEB)

La microscopia electrónica de barrido (MEB) se realizó con un ESEM Philips XL30 con un FEG-SEM Nova Nano SEM230 de alta resolución obteniendo imágenes tridimensionales de los nanomateriales.

3.3.5.8. Estudio de estabilidad de los materiales finales: Análisis de liberación

Se llevó a cabo un estudio de lixiviación de metales para determinar la concentración de especies solubles de Pt(II) o Pd(II) en un fluido corporal simulado con PBS (pH 7,4). Así, se suspendieron 5 mg de los materiales finales (MSN-PtTdTn, MSN-PdTdTn, MSN-5MT-PtTdTn y MSN-5MT-PdTdTn) en 5 mL de tampón y se incubaron a 37°C y 30 rpm en un incubador Roto-Therm (Benchmark) durante 3, 24 y 48 horas. Tras cada tiempo estudiado, las suspensiones se filtraron con un filtro de nylon (0,2 μm) y las soluciones se analizaron por duplicado en ICP-AES para determinar la cantidad de Pt(II) o Pd(II) lixiviado a la solución durante la incubación.

3.3.5.9. Estudio de la interacción de los materiales con el ADN

El ácido desoxirribonucleico de esperma de pez (FS-ADN) se adquirió en Aldrich (St. Louis, MO, EE.UU.). La solución madre de FS-ADN se preparó disolviendo una cantidad adecuada de FS-ADN en PBS (pH = 7,4) y se almacenó a 4°C en la oscuridad. La concentración de la solución madre de ADN (0,08 mg/mL) se determinó a partir del espectro de absorción UV a 260 nm utilizando el coeficiente de absorción molar $\epsilon_{260} = 6600 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. Los experimentos de espectroscopia de absorción UV se realizaron añadiendo la misma concentración de ADN (0,08 mol/L) a suspensiones de MSN-PdTdTn y MSN-PtTdTn (2,5 mg/mL en una mezcla de tampón etanol/Tris) y se incubaron a diferentes intervalos de tiempo: 1, 2, 4 y 24 horas. Después de cada tiempo de incubación, las suspensiones se filtraron con un filtro de nylon (0,2 μm) y se realizaron inmediatamente mediciones espectroscópicas. Todas las mediciones se realizaron a temperatura ambiente con un espectrofotómetro Analytik Jena Specord 200 (Analytik Jena, Jena, Alemania) entre 200 y 500 nm.

3.4. Ensayos biológicos

3.4.1. Cultivos celulares

Las líneas celulares mostradas en la Tabla 3.2. se cultivaron en frascos de cultivo de 25 cm² o 75 cm², en función del experimento a realizar, con los medios y suplementos indicados. Las células se mantuvieron en una atmósfera humidificada con un 5% de CO₂ a 37°C, y su viabilidad se comprobó de forma rutinaria mediante el método de exclusión de azul de tripano. Los cultivos celulares crecieron en monocapa (HeLa, MDA-MB-231 y MCF10A) o suspensión (HL-60) hasta alcanzar el 80% de confluencia, estimando el tiempo de duplicación en 24 horas para las células HeLa, HL-60 y MDA-MB-231 y 36 horas para las células MCF10A.

Tabla 3.2. Líneas celulares, medios de cultivo y suplementos utilizados.

Línea celular	Medio de cultivo	Suplementos
MDA-MB-231	DMEM	10% FBS inactivado por calor 2 mM L-glutamina 100 U/mL penicilina/estreptomicina
HeLa		
HL-60	RPMI-1640	10% FBS inactivado por calor 2 mM L-glutamina 100 U/mL penicilina/estreptomicina
MCF10A	DMEM F-12	5% suero de equino 20 ng/mL EGF 10 µg/mL insulina 100 ng/mL toxina cólera 0,5 µg/mL hidrocortisona 100 U/mL penicilina/estreptomicina

DMEM: medio de Eagle modificado por Dulbecco; EGF: factor de crecimiento epidérmico; FBS: suero bovino fetal. RPMI: Roswell Park Memorial Institute.

El mantenimiento del cultivo de las diferentes líneas celulares se realizó en una campana de flujo laminar en condiciones de esterilidad cuando el cultivo alcanzaba el 80% de confluencia. Inicialmente, para el pasaje de células adherentes (MDA-MB-231, HeLa, MCF10A), se retiró por aspiración el medio de cultivo consumido por aspiración

y se lavó con 2 mL de PBS. A continuación, con el objetivo de desprender las células adheridas a la base del frasco de cultivo, se llevó a cabo una proteólisis ligera añadiendo 0,5 mL de tripsina 1X, durante 1,5 minutos (MDA-MB-231 y HeLa), o tripsina 10X, durante 9 minutos (MCF10A). Posteriormente, se inhibió la acción de la tripsina mediante la adición de 3 mL de medio fresco suplementado con FBS. El volumen resultante se pasó a un tubo Falcon de 15 mL, el cual se centrifugó 5 minutos a 150×g. Seguidamente, se retiró el sobrenadante, se resuspendió el pellet celular en medio de cultivo fresco y se realizó un recuento de células utilizando una cámara de Neubauer. Posteriormente, las células fueron subcultivadas a una confluencia del 25%.

Para el pasaje celular en suspensión (HL-60), se pipeteaba el medio RPMI consumido por las células y la suspensión celular se pasaba a un tubo Falcón, que se centrifugaba durante 5 minutos a 150 ×g. A continuación, se retiraba el sobrenadante, se resuspendía el pellet de células en medio RPMI fresco y se hacía el recuento celular en cámara de Neubauer. Posteriormente, las células eran subcultivadas a $2,5 \times 10^5$ células/mL en 5 mL.

3.4.2. Viabilidad celular

La viabilidad celular es un marcador de estudio con el cual poder determinar los efectos citotóxicos de un fármaco mediante el análisis de la proporción de células vivas y funcionales existentes en una población celular. La viabilidad se evaluó mediante el ensayo de proliferación celular CellTiter 96 AQueous One Solution, que se basa en la reducción de un compuesto de tetrazolio, MTS, dando lugar a una solución coloreada, cuya absorbancia se registra en un lector de microplacas (Infinite M200; Tecan Group Ltd., Männedorf, Suiza), tanto a una longitud de onda de prueba de 490 nm, como a una longitud de onda de referencia de 650 nm para restar el ruido de fondo. Los experimentos se realizaron por triplicado y las células fueron tratadas con los diferentes agentes quimioterápicos/nanomateriales durante 24 horas. Por un lado, los tratamientos con los complejos metálicos se llevaron a cabo realizando una curva-dosis respuesta a diferentes concentraciones (0,1-100 μ M) para calcular la IC₅₀ de los distintos quimioterápicos. Para los experimentos con NP, las células se trataron con MSNs suspendidas en una solución de dH₂O/DMSO (50:50, v/v) a concentraciones que oscilaban entre 10 y 500 μ g/mL durante 24 horas para obtener la IC₅₀ y/o la IC₂₅ de cada nanomaterial. La suspensión de

3. Materiales y Métodos

MSNs se dispersó con un sonicador durante 15 minutos antes de preparar las muestras para minimizar la agregación antes de añadirla al medio de cultivo. Para preparar las soluciones stock, los quimioterápicos se diluyeron en DMSO o DMF teniendo en cuenta que la concentración final del disolvente en las células fuese $\leq 0,2\%$ (v/v).

También se observó la dinámica de crecimiento de los cultivos celulares tras el tratamiento con melatonina. En concreto, se estudió la acción de los agentes quimioterápicos en presencia o ausencia de melatonina (0,5, 1 y 2 mM) para comprobar los efectos sinérgicos entre ambos.

Las células se sembraron en placas de 96 pocillos (TPP[®], Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Suiza) a una densidad de 8×10^3 células/pocillo (MDA-MB-231, MCF10A), $1,2 \times 10^4$ células/pocillo (HeLa) o $2,5 \times 10^4$ células/pocillo (HL-60). Después de tratar los cultivos durante 24 horas, se realizaron los ensayos añadiendo 10 μ L del reactivo CellTiter 96 AQueous One Solution directamente a los pocillos de cultivo, incubando durante 15 minutos (HeLa), 1 hora (MDA-MB-231 y MCF10A) o 2 horas (HL-60) a 37°C, para luego registrar la absorbancia en el lector de microplacas.

La viabilidad celular se calculó como porcentaje de los valores de control (muestras no tratadas), según la siguiente fórmula:

$$[Abs \text{ muestras tratadas} / Abs \text{ muestras no tratadas (control)}] \times 100$$

3.4.3. Determinación de células apoptóticas

Se estudió la apoptosis de las células sometidas a diferentes tratamientos mediante un kit comercial de detección de apoptosis (Anexina V-FITC Apoptosis), de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Las células se sembraron en placas de 6 pocillos (TPP[®]) a una densidad de 3×10^5 células/pocillo (MDA-MB-231), 4×10^5 células/pocillo (MCF10A) o 2×10^5 células/pocillo (HeLa). A continuación, los cultivos celulares en crecimiento exponencial fueron tratados con diferentes fármacos/nanomateriales durante 24 horas. Tras el tratamiento, las células se tripsinizaron y se lavaron con PBS (5 minutos, 500 \times g). Posteriormente, las células se resuspendieron en 200 μ L de tampón de unión que contenía 5 μ L de Anexina V-FITC, y se transfirieron a tubos Eppendorf de 1,5 mL. La suspensión celular se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente en un agitador rotacional.

Seguidamente, las células se lavaron nuevamente con PBS y se centrifugaron (5 minutos, 500 ×g). Finalmente, las células se resuspendieron en 200 µL de tampón de unión conteniendo 10 µL de PI (stock = 20 µg/mL).

La anexina V-FITC se une específicamente a los residuos de fosfatidilserina en la cara externa de la membrana plasmática de las células apoptóticas. Por otro lado, el yoduro de propidio (PI) es un agente intercalante que se une al ADN de la célula una vez que la membrana de ésta se ha vuelto permeable. Las células fueron analizadas inmediatamente después de la incubación con las sondas mediante un citómetro de flujo MACSQuant Analyzer 10 (Miltenyi Biotech). Se analizaron diez mil eventos por muestra utilizando los detectores FL-1 (verde; anexina V-FITC) y FL-3 (rojo; PI). Cada grupo experimental fue analizado de tres a cinco veces en experimentos independientes. En todas las condiciones probadas, se compararon principalmente los porcentajes de células vivas, apoptóticas tempranas, apoptóticas tardías y necróticas secundarias.

3.4.4. Análisis de actividad caspasa

Las células se sembraron en placas de 6 pocillos (TPP®) a una densidad de 2×10^6 células/pocillo. Después de tratar los cultivos durante 24 horas con los diferentes compuestos, las células se tripsinizaron, se pasaron a diferentes tubos Eppendorf de 1,5 mL, y se centrifugaron (5 minutos, 150 ×g). Posteriormente, se retiró el sobrenadante y las células fueron teñidas para la detección de caspasa-3 y -9 con los kits comerciales específicos para cada una de las caspasas, indicados más abajo. La actividad de las caspasas se cuantificó utilizando un citómetro de flujo MACSQuant Analyzer 10. El análisis se limitó a células vivas, lo cual se detectó utilizando el colorante vital Hoechst 33258 (10 µg/ml), que se excitó con un láser de 405 nm y su fluorescencia se adquirió a través de un filtro de paso de banda (BP) de 450/50 nm. Se analizaron diez mil eventos/células por condición. Cada muestra fue analizada seis veces en experimentos independientes y los datos se presentaron como porcentaje de células teñidas para cada caspasa.

3.4.4.1. *Actividad caspasa-3*

El kit de tinción para caspasa-3 activa CaspGLOW™ utiliza el inhibidor específico de la caspasa 3, DEVD-FMK, directamente conjugado con FITC para el sistema de detección. Este reactivo penetra en las células, no es tóxico y se une de forma irreversible a la enzima activa. La fluoresceína CaspGLOW se excitó con un láser de 488 nm y su fluorescencia se adquirió a través del filtro BP de 525/50 nm.

3.4.4.2. *Actividad caspasa-9*

El kit *caspase-9 staining (Red)* proporciona un medio ampliamente utilizado para la detección de caspasa-9 activada en células vivas. El ensayo utiliza un inhibidor de la caspasa-9, LEHD-FMK, conjugado con sulforrodamina (Red-LEHD-FMK) como marcador fluorescente. El sustrato Red-LEHD-FMK es permeable a la célula, no es tóxico, y se une irreversiblemente a la caspasa-9 activada en las células apoptóticas. La sulforrodamina Red-LEHD-FMK se excitó con un láser de 561 nm y su fluorescencia se adquirió a través de un filtro BP de 586/15 nm.

3.4.5. **Medida de especies reactivas de oxígeno (ERO)**

Para determinar las ERO, las células se sembraron en placas de 6 pocillos (TPP®) a una densidad de 2×10^6 células/pocillo. Después de tratar los cultivos durante 24 horas, las células se tripsinizaron, se pasaron a diferentes tubos Eppendorf de 1,5 mL, y se centrifugaron (5 minutos, 150 ×g). Posteriormente, se retiró el sobrenadante y las células se incubaron (30 minutos, 37 °C) en PBS conteniendo 0,4 μM de DCFH-DA. La sonda DCFH es un indicador de ERO permeable a la célula, inicialmente no fluorescente, que es oxidado y convertido en 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (DCF), fluorescente, por la acumulación intracelular de ERO. El análisis de citometría de flujo se realizó utilizando un citómetro de flujo MACSQuant Analyzer 10. El DCF se excitó con un láser de 488 nm y su fluorescencia se adquirió a través de un filtro BP de 525/50 nm. El análisis se limitó a células vivas, lo cual se detectó utilizando el colorante vital Hoechst 33258 (10 μg/ml), que se excitó con un láser de 405 nm y su fluorescencia se adquirió a través de un filtro BP de 450/50 nm. Se analizaron diez mil eventos/células por condición. Cada muestra

fue analizada seis veces en experimentos independientes y los datos se presentaron como porcentaje de células teñidas con DCF.

3.4.6. Análisis del ciclo celular

Para investigar los cambios en la progresión del ciclo celular se llevó a cabo un análisis de la distribución de las poblaciones celulares en transición G0/G1, fase S y transición G2/M, así como la población de células sub-G1 (hipodiploides).

Las células se sembraron en placas de 6 pocillos (TPP®) a una densidad de 2×10^6 células/pocillo. Después de 24 horas de tratamiento con los diferentes agentes, las células se lavaron con PBS y se fijaron en etanol al 70% durante 30 minutos a 4°C. A continuación, las células se lavaron nuevamente con PBS y se resuspendieron en 500 mL de PBS que contenía PI (20 µg/ml) y RNasa A (50 µg/ml). Las muestras se mantuvieron en la oscuridad a 4°C durante 30 minutos y las células teñidas se analizaron inmediatamente mediante un citómetro de flujo MACSQuant X (Miltenyi Biotec). El PI se excitó con un láser de 488 nm y su fluorescencia se adquirió a través de un filtro BP de 585/40 nm. Se analizaron diez mil eventos/células por condición. Cada muestra fue analizada seis veces en experimentos independientes. Los dobletes de células se eliminaron del análisis incluyendo sólo células individuales en el protocolo de adquisición (Villanueva et al., 2018).

3.4.7. Determinación de migración celular

Para evaluar la migración celular de los diferentes tratamientos se emplearon las siguientes pruebas.

3.4.7.1. Ensayo de cierre de herida

Para realizar el ensayo de cierre de herida las células fueron sembradas ($1,5 \times 10^5$ células/pocillo) en MCF10A y ($1,8 \times 10^5$ células/pocillo) MDA-MB-231 en placas de 24 pocillos (TPP®). Una vez se formó una monocapa de células con una confluencia del 100%, se realizaron heridas de igual anchura en los distintos pocillos con una punta de pipeta estéril de 100 µL y, posteriormente, las células se sometieron a los diferentes

3. Materiales y Métodos

tratamientos. Los experimentos se realizaron por duplicado. Las tasas relativas de migración celular se cuantificaron determinando los cambios en el área de la herida a tiempo 0 y después de 12 y 24 horas de tratamiento. Para ello, se adquirieron imágenes utilizando un microscopio de epifluorescencia (Nikon Eclipse TS100). Dichas imágenes se analizaron con el *plug in* "Wound healing size tool" disponible en la versión 1.49 del software Fiji/ImageJ (<https://github.com/AlejandraArnedo/Wound-healing-size-tool/wiki>, consultado el 1 de julio de 2022).

3.4.7.2. Ensayo de migración transwell

El ensayo se realizó en placas de 24 pocillos con insertos transwell permeables de membrana de poliéster (tamaño de poro: 8 mm; Millipore, Madrid, España). Las células se sembraron (1×10^5 células/inserto) en un medio libre de suero en la cámara superior junto con los distintos tratamientos. En la cámara inferior se añadió medio de cultivo con un 10% de FBS para que actuara como quimioatrayente y los diferentes agentes a ensayar. Una vez transcurridas 24 horas de tratamiento, se determinó la proporción de células que migraron a través de los poros a la superficie inferior de los insertos. Para ello, las células se fijaron en una solución de etanol al 70% y se tiñeron con cristal violeta durante 10 minutos. A continuación, se tomaron imágenes de los insertos y se cortaron las membranas, colocándolas en una nueva placa de 24 pocillos. Por último, las membranas se incubaron con dodecil sulfato sódico (SDS) al 5% para extraer el cristal violeta (5 minutos en agitador orbital) y se leyó la absorbancia a 560 nm en un lector de microplacas (Infinite M200) para cuantificar la cantidad de células con capacidad de migrar en cada grupo experimental en función de los valores control (muestras no tratadas/muestras tratadas).

3.4.8. Captación y acumulación celular

La captación celular de las MSNs se observó mediante MET. Para ello, las células se sembraron en placas Petri de 100 mm (TPP®) y se trataron con 10 µg/mL de MSNs que contenían Pd(II) (MSN-PdTdTn o MSN-5MT-PdTdTn) durante 24 horas. A continuación, las células se tripsinizaron, se lavaron con PBS y se centrifugaron (5 minutos, 500×g). Posteriormente, se eliminó el sobrenadante, se fijaron los pellets celulares en glutaraldehído al 2,5%, se posfijaron en tetraóxido de osmio al 1%, se

deshidrataron en series graduales de etanol y se embebieron en resina epoxi. Posteriormente, se cortaron secciones ultrafinas y se tiñeron con azul de toluidina. La internalización de las NP y los cambios en la ultraestructura celular se analizaron mediante MET (JEOL JEM 1010).

Por otro lado, para comprobar qué cantidad de Pd(II) y/o Pt(II) se acumulaba en el interior de las células se utilizó la espectrometría de masas de plasma acoplado por inducción (ICP-MS). Para ello, se sembraron 5×10^6 células en placas Petri de 100 mm (TPP®) y se trataron con 100 $\mu\text{g/mL}$ de MSN-PdTdTn, MSN-5MT-PdTdTn, MSN-PtTdTn o MSN-5MT-PtTdTn durante 3 horas. A continuación, se tripsinizaron las células, se lavaron con PBS, se centrifugaron (5 minutos, 500 $\times g$) y se lisaron con un tampón de extracción y lisis RIPA (análisis de radioinmunoprecipitación) (Tabla 3.3.). Por último, tras una digestión con HNO_3 al 65%, las cantidades de metal se analizaron con un ICP-MS 7900 (Agilent Technologies).

Tabla 3.3. Composición del tampón RIPA.

Reactivos	Volumen	Concentración final
Tris-HCl 1M	2.5 mL	150 mM
NaCl 3M	2.5 mL	50 mM
Triton-X-100 10%	5 mL	1%
SDS 10%	0.5 mL	0,1%
Deoxicolato de sodio 10%	5 mL	1%
Agua Mili-Q	Hasta 50 mL	

3.4.9. Análisis estadístico

Los datos obtenidos se representaron como la media \pm la desviación estándar (DE). Se utilizó el análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguido de la prueba de Tukey o la prueba de Dunnett para determinar la significación estadística a fin de realizar comparaciones entre tratamientos. Las curvas dosis-respuesta de cada compuesto/nanomaterial se realizaron para obtener los valores de IC_{50} ajustando la curva mediante una ecuación sigmoidea dosis-respuesta de cuatro parámetros. Se consideró una diferencia estadísticamente significativa cuando $P < 0,05$. El software estadístico

3. *Materiales y Métodos*

utilizado fue GraphPad Prism 7.04 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, EE. UU.).

Además, los efectos de los compuestos individuales y de sus combinaciones con melatonina se utilizaron para calcular el índice de combinación (IC) mediante el software Compusyn (ComboSyn, Inc., Paramus, NJ, EE. UU.), siguiendo el método de Chou-Talalay (Cancer research, 2010). Los valores del IC indican cómo influyen las combinaciones de agentes seleccionados en su eficacia terapéutica (antagonista: $IC > 1$; aditivo: $IC = 1$; sinérgico: $IC < 1$) a diferentes intervalos de dosificación de la combinación.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Teniendo en cuenta los tres objetivos planteados en esta Tesis Doctoral, este apartado se ha dividido en tres capítulos de manera que cada uno de ellos está relacionado con el objetivo que se pretende alcanzar.

4.1. Efecto coadyuvante de la melatonina sobre la capacidad citotóxica de complejos de Pt(II) con ligandos bidentados derivados de heterociclos S,N y pirazol en la línea celular de cáncer de mama humano MDA-MB-231

4. Resultados y discusión

En primer lugar, se evaluó la actividad citotóxica de los complejos de Pt(II). Como se muestra en la Figura 4.1., PtDPhPzTn y PtDPhPzTz fueron los complejos que mostraron un mayor efecto citotóxico dependiente de la dosis en la línea celular de CMTN, MDA-MB-231, con valores de IC₅₀ de 10,47 ± 1,02 y 11,76 ± 1,07 μM, respectivamente (Tabla 4.1.). Estos valores son unas 5 veces inferiores al del fármaco de referencia CisPt (56,80 ± 2,41 μM; P < 0,05; Tabla 4.1.) y aproximadamente 3 y 6 veces inferiores a los de sus homólogos menos lipófilos PtPzTn y PtPzTz, respectivamente (33,51 ± 3,83 y 72,16 ± 1,86 μM; P < 0,05; Figura 4.1. y Tabla 4.1.). Estos resultados son similares a los obtenidos previamente por nuestro grupo de investigación, donde se observó la misma tendencia cuando los complejos de Pt(II) se ensayaron en otras líneas celulares tumorales como la línea de leucemia promielocítica humana HL-60, linfoma histiocítico humano U-937 y carcinoma epitelial de cuello uterino HeLa (Fernández-Delgado et al., 2022), donde se demostraba que PtDPhPzTn y PtDPhPzTz eran más citotóxicos que CisPt, PtPzTn y PtPzTz. Estos resultados sugieren que la incorporación de grupos aromáticos en el ligando puede conducir a una mejora de la citotoxicidad de los complejos de Pt(II), lo que fue especialmente llamativo en el caso de las células MDA-MB-231, ya que son células moderadamente resistentes al CisPt (IC₅₀ > 50 μM).

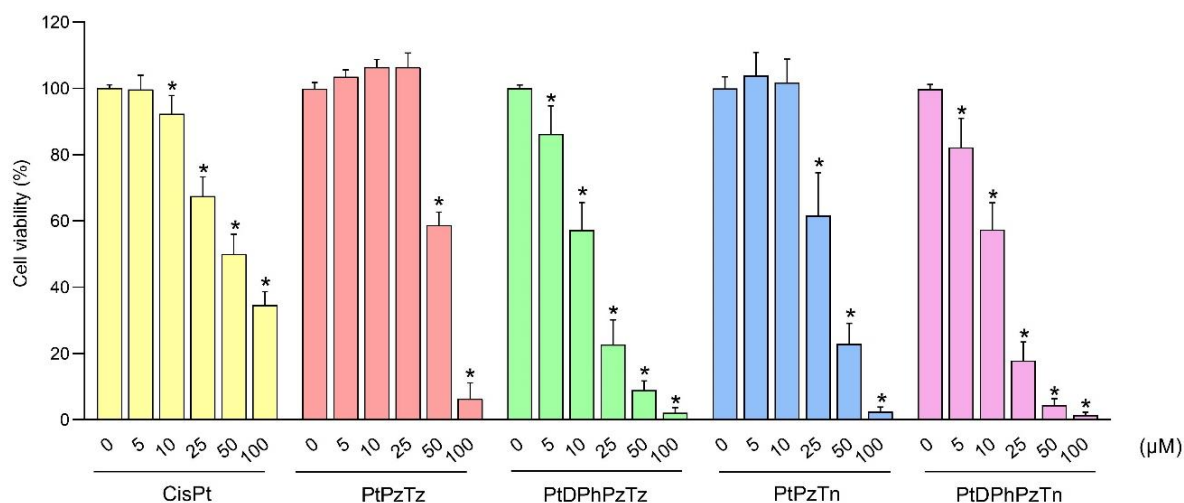


Figura 4.1. Curvas dosis-respuesta de los complejos de Pt(II) sobre la viabilidad celular en la línea celular MDA-MB-231. Las células se trataron durante 24 horas con concentraciones crecientes (0-100 μM) de CisPt, los complejos de Pt(II) PtPzTz, PtDPhPzTz, PtPzTn y PtDPhPzTn, o el vehículo (0,2% DMF (v/v), control). Los datos representan la media ± D.E. de 6 experimentos independientes y se expresan como porcentaje de los valores de control. *P < 0,05 en comparación con el control (test de Dunnett).

Tabla 4.1. Valores de IC_{50} (media \pm DE) de CisPt, PtPzTz, PtDPhPzTz, PtPzTn y PtDPhPzTn frente a la línea celular MDA-MB-231.

Compuestos	IC_{50} (μ M)
CisPt	$56,80 \pm 2,41^c$
PtPzTz	$72,16 \pm 1,86^d$
PtDPhPzTz	$11,76 \pm 1,07^a$
PtPzTn	$33,51 \pm 3,83^b$
PtDPhPzTn	$10,47 \pm 1,02^a$

Los valores que aparecen seguidos de una letra minúscula distinta son significativamente diferentes ($P < 0,05$; test de Tukey).

Dado que los complejos de Pt(II) PtDPhPzTn y PtDPhPzTz fueron los quimioterápicos con mayor citotoxicidad en las células MDA-MB-231, y conocidas las propiedades antiproliferativas de la melatonina en células tumorales, se decidió estudiar el impacto que podría producir el tratamiento combinado de PtDPhPzTn y PtDPhPzTz con melatonina en la progresión del ciclo celular de las células de CMTN. Para ello, se llevó a cabo un análisis de la distribución del ciclo celular. Así, cuando las células de CMTN fueron tratadas con la IC_{50} de PtDPhPzTn y PtDPhPzTz, solo se observó un arresto moderado de la fase S en las células tratadas con PtDPhPzTn ($55,32 \pm 4,28\%$ frente a $38,30 \pm 5,44\%$ en las células control; $P < 0,05$; Figura 4.2.) a expensas de la población de células en transición G2/M. Además, ambos complejos de Pt(II) provocaron un aumento no significativo de la población de células con contenido de ADN hipodiploide (células sub-G1; Figura 4.2.), lo que es indicativo de fragmentación del ADN. Aunque en la bibliografía consultada existe una amplia variedad de compuestos de Pt(II) que afectan a diferentes fases del ciclo celular de las células MDA-MB-231, cabe destacar que el CisPt (Foroodi et al., 2009) así como varios complejos dinucleares de Pt(II) (Czarnomysy et al., 2018; Hajipour et al., 2022) muestran en común la afectación, entre otras, de la fase S, al igual que ocurre con los complejos estudiados en la presente Tesis Doctoral.

Por otro lado, se observó la misma tendencia en los tratamientos combinados con los complejos de Pt(II) y la melatonina, aunque no se observó ningún efecto potenciador. De hecho, cuando las células de CMTN se trataron con $10,4 \mu$ M de PtDPhPzTn o $11,76 \mu$ M de PtDPhPzTz en presencia de 1 mM de melatonina, se produjo una acumulación significativa de células MDA-MB-231 en fase S en el tratamiento

4. Resultados y discusión

combinado con PtDPhPzTn ($53,18 \pm 6,39\%$ frente a $38,30 \pm 5,44\%$ en las células control; $P < 0,05$; Figura 4.2.). Además, la coincubación con los complejos de Pt(II) y la indolamina provocó un aumento no significativo del porcentaje de células con contenido de ADN hipodiploide (Figura 4.2.). Asimismo, la administración de melatonina por sí sola tampoco indujo cambios significativos en la distribución del ciclo celular de las células MDA-MB-231 (Figura 4.2.), lo que está de acuerdo con investigaciones previas que han mostrado una ausencia de efecto en el ciclo celular de las células de cáncer de mama por parte de la indolamina (Panzer et al., 1998).

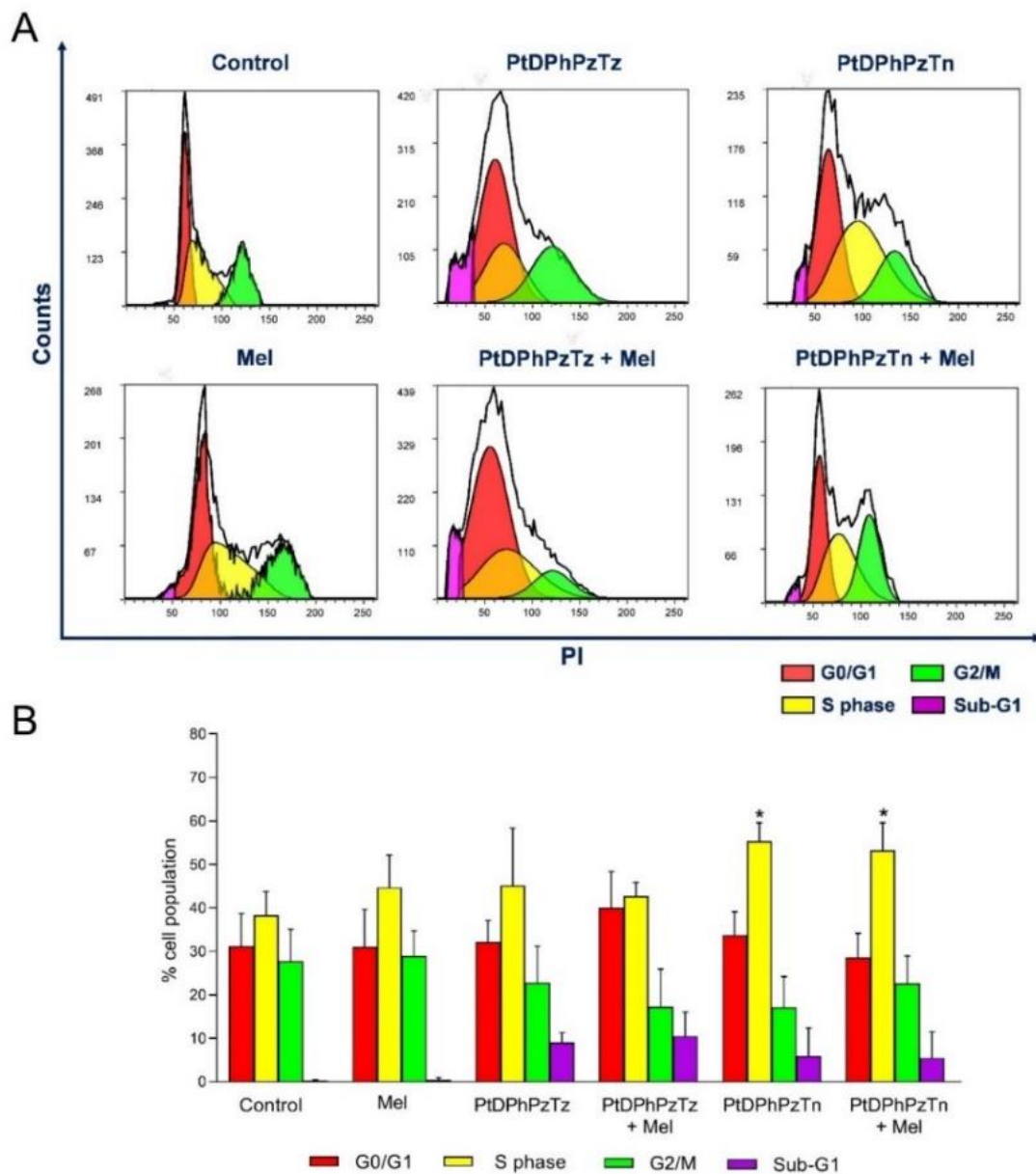


Figura 4.2. Efecto de los complejos de Pt(II) y melatonina en el perfil del ciclo celular de la línea celular MDA-MB-231. Las células se trataron con $10,47 \mu\text{M}$ de PtDPhPzTn y $11,76 \mu\text{M}$ de

*PtDPhPzTz, en presencia o ausencia de 1 mM melatonina (Mel), o con el vehículo (0,2% DMF/DMSO (v/v), control) durante 24 horas. (A) Citogramas representativos que muestran la distribución del ciclo celular después de tratar las células con los compuestos indicados. (B) Los histogramas muestran porcentajes de células en la transición G0/G1, fase S, transición G2/M y población sub-G1 (células hipodiploides). Los valores representan medias \pm DE de 5 experimentos independientes. * $P < 0,05$ en comparación con el control (test de Dunnett).*

Seguidamente, se determinó el efecto del tratamiento combinado de PtDPhPzTn o PtDPhPzTz con melatonina sobre la apoptosis en células de CMTN, analizando la externalización de la fosfatidilserina en presencia de PI. Para ello, las células MDA-MB-231 se trataron con la dosis IC_{50} fijada de PtDPhPzTn y PtDPhPzTz en ausencia o presencia de 1 mM de melatonina. Como se muestra en la Figura 4.3., los complejos de Pt(II) provocaron un aumento notable en la población de células necróticas secundarias ($2,78 \pm 1,04\%$ frente a $33,25 \pm 4,34\%$ para PtDPhPzTn, y $2,08 \pm 1,06\%$ frente a $43,99 \pm 14,5\%$ para PtDPhPzTz; $P < 0,05$) a expensas de un descenso significativo en la proporción de células vivas con respecto a las células control ($73,63 \pm 8,38\%$ frente a $32,13 \pm 11,98\%$ para PtDPhPzTn, y $82,41 \pm 13,71\%$ frente a $21,65 \pm 11,92\%$ para PtDPhPzTz; $P < 0,05$; Figura 4.3.). Esta actividad concuerda con nuestros resultados previos que indican que el efecto citotóxico de PtDPhPzTn y PtDPhPzTz estaban asociados con la inducción de la apoptosis mediada por ERO (Fernández-Delgado et al., 2022). En estudios anteriores se ha comprobado que complejos dinucleares de Pt(II) con el quimioterápico berenil en el entorno de coordinación del ion metálico y ligandos derivados del pirazol, especialmente los que contienen sustituyentes metilo en dicho anillo, mostraron una fuerte actividad pro-apoptótica en las líneas celulares de cáncer de mama MDA-MB-231 y MCF-7 (Czarnomysy et al., 2018). También se ha descrito que los complejos dinucleares de Pt(II) similares a los anteriores pero con ligandos derivados de piridina desencadenan modificaciones oxidativas y, posteriormente, apoptosis en las líneas celulares de cáncer de mama MDA-MB-231 y MCF-7 (Agnieszka et al., 2014; Bielawski et al., 2013). La melatonina por sí sola no produjo ningún efecto pro-apoptótico significativo en las células MDA-MB-231 (Figura 4.3.). Curiosamente, el tratamiento combinado de melatonina con PtDPhPzTn, pero no con PtDPhPzTz, potenció la inducción de apoptosis en las células de CMTN, como demuestra el notable aumento del porcentaje de células necróticas secundarias ($33,25 \pm 4,34\%$ frente a $49,11 \pm 10,86\%$; $P < 0,05$; Figura 4.3.) en comparación con las células tratadas solamente con PtDPhPzTn. Ya en estudios previos se ha demostrado que la melatonina potencia de forma sinérgica

4. Resultados y discusión

la función antitumoral en células MDA-MB-231 tratadas con tunicamicina (Woo et al., 2015), lo que está de acuerdo con los resultados aquí descritos. La acción potenciadora de la melatonina en la apoptosis inducida por fármacos clásicos, como doxorubicina, lapatinib y trióxido de arsénico, también se ha documentado en líneas celulares de cáncer de mama (Koşar et al., 2016; Nooshinfar et al., 2016; Sang et al., 2021; Tran et al., 2021) y puede estar relacionada con su capacidad prooxidante en células tumorales (Sang et al., 2021).

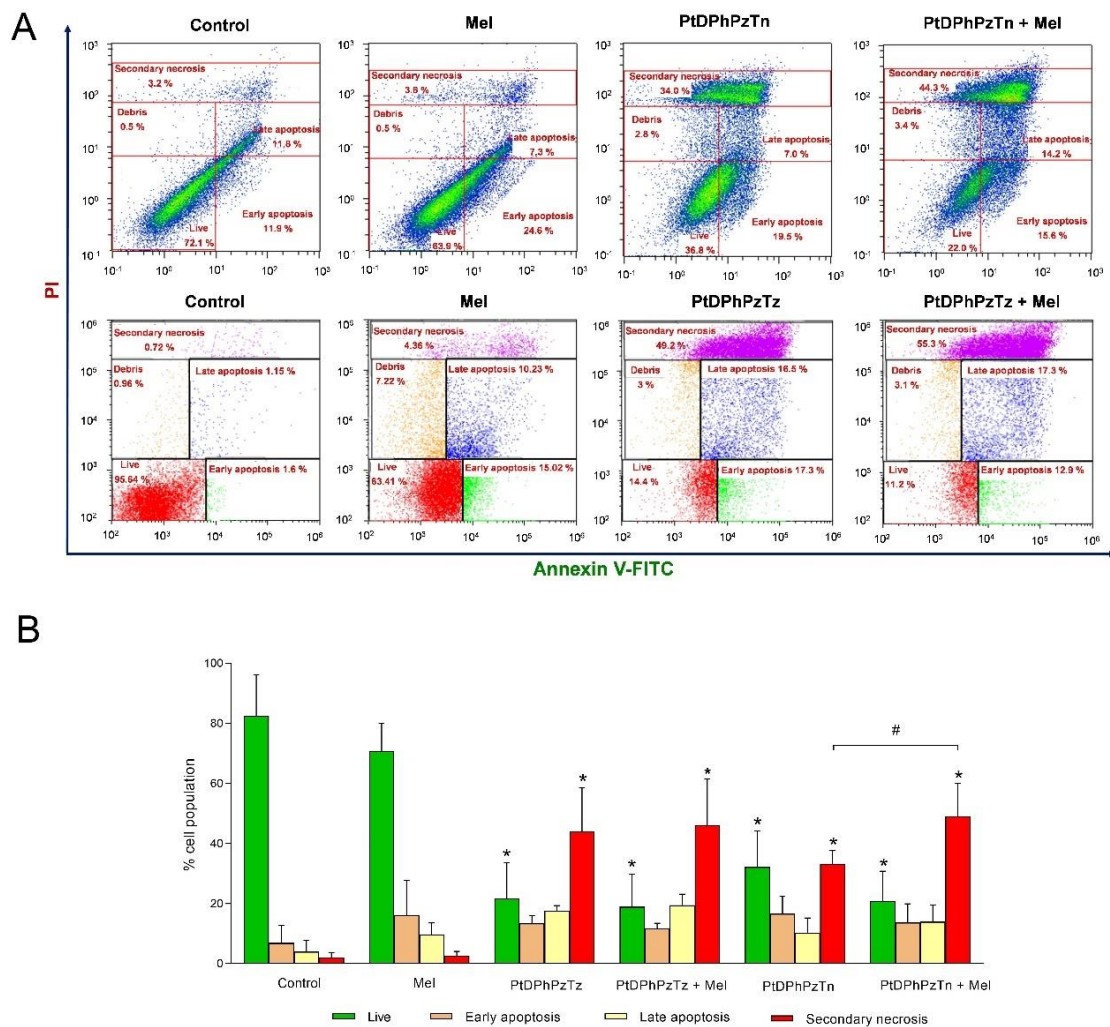


Figura 4.3. Efecto de PtDPhPzTn, PtDPhPzTz y melatonina sobre la apoptosis en la línea celular MDA-MB-231. Las células se trataron con 10,4 μM de PtDPhPzTn y 11,76 μM de PtDPhPzTz, en presencia o ausencia de 1 mM melatonina (Mel), o con el vehículo (0,2% DMF/DMSO (v/v), control) durante 24 horas. (A) Citogramas representativos que muestran la redistribución de la fosfatidilserina (tinción con anexina V-FITC) en presencia de yoduro de propidio (PI) tras el tratamiento de las células. (B) Los histogramas muestran los porcentajes de células vivas, apoptóticas tempranas, apoptóticas tardías y necróticas secundarias. Los valores representan la media \pm DE de 5 experimentos independientes. * $P < 0,05$ en comparación con el control (test de Dunnett). # $P < 0,05$ en comparación con las células tratadas con PtDPhPzTn (test de Tukey).

A continuación, para corroborar el efecto de la coincubación de PtDPhPzTn y melatonina, se trataron las células MDA-MB-231 con el complejo de Pt(II) y la indolamina a las dosis y combinaciones indicadas en la Tabla 4.2. y se determinó la muerte celular tras 24 horas para calcular los valores del IC (Figura 4.4.).

Tabla 4.2. Cálculo de los datos del índice de combinación (IC) para la combinación de PtDPhPzTn y melatonina en la inducción de la muerte celular.

PtDPhPzTn (μM)	Melatonina (mM)	Efecto (Fa)	IC
5	0,5	0,72	0,93
10	0,5	0,57	0,96
25	0,5	0,21	0,75
5	1	0,60	0,79
10	1	0,47	0,83
25	1	0,19	0,72
5	2	0,51	0,83
10	2	0,45	0,91
25	2	0,19	0,77

Los resultados mostraron un efecto sinérgico de la administración conjunta de PtDPhPzTn y melatonina, especialmente al combinar 1 mM de melatonina y las tres concentraciones (5, 10 y 25 μM) del complejo de Pt(II) (Tabla 4.2. y Figura 4.4.).

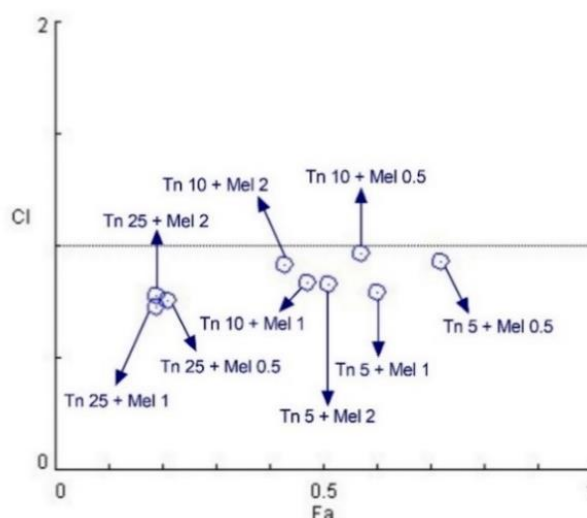


Figura 4.4. Efecto sinérgico de la combinación de PtDPhPzTn y melatonina en la línea celular MDA-MB-231. Se muestra un gráfico de estimación del tratamiento combinado mediante los valores del índice de combinación (CI, eje y) y la fracción de células afectada (Fa, eje x). Para el cálculo se utilizaron PtDPhPzTn (Tn; 5, 10 y 25 μM) y melatonina (Mel; 0,5, 1 y 2 mM) para inducir la muerte celular a las concentraciones indicadas durante 24 horas.

4. Resultados y discusión

Por otra parte, el complejo PtDPhPzTn resultó tener menor citotoxicidad en células epiteliales no tumorales de mama MCF10A que en las células tumorales, ya que la misma dosis de PtDPhPzTn ($10,4 \mu\text{M}$) sólo provocó una reducción moderada en el porcentaje de viabilidad celular de las células MCF10A vivas con respecto a las células control ($64,58 \pm 9,31\%$ frente a $84,76 \pm 8,14\%$; $P < 0,05$; Figura 4.5.). El hecho relevante de que complejos de Pt(II) muestren cierta selectividad en su actividad citotóxica no es habitual encontrarlo en la bibliografía; no obstante, resultados similares se han publicado para algunos complejos mononucleares de Pt(II) (Gao et al., 2009; Khoury et al., 2022). Además, la melatonina por sí sola no afectó a la apoptosis de las células MCF10A (Figura 4.5.), lo que concuerda con hallazgos previos que demuestran la ausencia de efecto sobre dichas células (Gelaleti et al., 2017; Jardín et al., 2021). En cuanto al tratamiento combinado, y contrariamente a lo que ocurrió en las células de cáncer de mama MDA-MB-231, la melatonina no produjo ningún efecto potenciador sobre la apoptosis inducida por PtDPhPzTn en las células MCF10A (Figura 4.5.), indicando así que este tratamiento combinado presenta menores acciones promotoras de la apoptosis en las células epiteliales mamarias no tumorales que en las células de cáncer de mama.

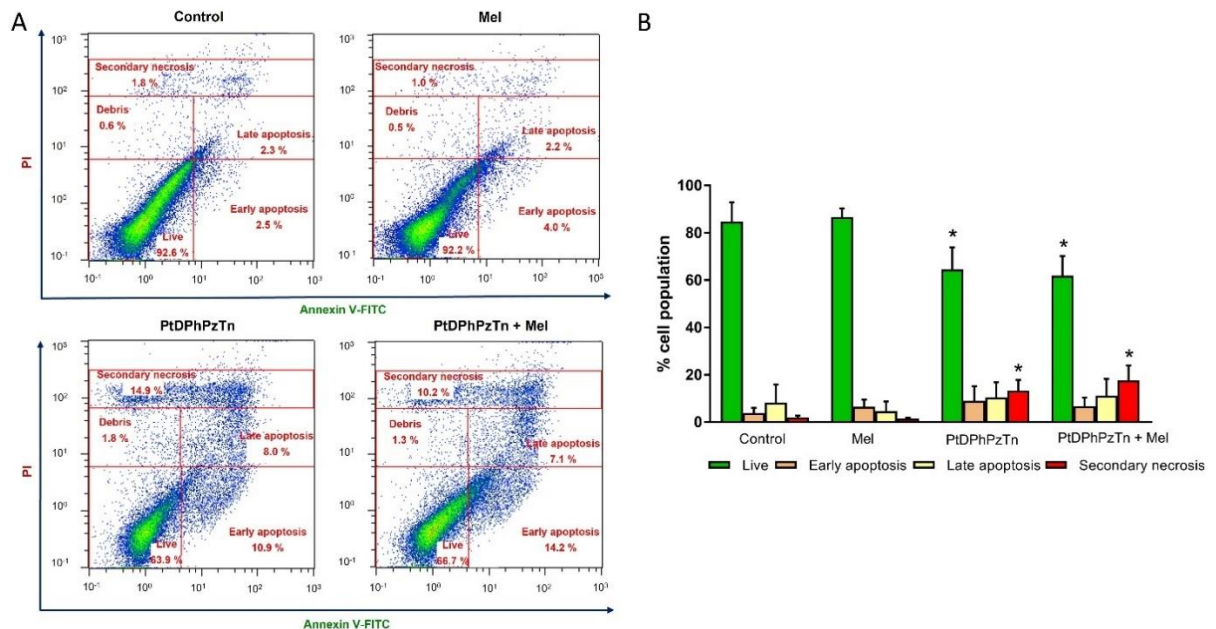


Figura 4.5. Efecto de PtDPhPzTn y melatonina sobre la apoptosis en la línea celular MCF10A. Las células se trataron con $10,4 \mu\text{M}$ de PtDPhPzTn en presencia o ausencia de 1 mM melatonina (Mel), o con el vehículo ($0,2\%$ DMF/DMSO (v/v), control) durante 24 horas. (A) Citogramas representativos que muestran la redistribución de la fosfatidilserina (tinción con anexina V-FITC) en presencia de yoduro de propidio (PI) tras el tratamiento de las células. (B) Los histogramas muestran los porcentajes de células vivas, apoptóticas tempranas, apoptóticas tardías y

*necróticas secundarias. Los valores representan la media \pm DE de 5 experimentos independientes. * $P < 0,05$ en comparación con el control (test de Dunnett).*

Para confirmar que el mecanismo de muerte celular provocado por el complejo PtDPhPzTn era la apoptosis, se determinó la activación de las caspasas, enzimas implicadas en el inicio y la ejecución de dicho proceso. Cuando las células MDA-MB-231 se trataron con $10,4 \mu\text{M}$ de PtDPhPzTn durante 24 horas, se observó un aumento notable de la proporción de células caspasa-3 positivas ($60,17 \pm 4,27\%$ frente a $14,57 \pm 9,08\%$; $P < 0,05$; Figura 4.6. A, C) y caspasa-9 positivas ($70,63 \pm 6,37\%$ frente a $15,07 \pm 4,67\%$; $P < 0,05$; Figura 4.6. B, D), lo que indica que el complejo de Pt(II) desencadenó la apoptosis intrínseca en la línea celular de CMTN. A pesar de que existen pocas referencias bibliográficas sobre el efecto que puedan tener complejos planocuatridos de Pt(II) en la activación de las caspasas en células tumorales de cáncer de mama, existen algunos ejemplos de compuestos de coordinación mononucleares de Pt(II) que provocan apoptosis a través de la vía mitocondrial dependiente de caspasa-9 y -3 en células MDA-MB-231 y SK-BR-3 (Bazsefidpar et al., 2023; Maciel et al., 2022). Cabe destacar que el tratamiento combinado de PtDPhPzTn y melatonina potenció moderadamente la activación de las caspasa-3 y -9, aunque este efecto no fue estadísticamente significativo en comparación con el tratamiento con PtDPhPzTn solo ($78,28 \pm 10,30\%$ frente a $60,17 \pm 4,27\%$ y $86,30 \pm 8,43\%$ frente a $70,63 \pm 6,37\%$ para caspasa-3 y -9, respectivamente; Figura 4.6.). De nuevo, la administración de la melatonina sola no produjo ningún efecto significativo sobre la activación de la caspasa-3 y -9 en las células MDA-MB-231 (Figura 4.6.).

4. Resultados y discusión

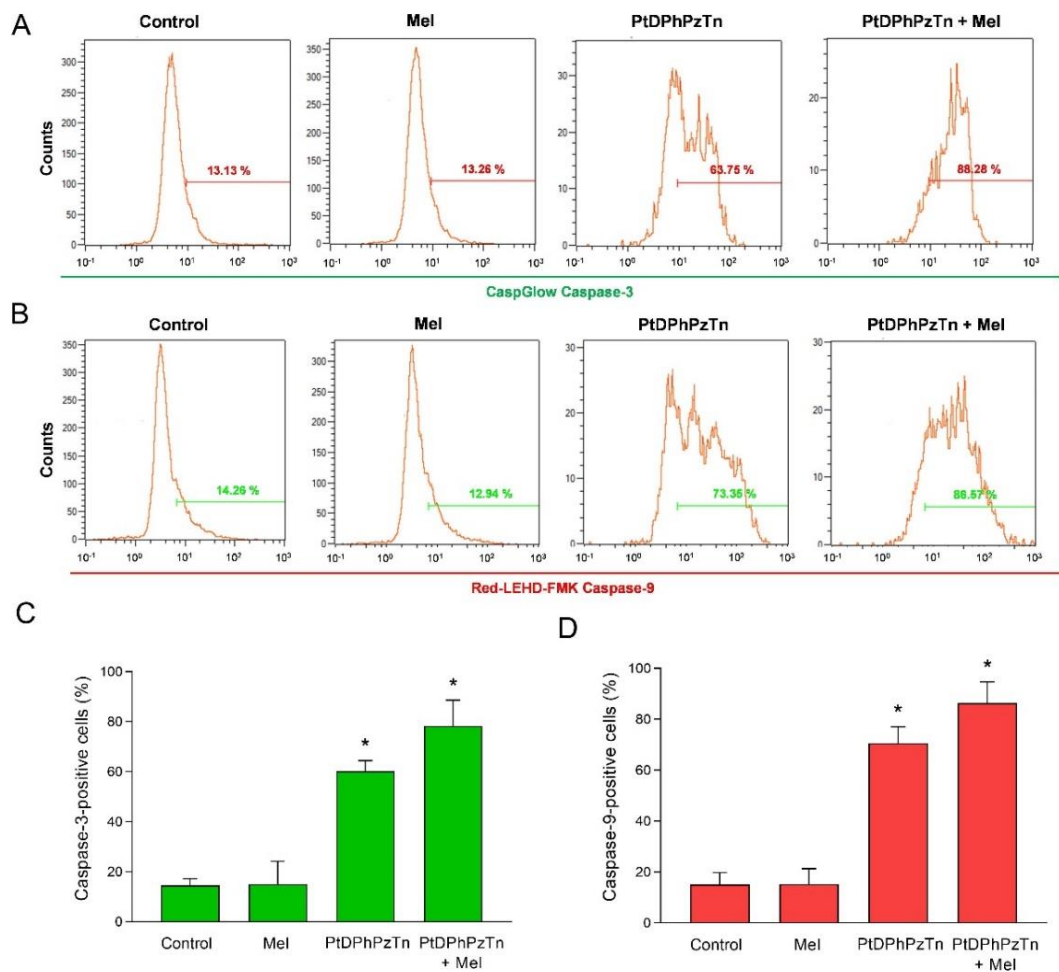


Figura 4.6. Efecto del tratamiento de PtDPhPzTn y melatonina sobre la activación de la caspasa-3 y -9 en células MDA-MB-231. Las células se trataron con 10,4 μM de PtDPhPzTn en presencia o ausencia de 1 mM melatonina (Mel), o el vehículo (0,2% DMF/DMSO (v/v), control) durante 24 horas. Los citogramas representativos muestran la activación de la caspasa-3 (A) y -9 (B) después de tratar las células con los compuestos indicados. Los histogramas representan los porcentajes de células MDA-MB-231 positivas para caspasa-3 (C) y para caspasa-9 (D). Los valores se presentan como media \pm DE de 4 experimentos independientes. * $P < 0,05$ en comparación con el control (test de Dunnett).

Por otro lado, también se investigó la participación de las ERO en el proceso apoptótico provocado por el complejo de Pt(II). Nuestros resultados muestran que el PtDPhPzTn aumentó notablemente la producción intracelular de ERO después de 4 horas de tratamiento ($20,70\% \pm 3,66$ frente a $7,35 \pm 1,15\%$ de células DCF-positivas; $P < 0,05$; Figura 4.7.), lo que condujo a la muerte celular por apoptosis. Estos resultados son coherentes con otros trabajos que describen que otros complejos de Pt(II) también ejercen su efecto citotóxico en células de cáncer de mama a través de la apoptosis mediada por

estrés oxidativo (Bielawski et al., 2013). Además, el tratamiento combinado con PtDPhPzTn y melatonina aumentó aún más la producción intracelular de ERO, aunque este efecto no fue estadísticamente significativo en comparación con las células tratadas con PtDPhPzTn solo ($26,29 \pm 5,39\%$ frente a $20,70 \pm 3,66\%$ células DCF-positivas; $P < 0,05$; Figura 4.7.). En cuanto a la melatonina sola, ésta no produjo ningún cambio en la producción de ERO de las células MDA-MB-231 (Figura 4.7.).

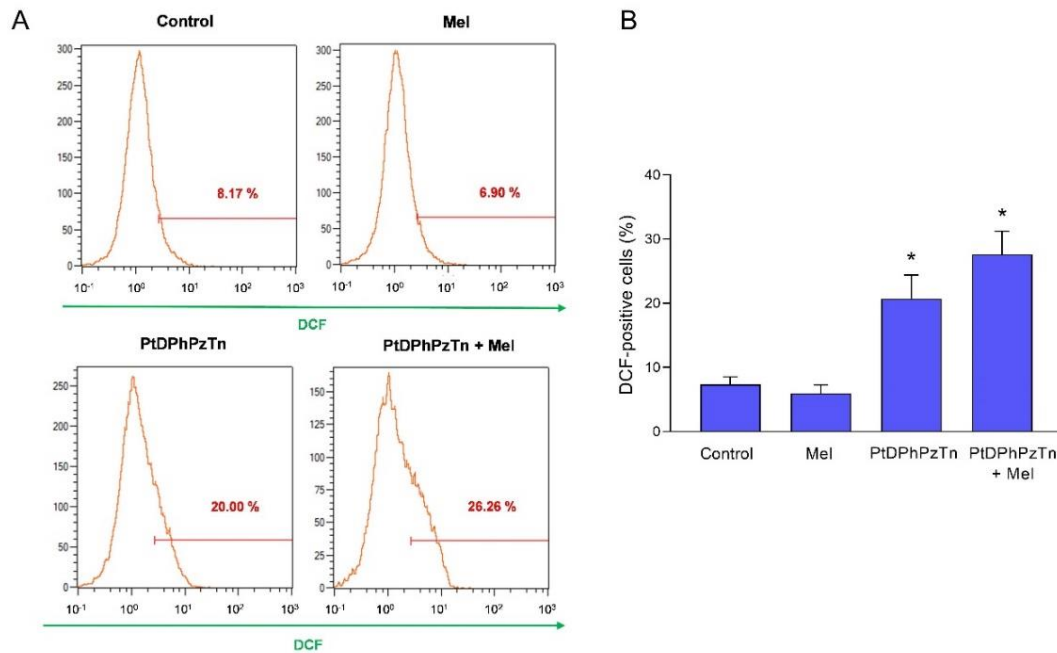


Figura 4.7. Efecto del tratamiento de PtDPhPzTn y melatonina sobre la producción de especies reactivas del oxígeno (ERO) en células MDA-MB-231. Las células se trataron con $10,4 \mu\text{M}$ de PtDPhPzTn en presencia o ausencia de 1 mM melatonina (Mel), o el vehículo ($0,2\%$ DMF/DMSO (v/v), control) durante 4 horas. (A) Citogramas representativos que muestran la producción de ERO después de los tratamientos indicados. (B) Los histogramas representan los porcentajes de células MDA-MB-231 teñidas con DCF. Los valores se presentan como media \pm DE de 4 experimentos independientes. * $P < 0,05$ en comparación con el control (test de Dunnett).

Finalmente, se analizó la habilidad del complejo de Pt(II) PtDPhPzTn para modular la capacidad de migración celular de las células de CMTN mediante ensayos de migración en 2D (cierre de herida) y 3D (transwell). Como se muestra en el ensayo de cierre de herida, el complejo PtDPhPzTn afectó en gran medida la capacidad de las células MDA-MB-231 para migrar después de 12 ($29,76 \pm 13,11\%$ frente a $66,79 \pm 8,40\%$ en las células control; $P < 0,05$; Figura 4.8.A, B) y 24 horas de tratamiento ($66,19 \pm 24,20\%$ frente a $98,44 \pm 3,26\%$ en las células control; $P < 0,05$; Figura 4.8.A, B), lo que sugiere que este compuesto puede ser útil para bloquear la migración metastásica de las células

4. Resultados y discusión

de cáncer de mama. La misma tendencia se observó en el ensayo de migración transwell, donde el complejo de Pt(II) mitigó casi por completo la capacidad de migración de las células MDA-MB-231 ($P < 0,05$; Figura 4.8. C). En este sentido, otros autores han sintetizado complejos de Pt(II) con el ligando meta-N,N-difenilpiridinamina (Gamboa Varela et al., 2014) o ligandos tridentados obtenidos a partir de la reacción 2-(feniltio)anilina y salicilaldehído (Bai et al., 2021) con potencial para suprimir la capacidad de migración celular de las células de CNMT. En cuanto al tratamiento combinado, la exposición de las células MDA-MB-231 con $10,4 \mu\text{M}$ de PtDPhPzTn en presencia de 1 mM de melatonina mejoró notablemente el efecto antimigratorio del complejo de Pt(II) después de 12 ($15,57 \pm 7,53\%$ frente a $29,76 \pm 13,11\%$ en células tratadas con PtDPhPzTn, $P < 0,05$; Figura 4.8.A, B) y 24 horas de incubación ($37,85 \pm 12,93\%$ frente a $66,19 \pm 24,20\%$ en células tratadas con PtDPhPzTn; $P < 0,05$; Figura 4.8.A, B). Con respecto al ensayo de migración 3D, el tratamiento combinado con PtDPhPzTn y melatonina disminuyó la proporción de células migratorias en la misma medida que el complejo de Pt(II) solo ($P < 0,05$; Figura 4.8. C). Otros estudios también han demostrado que la indolamina mejora sinérgicamente las propiedades antimigratorias de apatinib, un inhibidor de la tirosina quinasa que inhibe la angiogénesis en células madre de cáncer de mama derivadas de células MDA-MB-231 (Maroufi et al., 2022). Igualmente, se han probado nuevos conjugados de fármacos melatonina-tamoxifeno para inhibir eficazmente la migración en diferentes líneas celulares de cáncer de mama, incluidas líneas tumorales resistentes al tamoxifeno (antitumoral empleado en el cáncer de mama positivo a estrógenos) (Hasan et al., 2019). No obstante, aunque se ha descrito que la melatonina inhibe el potencial de invasión celular en las líneas celulares de cáncer de mama MDA-MB-231 y MCF-7 (El-Sokkary et al., 2019), la indolamina por sí misma sólo provocó una reducción moderada y no significativa en la capacidad de las células de CMTN para migrar en el ensayo de cicatrización de herida (Figura 4.8.A, B) y no mostró ningún efecto en el ensayo de migración 3D (Figura 4.8.C).

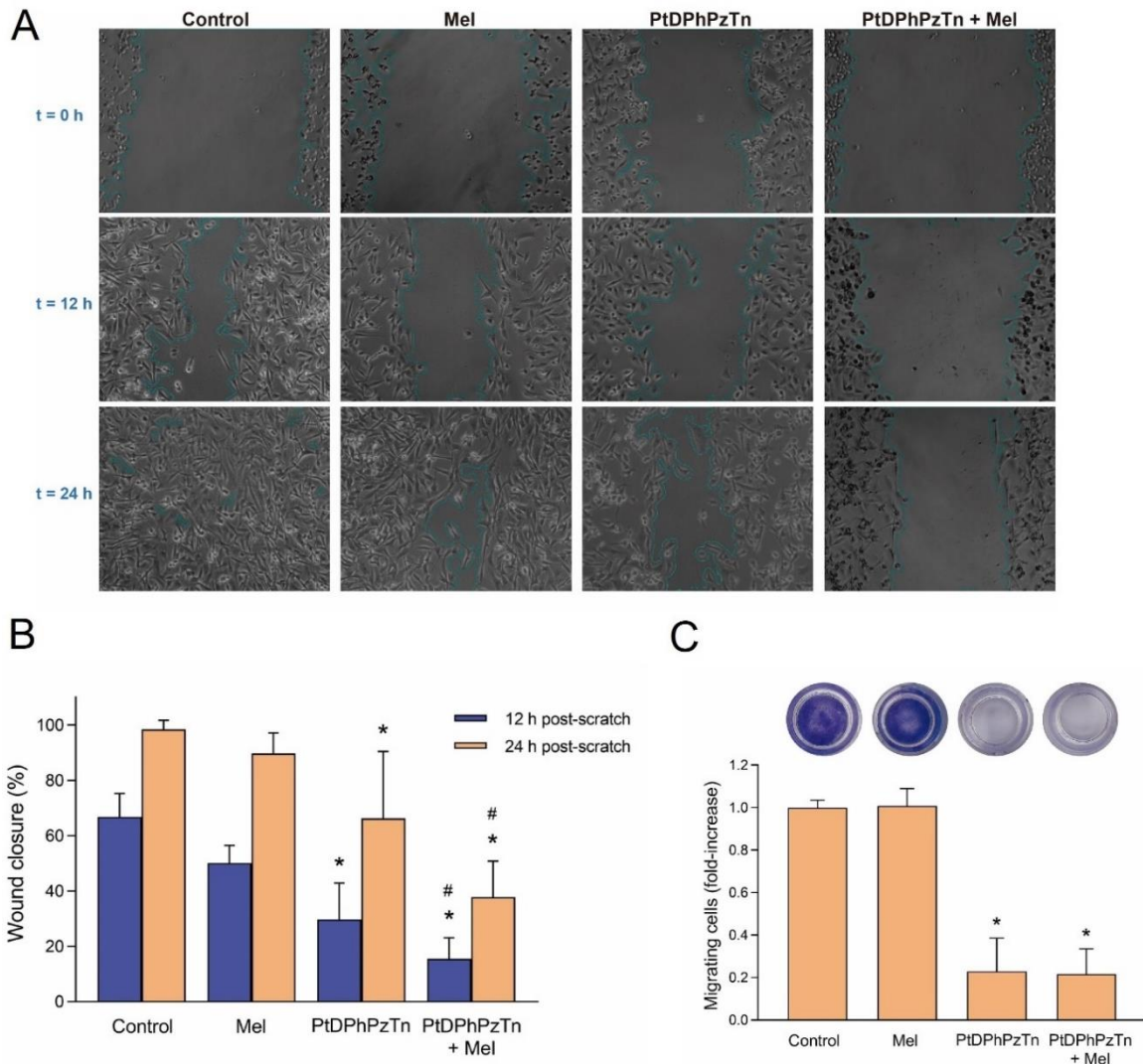


Figura 4.8. Efecto del complejo de Pt(II) y la melatonina sobre las propiedades de migración en la línea celular MDA-MB-231. Las células se trataron con $10,4 \mu\text{M}$ de PtDPhPzTn en presencia o ausencia de 1 mM melatonina (Mel) y el vehículo ($0,2\%$ DMF/DMSO (v/v), control) durante 24 horas. (A) Imágenes representativas del ensayo de cierre de herida. (B) Los histogramas muestran el porcentaje de cierre de la herida después de 12 y 24 horas, donde el 100% representa una herida completamente cerrada. Los valores representan la media \pm DE de 12 experimentos independientes. (C) Proporción de células con capacidad migratoria mediante el ensayo de migración transwell. En la parte superior se muestran imágenes representativas de los insertos de transwell para cada condición. Los datos representan la media \pm DE de 5 experimentos independientes. * $P < 0,05$ respecto a su correspondiente valor de control (test de Dunnett). # $P < 0,05$ en comparación con el valor correspondiente de PtDPhPzTn (test de Tukey).

4.2. Papel modulador del derivado de melatonina 5MT sobre la actividad citotóxica y pro-apoptótica de MSNs funcionalizadas con dos complejos de Pt(II) y Pd(II) con ligandos derivados de 2-tiazolina en la línea celular de cáncer de cuello uterino humano HeLa.

4. Resultados y discusión

Para el desarrollo de este apartado, se sintetizaron tres series de nanomateriales funcionalizados con los agentes citotóxicos TdTn, PdTdTn o PtTdTn y un derivado de la melatonina (5MT). Posteriormente, todos los materiales se caracterizaron minuciosamente mediante diferentes técnicas fisicoquímicas y se estudiaron sus actividades biológicas.

En primer lugar, para la caracterización de los materiales preparados se realizó un DRX. Como se puede observar, la Figura 4.9. muestra un pico intenso en aproximadamente $2,4^\circ$, correspondiente al plano de Miller (100), y dos picos de muy baja intensidad en $4,2^\circ$ y $4,9^\circ$, correspondientes a los planos (110) y (200), lo que es típico de la estructura mesoporosa ordenada de la familia de sílices MCM-41. Después de realizar las reacciones de funcionalización con MP, TEDTS y, posteriormente, la molécula diana 5MT (Figura 4.9. B), las intensidades de los picos disminuyeron claramente debido a la incorporación de las moléculas en el interior de los poros, las cuales bloquean los puntos de dispersión de los materiales resultando en una clara disminución de la intensidad de difracción. De hecho, se puede observar claramente que la disminución de la intensidad relativa es más pronunciada en los materiales finales, como puede verse en la Figura 4.9. A para los sistemas MSN-PdTdTn y MSN-PtTdTn.

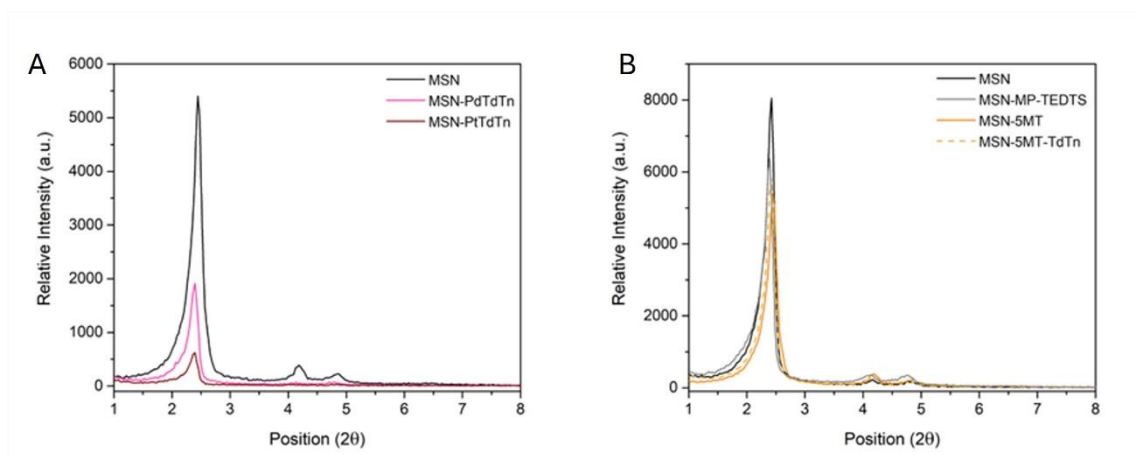


Figura 4.9. Patrones de difracción de rayos X (DRX). (A) MSN con complejos metálicos. (B) MSN-5MT con y sin ligando TdTn.

A continuación, mediante el análisis de un espectro UV-Vis en estado sólido se corroboró la información obtenida de las medidas de DRX, ya que, tras las sucesivas incorporaciones, las bandas de absorción se vieron modificadas. La Figura 4.10. A muestra como la funcionalización de las MSNs con un complejo metálico (PtTdTn o PdTdTn) produce una banda ancha de absorción intensa entre 250 y 400 nm asignable a

una transferencia de carga ligando-metal y a transiciones d-d (Shaker et al., 2022). El mismo comportamiento mostraron los materiales funcionalizados con 5MT como se puede ver en la Figura 4.10. B, donde se observa una banda de absorción adicional alrededor de 228 nm asociada a la incorporación del agente director 5MT, aunque queda enmascarada por la gran absorción de los complejos metálicos.

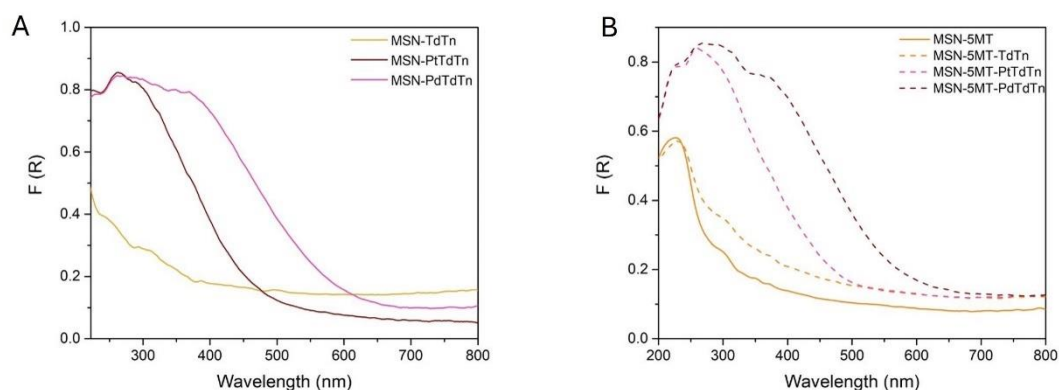


Figura 4.10. Espectros UV-Vis en estado sólido. (A) MSN con complejos metálicos o ligando TdTn sin 5MT. (B) MSN con complejos metálicos o ligando TdTn con 5MT.

Seguidamente, la cuantificación de la funcionalización de los diferentes fragmentos se llevó a cabo por TG o ICP-AES (Tabla 4.3.). La incorporación de los ligandos MP y TEDTS determinada por TG (7,12% en masa para MP y 5,27% en masa para TEDTS) muestra tasas de funcionalización similar a otros ligandos incorporados bajo las mismas condiciones sobre MSNs (Díaz-García et al., 2020). La funcionalización con el ligando TEDTS permitió la incorporación del derivado de melatonina 5MT mediante un acoplamiento de amidación catalizado por EDAC. Como se muestra en la Tabla 4.3., el porcentaje en masa incorporado de 5MT es relativamente bajo (0,35%); sin embargo, la incorporación de este fragmento a los sistemas nanoestructurados es suficiente para proporcionar una mayor selectividad a los sistemas diseñados, como veremos en los estudios biológicos. Del mismo modo, la funcionalización con MP permitió la incorporación del ligando TdTn por adsorción a través de interacciones intermoleculares o de los complejos metálicos (PtTdTn y PdTdTn) mediante una reacción de protonólisis en presencia de trietilamina.

Además, la Tabla 4.3. muestra la cantidad de metal incorporado en el material siendo mucho menor cuando el sistema presenta 5MT (4 veces menos en el caso de los materiales funcionalizados con Pd(II) y casi 8 veces menos en el caso de los

4. Resultados y discusión

funcionalizados con Pt(II)), ya que el área superficial de estos materiales es menor y la accesibilidad de los grupos tiol a los complejos metálicos disminuye considerablemente. El mismo comportamiento se observa con la incorporación del ligando TdTn en la sílice de partida y en MSN-5MT, donde el cálculo de los porcentajes de funcionalización tanto para el ligando TdTn como para el 5MT se realizaron a partir de los gráficos TG asociados (Figura 4.11.). Así, el análisis de los materiales con TdTn (Figura 4.11.) muestra una incorporación de ligando hasta 8 veces mayor cuando la sílice no está funcionalizada con 5MT. Sin embargo, comparando la cantidad de TdTn en todos los materiales (incluidos los compuestos metálicos), se observa un mayor porcentaje de TdTn cuando éste forma parte de un complejo metálico que cuando el TdTn es el único agente incorporado en las MSNs (MSN-TdTn), lo que probablemente se deba a que la incorporación de los complejos metálicos se realiza mediante enlace covalente, aumentando la estabilidad y disminuyendo la liberación no controlada del ligando (Tabla 4.3.).

Tabla 4.3. Cuantificación de la incorporación de 5MT, TdTn, Pt(II) y Pd(II).

MATERIAL	%5MT ^a	%TdTn ^a	%Pt ^b	%Pd ^b
MSN-TdTn	-	1,78	-	-
MSN-PtTdTn	-	11,58	6,80	-
MSN-PdTdTn	-	6,56	-	2,10
MSN-5MT		-	-	-
MSN-5MT-TdTn	0,35	0,21	-	-
MSN-5MT-PtTdTn		1,47	0,86	-
MSN-5MT-PdTdTn		1,52	-	0,49

^a Cuantificado por TG; ^b Cuantificado por ICP-AES

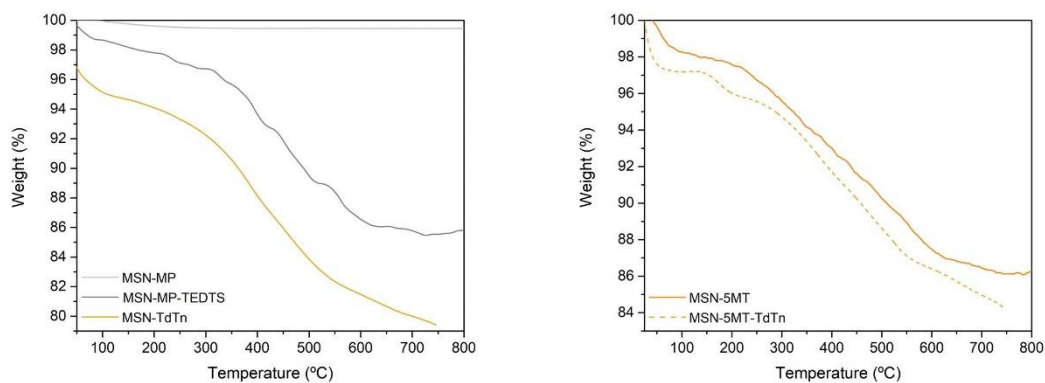


Figura 4.11. Análisis termogravimétrico de MSN-5MT con y sin ligando TdTn de materiales de sílice funcionalizados.

Para confirmar la naturaleza porosa de las sílices sintetizadas y cómo cambian las características superficiales y porosas de los sistemas tras la funcionalización con los diferentes agentes, se llevaron a cabo isoterma de adsorción-desorción de N_2 (Figura 4.12.). Las isoterma se identificaron como tipo II según la clasificación de la *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC) (Sing et al., 1985). Las muestras de MSNs mostraron un aumento del volumen de nitrógeno adsorbido a valores de P/P_0 en torno a 0,2 y 1, junto con la aparición de un pequeño bucle de histéresis tipo H1 (Sing & Williams, 2004), con una meseta a P/P_0 alto, lo que sugiere la condensación del nitrógeno en el interior de los mesoporos. Es importante señalar que los materiales MSNs estudiados tienen una estructura interna uniforme con una distribución hexagonal de los poros con un diámetro controlado de unos 2,8 nm (evaluado por Barrett-Joyner-Halenda (BJH)), que no se ve muy afectada tras varios pasos de funcionalización (Tabla 4.4.). Sin embargo, el volumen de poros y el área superficial de la sílice (medidos por Brunauer-Emmett-Teller (BET)) se ven afectados tras la funcionalización. El área superficial de la sílice de partida es superior a $1000 \text{ m}^2/\text{g}$ mientras que, al incorporar los diferentes fragmentos, se redujo hasta 1,4 veces. Una tendencia similar se encontró al analizar el volumen de poros, que disminuye incluso a más de la mitad de su capacidad en comparación con las MSNs iniciales (de $0,80$ a $0,39 \text{ cm}^3/\text{g}$ en el caso del material final MSN-5MT-PdTdTn). Estos cambios en los parámetros superficiales indican que se produjo una funcionalización homogénea tanto en la superficie del material como en el interior de los poros.

4. Resultados y discusión

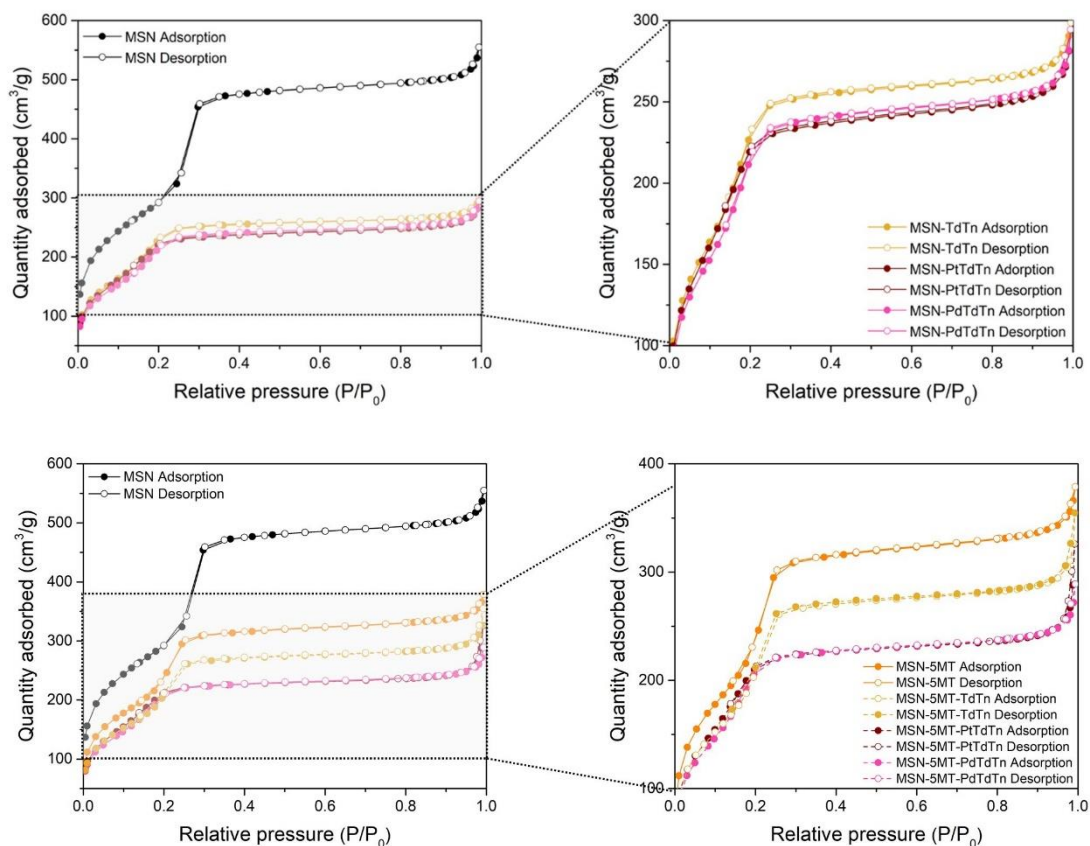


Figure 4.12. *Isotermas de adsorción-desorción de las distintas MSNs.*

Tabla 4.4. *Propiedades de los materiales de sílice determinadas mediante análisis BJH y BET.*

MATERIAL	S_{BET} (m ² /g)	Volumen del poro (cm ³ /g)	Diámetro de poro (nm)
MSN	1064	0,80	2,8
MSN-5MT	901	0,54	2,8
MSN-TdTn	878	0,43	2,6
MSN-PtTdTn	856	0,41	2,8
MSN-PdTdTn	818	0,41	2,7
MSN-5MT-TdTn	761	0,47	2,9
MSN-5MT-PtTdTn	825	0,40	2,9
MSN-5MT-PdTdTn	808	0,39	2,8

Para estudiar la morfología y el tamaño de las MSNs se realizaron análisis de MET y MEB. En las imágenes de MET, se puede observar cómo las partículas tienen una forma hexagonal casi esférica (Figura 4.13.). Además, el histograma del tamaño de partícula de los materiales muestra una gran homogeneidad con una media de 318 ± 32 nm. También

se observa como las partículas muestran una alta dispersabilidad, no formando grandes agregados, lo cual es beneficioso para su posterior uso en estudios biológicos. Por otro lado, el análisis de MEB muestra una imagen tridimensional de las nanopartículas, observándose la morfología esférica homogénea (Figura 4.14.).

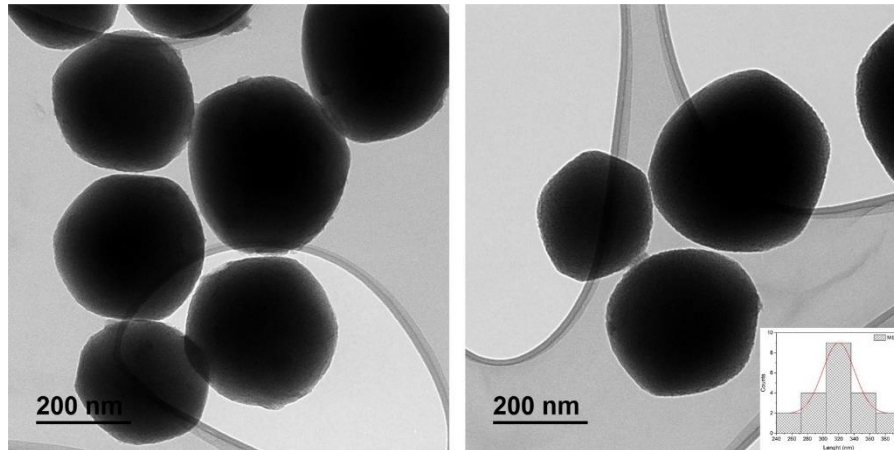


Figura 4.13. Imágenes MET de las MSNs de partida e histograma de la distribución del tamaño de las nanopartículas.

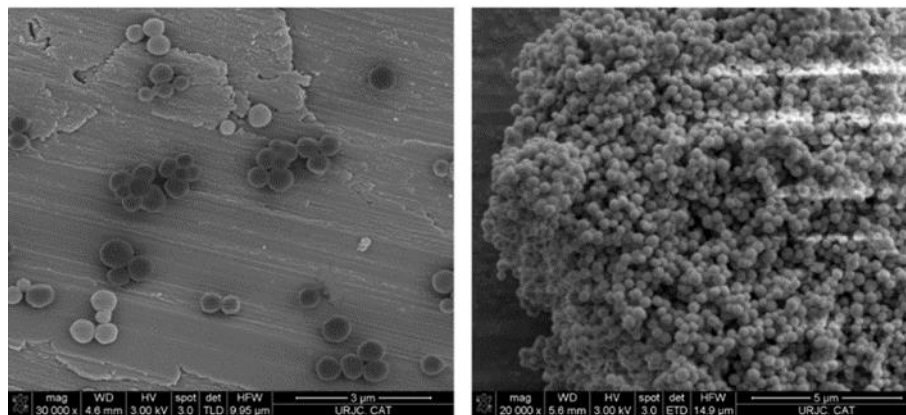


Figura 4.14. Imágenes MEB de las MSNs de partida a diferentes escalas.

Para confirmar que los sistemas nanoparticulados diseñados actúan como sistemas "no clásicos" de liberación de fármacos, se llevó a cabo un estudio de liberación de metales en un entorno fisiológico simulado. Todos los materiales mostraron una liberación de metal inferior al 0,6% respecto a su carga metálica inicial (Tabla 4.5.), lo que indica que la potencial actividad biológica de estos sistemas no se debe principalmente a la liberación de especies solubles de Pt o Pd en la zona diana, ya que la incorporación de los compuestos metálicos por unión covalente hace que el sistema sea

4. Resultados y discusión

muy estable y no libere fácilmente las especies metálicas. Esto también se puede observar porque tras la incubación de los materiales a largos periodos de tiempo (48 horas), la concentración de Pt o Pd liberada en el medio no aumenta significativamente con respecto a tiempos de incubación más cortos. De hecho, se produce una baja liberación de metales después de las 3 primeras horas y, tras mantener el material en el medio fisiológico a tiempos de incubación más largos, se produce un equilibrio de desorción-adsorción de las especies liberadas. Este comportamiento es comparable con el encontrado en estudios previos, en los que materiales basados en sílice funcionalizados con compuestos metálicos unidos covalentemente no mostraron liberación de especies metálicas, incluso a altos tiempos de incubación, actuando como prometedores agentes citotóxicos (Pu et al., 2019).

Tabla 4.5. Porcentaje en masa de liberación de Pd o Pt a diferentes tiempos de incubación.

MATERIAL	Tiempo (h)	% Liberación del metal ($\pm 0,001$)
MSN-PtTdTn	3	0,044
	24	0,044
	48	0,044
MSN-PdTdTn	3	0,024
	24	0,024
	48	0,024
MSN-5MT-PtTdTn	3	0,536
	24	0,360
	48	0,349
MSN-5MT-PdTdTn	3	0,102
	24	0,069
	48	0,126

A continuación, se realizó un estudio de interacción con ADN libre de los nanomateriales MSN-PdTdTn y MSN-PtTdTn a diferentes tiempos de incubación. Para ello, se registró la absorción de las NP estudiadas mediante espectros UV en presencia de FS-ADN (Figura 4.15). Para el caso de la MSN-PtTdTn (Figura 4.15. A), los picos máximos de absorción del ADN disminuyeron significativamente al aumentar el tiempo de incubación manteniendo la estructura del espectro del ADN libre. Este comportamiento concuerda con el observado para otros complejos de Pt(II), que tienden

a formar aductos estables a través de las guaninas del ADN, llevando a las células a la detención del ciclo celular en fase G2 (H. He et al., 2014). Sin embargo, el comportamiento del complejo de Pd(II) tras la incubación con ADN fue ligeramente diferente (Figura 4.15. B). El pico de mayor intensidad del ADN (alrededor de 260 nm) disminuye ligeramente de intensidad a tiempos de incubación más largos, pero no de forma tan significativa como en el caso del complejo de Pt(II). Sin embargo, el pico situado en torno a 215 nm cambia su relación de intensidad con respecto al pico principal a medida que aumenta el tiempo de incubación, cambiando la morfología del gráfico con respecto al ADN libre. Este comportamiento se ha observado previamente en otros complejos de Pd(II), en los que se produce un desplazamiento a longitudes de ondas mayores debido a las bandas de transición $\pi \rightarrow \pi^*/n \rightarrow \pi^*$ a medida que el complejo se incubaba con mayor cantidad de ADN (Choudante et al., 2022). Esto puede indicar que el complejo de Pd funcionalizado en sílice también interactúa con el ADN, una de las dianas terapéuticas, pero con un mecanismo de acción diferente al compuesto de Pt(II).

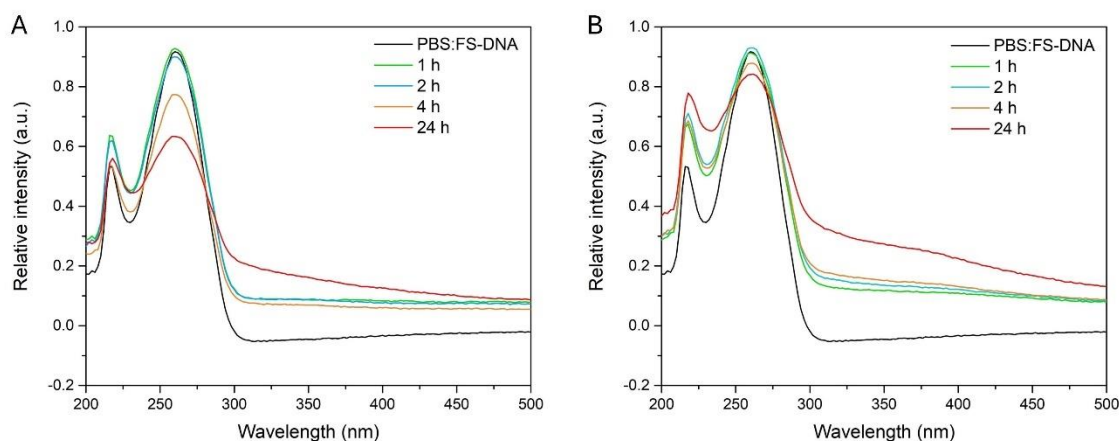


Figura 4.15. Espectros UV de FS-DNA a diferentes tiempos de incubación con (A) MSN-PtTdTn y (B) MSN-PdTdTn.

En los estudios biológicos, primero se confirmó la acumulación de las MSNs en el interior de las células mediante MET, debido a la presencia de NP endocitadas (Figura 4.16. A, B) o clústeres de MSNs (Figura 4.16. C, D) en el citoplasma de las células HeLa. En esta línea celular, estudios previos indican que las MSNs podrían entrar en las células por endocitosis y luego liberar los metaloides al citosol (Morelli et al., 2011; Wang et al., 2015). Varios mecanismos endocíticos, como la endocitosis mediada por clatrina, la

4. Resultados y discusión

endocitosis mediada por caveolas y la micropinocitosis, pueden influir en la cinética intracelular y en el destino final de las NP (Pu et al., 2019).

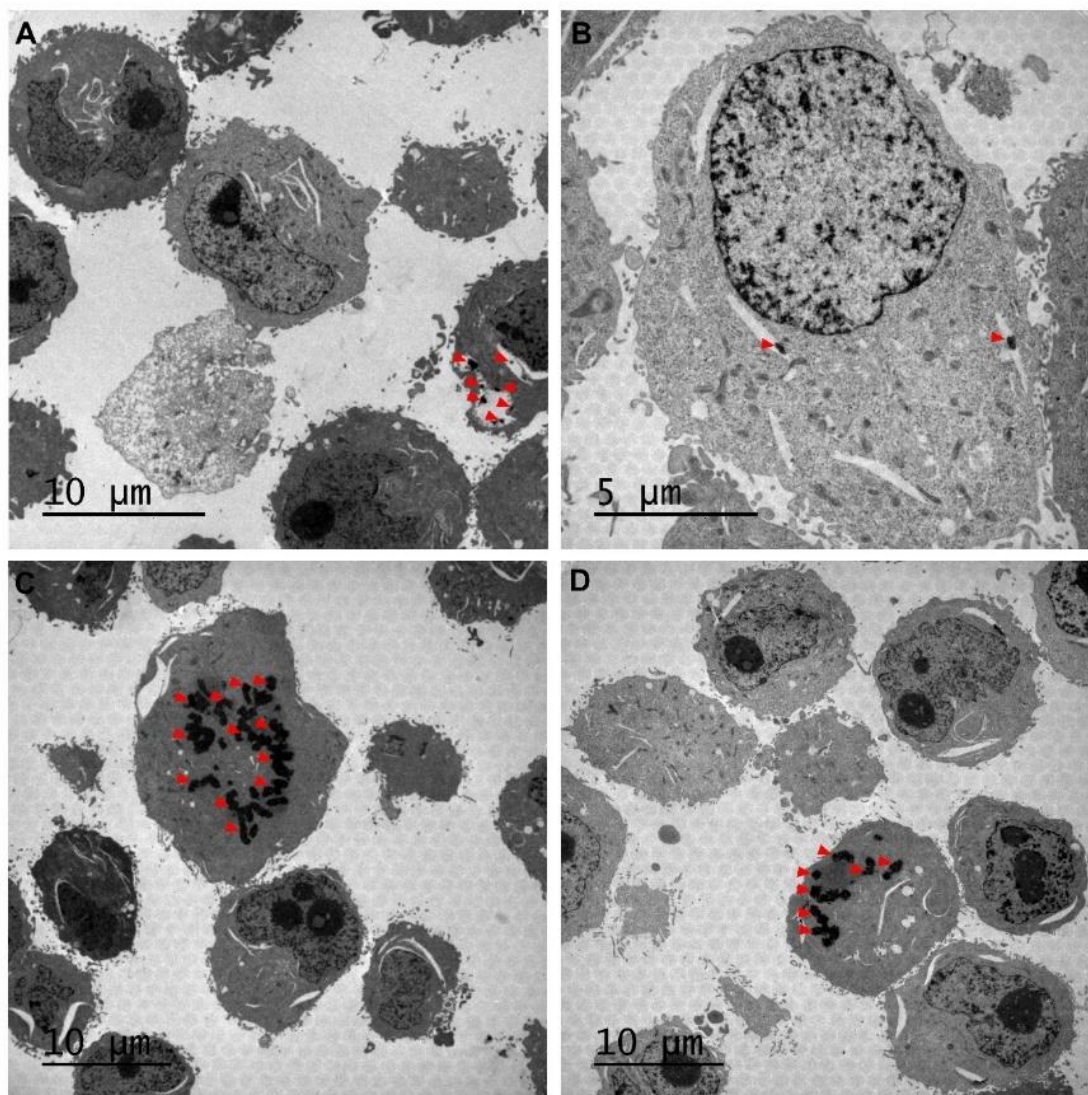


Figura 4.16. Captación celular de MSNs en células HeLa. Las células se expusieron a MSNs que contenían Pd 10 $\mu\text{g/mL}$ durante 24 horas y se analizó la internalización de las partículas mediante MET. (A, B) Nanopartículas endocitadas. (C, D) Clústeres de MSNs. Las flechas rojas señalan las MSNs internalizadas. Escala: 10 μm (A, C y D) y 5 μm (B).

Para comprobar el potencial antitumoral de los compuestos libres PtTdTn, PdTdTn y TdTn, se ensayó su efecto citotóxico a concentraciones comprendidas entre 1 y 100 μM en la línea celular de cáncer de cuello de útero HeLa. El complejo PtTdTn y el ligando TdTn mostraron una citotoxicidad similar en las células HeLa ($\text{IC}_{50} = 51,75 \pm 2,43$ y $51,59 \pm 1,04$ μM , respectivamente; Figura 4.17. A, E), mientras que el complejo PdTdTn produjo un mayor efecto citotóxico ($\text{IC}_{50} = 39,35 \pm 0,86$ μM ; Figura 4.17. C).

Posteriormente, se estudió la citotoxicidad de los materiales basados en sílice en la misma línea celular. Los diferentes materiales se analizaron en el intervalo de 10-500 $\mu\text{g/mL}$. La MSN-PtTdTn y la MSN-PdTdTn produjeron un efecto citotóxico significativo a partir de 50 $\mu\text{g/mL}$ y 200 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente (Figura 4.17. B, D). Por el contrario, la MSN-TdTn solo generó efectos significativos a concentraciones superiores a 400 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 4.17. F). Por lo tanto, las MSNs mostraron un efecto citotóxico dependiente de la dosis en células HeLa, siendo el material más citotóxico la MSN-PdTdTn con un valor de IC_{50} de $424,8 \pm 9,59 \mu\text{g/mL}$ (Tabla 4.6.).

Se calculó la actividad citotóxica en términos del material completo y en función de la carga de metal activo de cada material, de modo que ambos sistemas (materiales y compuestos libres) puedan compararse mediante la IC_{50} de su concentración de metal (Tabla 4.6.). Comparando la cantidad de metal necesaria para obtener el mismo efecto citotóxico, la carga de los complejos en los sistemas de liberación basados en MSN no mejoró la actividad biológica de los compuestos libres. De hecho, se necesitó unas tres veces menos metal para el complejo PtTdTn libre ($10,10 \pm 0,79$ frente a $31,44 \pm 1,12 \mu\text{g/mL}$; Tabla 4.6.), y unas dos veces menos para el PdTdTn libre ($4,19 \pm 0,18$ frente a $8,92 \pm 0,20 \mu\text{g/mL}$; Tabla 4.6.) comparados con los compuestos encapsulados. Sin embargo, en estudios anteriores, los sistemas de liberación basados en MSNs que incorporaban derivados de Pt(II) demostraron una citotoxicidad mejorada contra las células HepG2 en comparación con los compuestos libres (H. He et al., 2014). En este sentido, la MSN-TdTn utilizada en la presente Tesis Doctoral sí mejoró la citotoxicidad del ligando libre, requiriendo casi un 70% menos de ligando para la MSN-TdTn ($11,55 \pm 0,77$ frente a $17,12 \pm 1,04 \mu\text{g/mL}$; Tabla 4.6.) para conseguir el mismo efecto que el compuesto libre.

4. Resultados y discusión

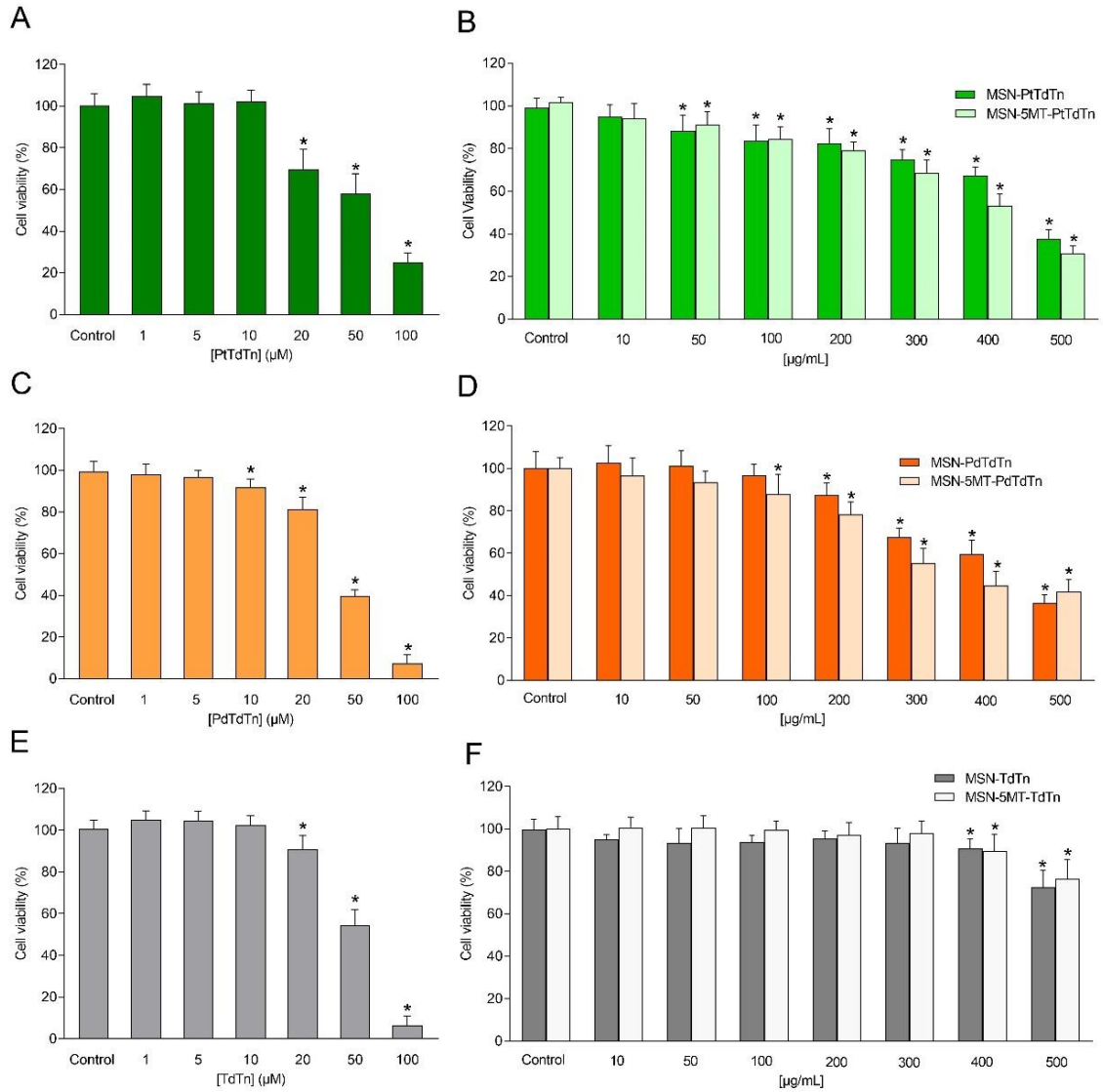


Figura 4.17. Curva dosis-respuesta de los materiales basados en sílice y los compuestos libres sobre la viabilidad celular en células HeLa. Las células se estimularon con concentraciones crecientes de PtTdTn (A), PdTdTn (C), TdTn (E), MSNs con Pt(II) (B), MSNs con Pd(II) (D) MSNs con TdTn (F) o el vehículo (0,2% DMSO (v/v), control) durante 24 horas. Los valores se presentan como media \pm DE de 5 experimentos independientes y se expresan como porcentaje de los valores de control. * $P < 0,05$ en comparación al control correspondiente.

Tabla 4.6. Efecto citotóxico tras 24 horas de tratamiento con MSN-PtTdTn, MSN-PdTdTn, MSN-TdTn y sus compuestos libres expresado en función del contenido de metal/ligando en células HeLa.

Material/Compuesto	IC ₅₀ (± SD; µg/mL)		
	Total	[Metal]	[Ligando]
MSN	< 1000	-	-
MSN-MP	< 1000	-	-
MSN-PtTdTn	462,40 ± 16,52	31,44 ± 1,12	-
PtTdTn	30,96 ± 2,43	10,10 ± 0,79	-
MSN-PdTdTn	424,8 ± 9,59	8,92 ± 0,20	-
PdTdTn	20,05 ± 0,86	4,19 ± 0,18	-
MSN-TdTn	648,6 ± 43,26	-	11,55 ± 0,77
TdTn	17,12 ± 1,04	-	17,12 ± 1,04
CisPt	4,84 ± 1,01	3,14 ± 0,66	-

Por otra parte, también se evaluó el potencial antitumoral de la 5MT libre, y se utilizó la melatonina como compuesto de referencia para comparar su efectividad. Como se muestra en la Figura 4.18., la 5MT mostró un efecto citotóxico relativamente mejor que la melatonina en células HeLa (IC₅₀ = 1,12 ± 0,02 frente a 1,26 ± 0,04 mM, respectivamente).

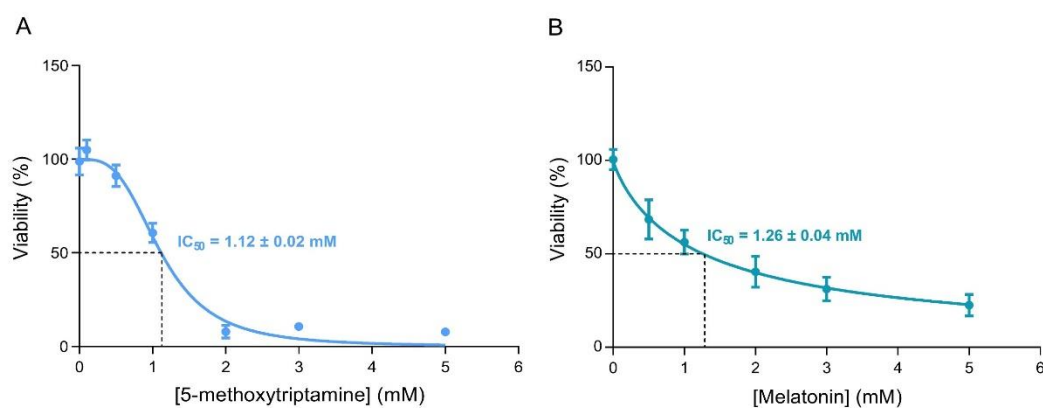


Figura 4.18. Cinética de la curva dosis-respuesta de 5MT y melatonina en células HeLa. Las células se trataron con concentraciones crecientes (0,5, 1, 2, 3 y 5 mM) de 5MT (A) y melatonina (B), o el vehículo (0,2% DMSO (v/v)) durante 24 horas. Los valores se presentan como la media ± DE de 5 experimentos independientes y se expresan como porcentaje respecto al control. Los valores de IC₅₀ se calcularon ajustando la curva mediante una ecuación sigmoidea dosis-respuesta de cuatro parámetros.

4. Resultados y discusión

A continuación, se utilizó el derivado de la melatonina, 5MT, para estudiar su actividad biológica una vez encapsulado en MSNs funcionalizadas con los complejos de PtTdTn y PdTdTn frente a células HeLa (Figura 4.17.). Los datos obtenidos mostraron que las MSNs funcionalizadas con 5MT y sus respectivos quimioterápicos presentaban valores de IC₅₀ menores que las MSNs cargadas con los quimioterápicos solos (Tabla 4.7.). Comparando la cantidad de metal necesaria para obtener el mismo efecto citotóxico, los sistemas de liberación basados en MSNs que contenían 5MT superaron la actividad biológica de los compuestos libres, ya que se necesitó aproximadamente 3 veces menos metal para la MSN-5MT-PtTdTn ($3,41 \pm 0,11$ frente a $10,10 \pm 0,79$ $\mu\text{g/mL}$ de PtTdTn), 2 veces menos para MSN-5MT-PdTdTn ($1,79 \pm 0,04$ frente a $4,19 \pm 0,18$ $\mu\text{g/mL}$ de PdTdTn) y 12 veces menos para MSN-5MT-TdTn ($1,33 \pm 0,07$ frente a $17,12 \pm 1,04$ $\mu\text{g/mL}$ de TdTn). La misma tendencia se observó al comparar la cantidad de metal de las MSNs cargadas con los complejos con las MSNs que contienen complejos y funcionalizadas con 5MT, ya que se necesitó aproximadamente 9 veces menos metal para MSN-5MT-PtTdTn ($3,41 \pm 0,11$ frente a $31,44 \pm 1,12$ $\mu\text{g/mL}$ para MSN-PtTdTn), 5 veces menos para MSN-5MT-PdTdTn ($1,79 \pm 0,04$ frente a $8,92 \pm 0,20$ $\mu\text{g/mL}$ para MSN-PdTdTn) y 9 veces menos para MSN-5MT-TdTn ($1,33 \pm 0,07$ frente a $11,55 \pm 0,77$ $\mu\text{g/mL}$ para MSN-TdTn). Además, la cantidad administrada de 5MT en la MSN-5MT fue de $2,54 \pm 0,40$ $\mu\text{g/mL}$, es decir, unas 84 veces menor que la cantidad de 5MT libre ($212,8 \pm 0,01$ $\mu\text{g/mL}$; Tabla 4.7.), lo que indica que la incorporación de pequeñas cantidades de 5MT en los materiales mejoró en gran medida la eficacia de los complejos. Estos resultados concuerdan con investigaciones previas que combinan diferentes fármacos en este tipo de sistemas de administración. Así, se ha descrito que la combinación de CisPt junto con doxorubicina (Li et al., 2016) u óxido nítrico (Munaweera et al., 2015) mejora los efectos del Pt en cultivos celulares tumorales al reducir la dosis de cada fármaco.

Tabla 4.7. Efecto citotóxico de las MSN funcionalizadas con 5-metoxitriptamina (5MT) (MSN-5MT-PtTdTn, MSN-5MT-PdTdTn, MSN-5MT-TdTn, MSN-5MT) y sus compuestos libres en células HeLa.

Material/Compuesto	IC ₅₀ (± SD; µg/mL)			
	Total	[Metal]	[Ligando]	[5MT]
MSN-MP-TEDTS	< 1000	-	-	-
MSN-5MT-PtTdTn	394,90 ± 13,14	3,41 ± 0,11	-	-
MSN-5MT-PdTdTn	366,20 ± 8,69	1,79 ± 0,04	-	-
MSN-5MT-TdTn	632,9 ± 32,82	-	1,33 ± 0,07	-
MSN-5MT	724,7 ± 113	-	-	2,54 ± 0,40
5MT	1120 ± 0,02	-	-	212,80 ± 0,01

Dado que las NP funcionalizadas con 5MT fueron los sistemas de administración más eficaces en términos de potencial antitumoral, se determinó el efecto promotor de la apoptosis de MSN-PtTdTn, MSN-5MT-PtTdTn, MSN-PdTdTn y MSN-5MT-PdTdTn analizando la externalización de la fosfatidilserina en células HeLa. Para ello, las células fueron tratadas con la dosis IC₂₅ de las diferentes MSNs (Figura 4.19. B) durante 24 horas. Los materiales que contenían Pt(II) indujeron una notable disminución de la proporción de células vivas ($26,14 \pm 15,29\%$ para MSN-PtTdTn y $32,12 \pm 16,40\%$ para MSN-5MT-PtTdTn; $P < 0,05$) a expensas de un aumento significativo de las poblaciones de células apoptóticas tardías ($44,26 \pm 15,23\%$ para MSN-PtTdTn y $44,24 \pm 13,02\%$ para MSN-5MT-PtTdTn; $P < 0,05$) y necróticas secundarias ($9,92 \pm 2,94\%$ para MSN-PtTdTn y $10,51 \pm 3,22\%$ para MSN-5MT-PtTdTn; $P < 0,05$) con respecto a las células de control (Figura 4.19.). Los materiales que contenían Pd(II) siguieron un patrón similar, con una llamativa reducción de la proporción de células vivas ($43,45 \pm 12,73\%$ para MSN-PdTdTn y $39,41 \pm 13,03\%$ para MSN-5MT-PdTdTn; $P < 0,05$) a expensas de un notable aumento de las poblaciones celulares apoptóticas tardías ($35,71 \pm 9,15\%$ para MSN-PdTdTn y $36,15 \pm 11,58\%$ para MSN-5MT-PdTdTn) y necróticas secundarias ($8,71 \pm 3,44\%$ para MSN-5MT-PdTdTn; $P < 0,05$) con respecto a las células control (Figura 4.19.). Estos resultados concuerdan con hallazgos preliminares que indicaban que el efecto citotóxico de los complejos PtTdTn y PdTdTn se inducía a través de una apoptosis mediada por ERO y dependiente de caspasas (Fernández-Delgado et al., 2020). Es importante destacar que los materiales funcionalizados con 5MT mostraron mayores efectos pro-apoptóticos que sus homólogos sin 5MT, ya que los materiales que contenían

4. Resultados y discusión

5MT produjeron aproximadamente la misma proporción de apoptosis, pero con menor cantidad de metal encapsulado (Figura 4.19. B).

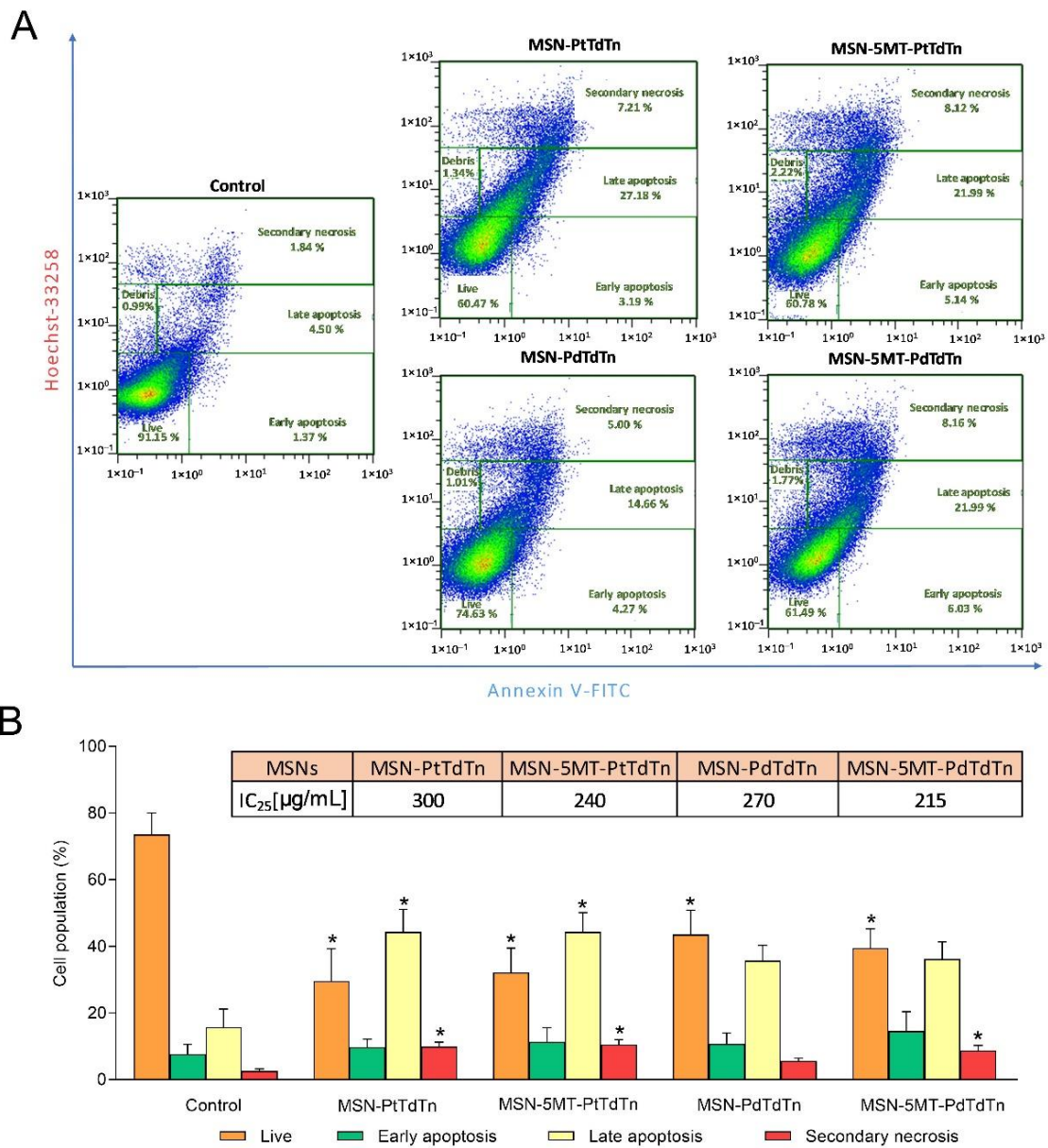


Figura 4.19. Efecto de las MSNs con Pt(II) y Pd(II) sobre la apoptosis en células HeLa. Las células se trataron con IC₂₅ de cada MSN (según se indica) o con el vehículo (0,2% DMSO (v/v), control) durante 24 horas. (A) Citogramas representativos de células con doble tinción (Annexin V-FITC/Hoechst 33258) para cada condición. (B) Los histogramas representan el porcentaje de diferentes poblaciones celulares (media ± DE) de 4 experimentos independientes. *P < 0,05 en comparación con el control (test de Dunnett).

La citotoxicidad incrementada por acción de las MSNs funcionalizadas con 5MT podría deberse a una mayor selectividad de los sistemas basados en sílice que contienen

los complejos metálicos. Así, analizamos la acumulación de MSN-PtTdTn, MSN-5MT-PtTdTn, MSN-PdTdTn y MSN-5MT-PdTdTn en las células HeLa. En este sentido, los resultados claramente demuestran que el porcentaje de Pt(II) internalizado fue mucho mayor (hasta 10 veces) en las células que fueron tratadas con MSN-5MT-PtTdTn en comparación con aquellas tratadas con MSN-PtTdTn (Figura 4.20.). Las NP que contienen Pd(II) siguieron la misma tendencia pero, en general, se acumularon en mayores cantidades. En este caso, la internalización de MSN-5MT-PdTdTn fue hasta 5 veces mayor que la de su homóloga sin 5MT (Figura 4.20.). Además, comparando la internalización de ambos metales, el Pd fue internalizado más eficientemente en comparación con el Pt, lo que podría explicar los mejores efectos citotóxicos observados para los materiales que contienen Pd. Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que la actividad biológica de las MSNs se ve afectada positivamente por la funcionalización con 5MT, lo que condujo a una mejor captación y acumulación celular y reforzó su potencial eficacia terapéutica.

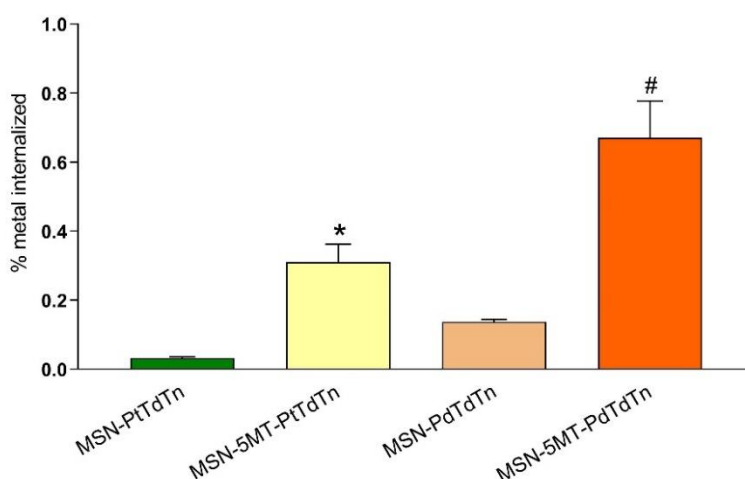


Figura 4.20. Acumulación de Pt(II) y Pd(II) en células HeLa. Las células se trataron con 100 $\mu\text{g/mL}$ de MSN-PdTdTn, MSN-5MT-PdTdTn, MSN-PtTdTn o MSN-5MT-PtTdTn durante 3 horas. Los valores representan la media \pm DE de 4 experimentos independientes y muestran el porcentaje de metal internalizado teniendo en cuenta la cantidad de Pt(II) o Pd(II) cargado en cada sistema MSN. * $P < 0,05$ en comparación con MSN-PtTdTn. # $P < 0,05$ en comparación con MSN-PdTdTn (test de Tukey).

4.3. Síntesis y caracterización estructural de un complejo derivado de CisPt con una amina primaria del tipo $[\text{PtCl}_2(\text{NH}_3)(\text{NH}_2\text{R})]$. Capacidad de la melatonina para potenciar la actividad citotóxica de este compuesto sobre las líneas celulares de cáncer de cuello uterino humano HeLa, cáncer de mama humano MDA-MB-231 y leucemia promielocítica humana HL-60.

4. Resultados y discusión

En este apartado, se realizó una caracterización de un nuevo complejo derivado de CisPt mediante DRX y IR en fase sólida, mientras que, en disolución, la caracterización se ha llevado a cabo a partir de $^1\text{H-RMN}$.

Por recristalización en acetonitrilo del complejo $[\text{PtCl}_2(3,4\text{-dicloroanilina})(\text{NH}_3)]$, se han podido obtener y aislar cristales de calidad y tamaño adecuados para realizar su estudio por DRX de monocristal. Los datos principales del monocristal examinado, así como las condiciones de barrido y los parámetros obtenidos tras el último ciclo de refinamiento se recogen en la Tabla 4.8.

Tabla 4.8. Datos del cristal, condiciones de barrido y parámetros para el estudio de difracción de rayos X de $[\text{PtCl}_2(3,4\text{-dicloroanilina})(\text{NH}_3)]$.

Forma del cristal	Placa
Color	Amarillo
Tamaño (mm)	$0,08 \times 0,04 \times 0,02$
Formula química	$\text{C}_6\text{H}_8\text{Cl}_4\text{N}_2\text{Pt}$
Peso molecular	445,03
Sistema cristalino	Monoclínico
Grupo espacial	P 21/c
a (Å)	7,4433(7)
b (Å)	22,845(2)
c (Å)	6,9709(5)
α (°)	90
β (°)	111,982(2)
γ (°)	90
Volumen de celdilla (Å ³)	1099,17(16)
Z	4
D_{calc} (g·cm ⁻³)	2,689
μ (mm ⁻¹)	13,692
F (000)	816
Intervalo θ (°)	2,951–26,356
Intervalo de índices	$-9 \leq h \leq 9, -28 \leq k \leq 25, -8 \leq l \leq 8$
Temperatura (K)	296
Reflexiones independientes	2246

Reflexiones observadas	1149
Número de parámetros refinados	201
R [F >4.0 σ (F)]	0,0404
Rw [F >4.0 σ (F)]	0,0785
GOF	1,039
ρ_{\max} ; ρ_{\min} ($e \cdot \text{\AA}^{-3}$)	1,223; - 0,823

A continuación, en la Figura 4.21., se muestra un diagrama de la estructura molecular del complejo en el que se han dibujado los elipsoides térmicos a un nivel de probabilidad del 40%.

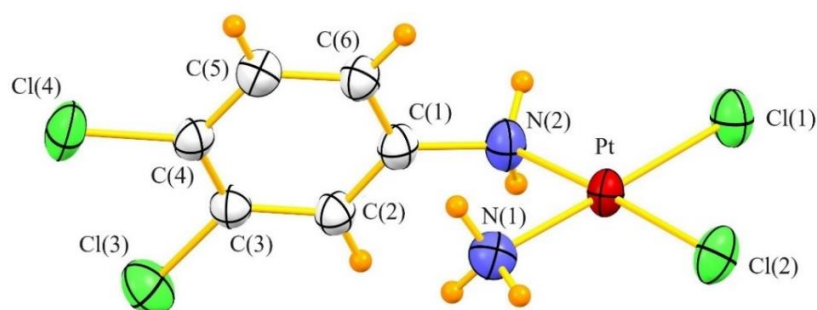


Figura 4.21. Estructura molecular del complejo $[\text{PtCl}_2(3,4\text{-dicloroanilina})(\text{NH}_3)]$.

Asimismo, en la Figura 4.22., se muestra la disposición de las moléculas del complejo en la celdilla unidad ($Z = 4$).

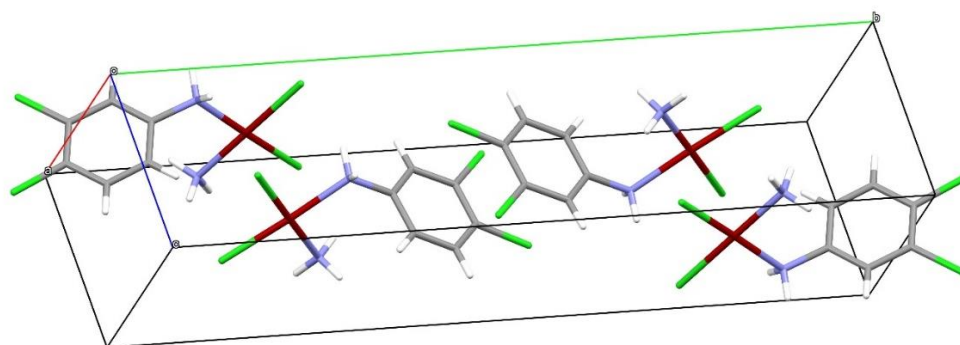


Figura 4.22. Celdilla unidad del complejo $[\text{PtCl}_2(3,4\text{-dicloroanilina})(\text{NH}_3)]$.

4. Resultados y discusión

La geometría de coordinación del complejo alrededor de Pt(II) puede describirse como plano-cuadrado ligeramente distorsionada, con el átomo de Pt unido a dos átomos de cloro en disposición cis, a una molécula de 3,4-dicloroanilina que coordina a través del átomo de nitrógeno del grupo amino (NH₂) y a un ligando ammina (NH₃). Los ángulos ligando-metal-ligando difieren de los valores ideales para una geometría plano-cuadrada (90°) variando entre 86,17(3) [N(2)-Pt-Cl(2)] y 94,21(10) [Cl(1)-Pt-Cl(2)]. Por otro lado, el ángulo diedro entre los planos Cl(2)-Pt-Cl(1) y N(2)-Pt-N(1) tiene un valor de 3,53° siendo la máxima desviación respecto al plano medio formado por el grupo cromóforo PtCl₂N₂ para el átomo N(2) de 0,049(1) Å. En la Tabla 4.9., se recogen las distancias y los ángulos de enlace más relevantes en el complejo.

Tabla 4.9. Distancias de enlace (Å), ángulos de enlace (°) y parámetros geométricos de los enlaces de hidrógeno en [PtCl₂(3,4-dicloroanilina)(NH₃)].

Distancias de enlace (Å)			
Pt-Cl(1)	2,313(3)		
Pt-Cl(2)	2,301(2)		
Pt-N(1)	2,035(8)		
Pt-N(2)	2,088(9)		
Ángulos de enlace (°)			
N(1)-Pt-Cl(1)	178,73(2)		
N(1)-Pt-Cl(2)	86,63(3)		
N(2)-Pt-Cl(1)	86,17(3)		
N(2)-Pt-Cl(2)	176,53(3)		
N(2)-Pt-N(1)	93,05(4)		
Cl(1)-Pt-Cl(2)	94,21(10)		
Parámetros geométricos de los enlaces de hidrógeno			
D-H...A	Posición de A	D...A (Å)	D-H...A (°)
N(1)-H(1 ^a)...Cl(2)	x, 1,5-y, -0,5+z	3,601	146,6
N(1)-H(1B)...Cl(1)	x-1, 1,5-y, 0,5+z	3,405	132,1
N(1)-H(1C)...Cl(2)	x, 1,5-y, 0,5+z	3,406	131,0
N(2)-H(2B)...Cl(1)	x, 1,5-y, 0,5+z	3,375	159,8

La estructura cristalina del complejo presenta un desorden estático que afecta a los átomos de la molécula del ligando orgánico 3,4-dicloroanilina, como puede observarse en la Figura 4.23. Por ello, a la hora de modelar el mapa de densidades electrónicas se

utilizaron dos conjuntos de posiciones diferentes. Para este procedimiento, la ocupación de las dos orientaciones alternativas fue restringida a la unidad. Asimismo, se aplicaron restricciones SADI, RIGU y SIMU a los átomos y las distancias de enlace que forman parte del desorden. De las dos orientaciones posibles para el ligando 3,4-dicloroanilina, hay una mayoritaria que presenta un factor de ocupación de 0,85(1), y otra minoritaria, notada con la letra A en los átomos, que tiene un factor de ocupación de 0,15(1). Ambas orientaciones son casi coplanares ya que el ángulo diedro que se forma entre los planos medios de cada una de ellas es 1,26°. Además, en ambas orientaciones, el ligando se encuentra coordinado al ion Pt(II) a través del átomo de nitrógeno.

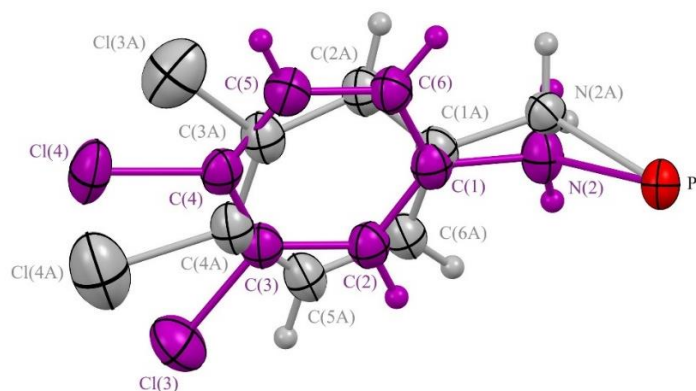


Figura 4.23. Representación del desorden en el ligando 3,4-dicloroanilina presente en el complejo.

Con respecto a las distancias de enlaces encontradas, estas se han estudiado de forma más exhaustiva con ayuda de la base de datos de *Cambridge Structural Database* (CSD) empleando el programa CONQUEST (versión v5.42, junio 2023), que permite encontrar distancias de enlace en compuestos estructuralmente similares a la molécula bajo estudio que están depositadas en CSD.

Las longitudes de enlace Pt-Cl son más largas que la de los enlaces Pt-N y se sitúan en el mismo orden que el valor medio [2,299(19) Å] calculado para 602 complejos cis plano-cuadrados de Pt(II) con un entorno de coordinación Cl₂N₂ obtenidos de CSD (Groom et al., 2016).

Por otro lado, la distancia de enlace Pt-NH₃ es similar al valor promedio calculado [2.037(19) Å] para 24 complejos plano-cuadrado con Pt(II) en un entorno de coordinación Cl₂N₂ obtenidos también en CSD (Groom et al., 2016). Finalmente, no se

4. Resultados y discusión

encontraron distancias de enlace Pt unido al átomo de nitrógeno de dicloroanilinas en CSD, por lo que se comparó con uniones Pt-N_{anilina} con un valor medio [2,077(42) Å] calculado para 41 complejos de Pt(II) con este tipo de enlaces en CSD (Groom et al., 2016).

Además, la estructura cristalina se encuentra estabilizada por una red de enlaces de hidrógeno, en los cuales el átomo de nitrógeno N(1) del ligando ammina y el átomo de nitrógeno N(2) del grupo amino de la dicloroanilina actúan como dadores de hidrógeno, mientras que los ligandos cloro actúan como aceptores de hidrógeno. En la Tabla 4.9. se indican los principales parámetros geométricos correspondientes a estas uniones. Un esquema de los enlaces intermoleculares de hidrógeno se muestra en la Figura 4.24.

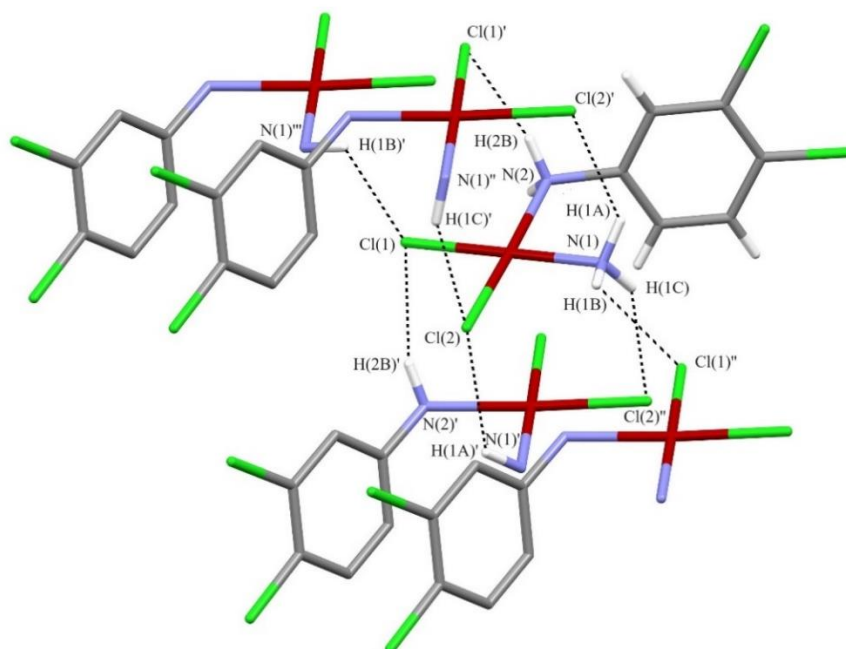


Figura 4.24. Esquema de los enlaces intermoleculares de hidrógeno en el cristal de $[PtCl_2(3,4\text{-dicloroanilina})(NH_3)]$.

Así, puede observarse que los enlaces de hidrógeno intermoleculares forman una red bidimensional que crece a lo largo de los ejes a y c, como se muestra en la Figura 4.25.

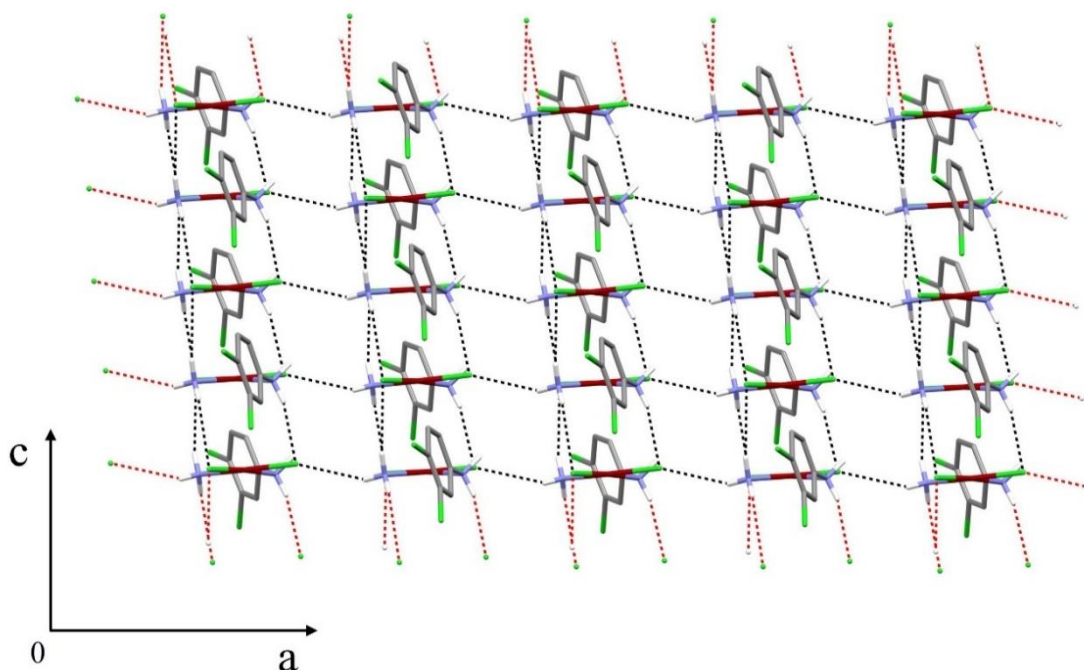


Figura 4.25. Red bidimensional de enlaces intermoleculares de hidrógeno.

En cuanto a la posible existencia de interacciones aromáticas, es necesario destacar su importancia a la hora de determinar el empaquetamiento cristalino en compuestos que contienen algún fragmento aromático. Se han tenido en consideración los distintos tipos de interacciones aromáticas que pueden tener lugar, representadas en la Figura 4.26., y que se describen a continuación:

- a) Apilamiento facial o π - π *stacking*. Consiste en un ordenamiento paralelo de los anillos aromáticos de modo que éstos se hallan superpuestos, estando comprendida la distancia entre los planos de mínimos cuadrados de los anillos entre 3,3 y 3,8 Å. Este caso está energicamente desfavorecido, ya que las interacciones entre los electrones π de ambos anillos tienen carácter repulsivo.
- b) Ordenamiento tipo T. En este tipo de disposición, los planos medios de los anillos forman un ángulo comprendido entre 40° y 90°, siendo las fuerzas de interacción C-H \cdots π que se establecen entre un dador C-H y un aceptor π las principales responsables de esta estructura. Normalmente, estas interacciones tienen lugar entre dos de los hidrógenos de uno de los anillos y la nube aromática del otro.

4. Resultados y discusión

- c) Apilamiento desplazado. Puede describirse como una disposición paralela en la que ocurre un desplazamiento relativo de los planos medios de los anillos, dando lugar a solapamiento parcial. La separación entre los planos de los anillos está comprendida entre 3,3 y 3,8 Å. Es energéticamente favorable, ya que minimiza la repulsión entre electrones π y maximiza las fuerzas atractivas entre el esqueleto σ de uno de los anillos y la nube π del otro.

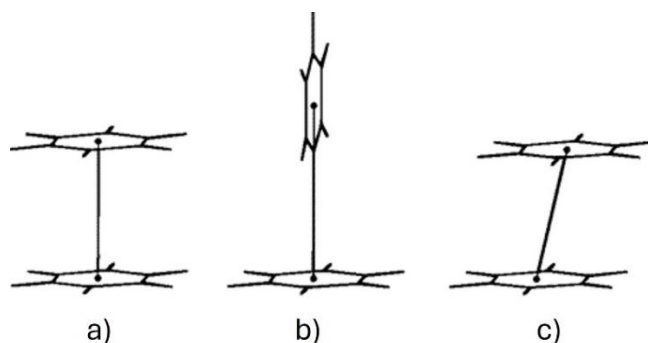


Figura 4.26. Tipos de interacciones aromáticas entre anillos.

En el complejo $[\text{PtCl}_2(3,4\text{-dicloroanilina})(\text{NH}_3)]$ se detecta apilamiento facial o π - π *stacking* entre anillos de benceno cuyos planos medios son paralelos y están separados a 3,486 Å, siendo esta interacción la responsable de la estructura supramolecular del compuesto. Como se puede apreciar en la Figura 4.27., los anillos de benceno actúan a la vez como dadores C-H y aceptores π , siendo el átomo de hidrógeno implicado C(5)-H. En la Tabla 4.10., se indican los parámetros calculados para esta interacción.

Tabla 4.10. Interacciones de apilamiento en $[\text{PtCl}_2(3,4\text{-dicloroanilina})(\text{NH}_3)]$.

C-H $\cdots\pi$	D(c_i - c_j) (Å)	ANG (°)	DZ (Å)	DXY (Å)	H $_i$ $\cdots c_j$ (Å)	C-H $_i$ $\cdots c_j$ (°)
C(5)-H $\cdots\pi$	3,869	0,0	3,486	1,51	4,027	69,24

D(c_i-c_j): Distancia entre centroides; *ANG:* ángulo formado por los planos de mínimos cuadrados de los anillos de benceno interaccionantes; *DZ:* distancia entre dichos planos; *DXY:* distancia entre las proyecciones de los centroides sobre uno de los planos; *H_i \cdots c_j:* distancia entre el hidrógeno interactuante del benceno dador C-H y el centroide del benceno aceptor π ; *C-H_i \cdots c_j:* ángulo definido por el grupo C-H del benceno dador y el centroide aceptor.

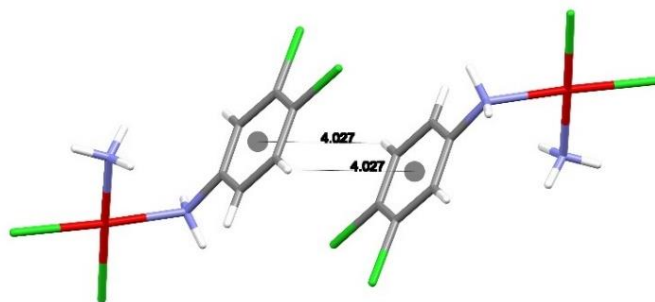


Figura 4.27. Apilamiento facial o π - π stacking del complejo $[PtCl_2(3,4\text{-dicloroanilina})(NH_3)]$.

La coordinación de un ligando a un ion metálico da lugar a la aparición de enlaces metal-ligando y a variaciones en la energía de los enlaces del ligando original. Estos cambios se traducen en la aparición de nuevas bandas de absorción en el espectro IR debido a los enlaces metal-ligando, y a desplazamientos de las bandas correspondientes a los enlaces del ligando que sufren modificaciones energéticas como consecuencia de la coordinación. Por este motivo, del estudio comparativo de los espectros de absorción en la zona del IR del ligando libre y de la especie compleja puede extraerse información sobre qué átomos del ligando están implicados directamente en la coordinación al metal.

En la Figura 4.28. se muestra el espectro IR de $[PtCl_2(3,4\text{-dicloroanilina})(NH_3)]$ en el intervalo de 4000 y 400 cm^{-1} . Las principales bandas detectadas y asignaciones realizadas se indican en la Tabla 4.11., de acuerdo con la bibliografía (Dotes et al., 1986; Spectral Database for Organic Compounds (SDBS)., 2024).

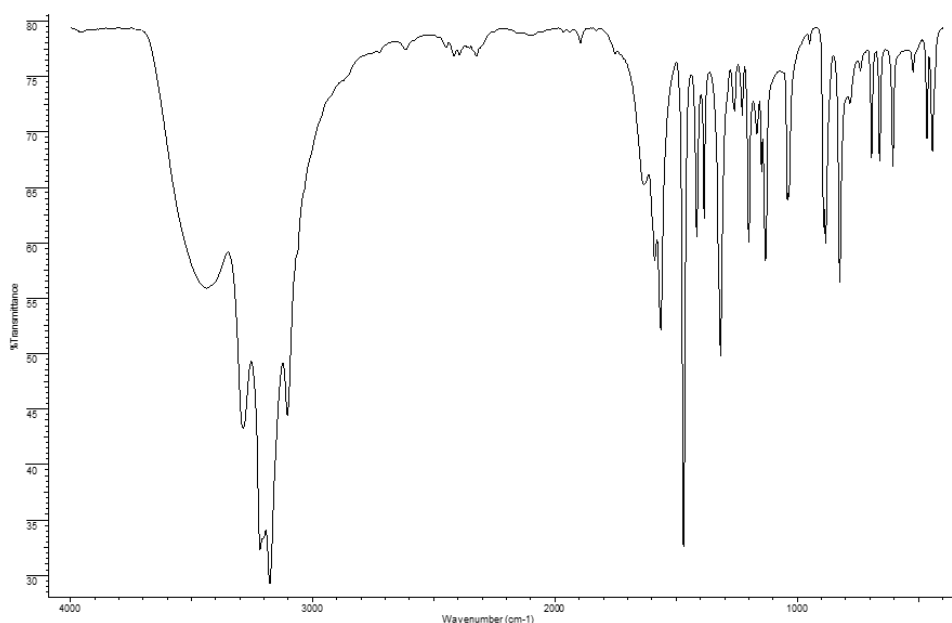


Figura 4.28. Espectro de absorción de $[PtCl_2(3,4\text{-dicloroanilina})(NH_3)]$ entre 4000 y 400 cm^{-1} .

4. Resultados y discusión

Tabla 4.11. Posición y asignación de las bandas del espectro de absorción IR de $[PtCl_2(3,4\text{-dicloroanilina})(NH_3)]$.

Asignación	Numero de onda (cm^{-1})	Asignación	Numero de onda (cm^{-1})
$\nu_{as}(NH_3)$ $\nu_{as}(NH_2)$	3286	$\gamma(NH_2)$	1040
$\nu_s(NH_3)$	3217	$\nu(\text{anillo fenilo})$	1034
$\nu_s(NH_2)$	3176	$\gamma(C-H)$	950
$\nu(C-H)$	3104	$\gamma(C-H)$	892
$\delta(NH_2)$	1633	$\gamma(C-H)$	883
$\nu(C-C)$	1589	$\gamma(C-H)$	825
$\nu(C-C)$ $\delta(NH_3)$	1562	$r(NH_3)$	782
$\nu(C-C)$	1469	$\nu(C-Cl)$	693
$\nu(C-C)$	1415	$\nu(Pt-NH_2)$	660
$\delta(NH_3)$	1385	$r(NH_2)$	606
$\nu(C-N)$	1317	$\nu(Pt-NH_3)$	522
$\delta(C-H)$	1258	$\gamma(\text{anillo fenilo})$	465
	1227	$\gamma(\text{anillo fenilo})$	443
$\delta(C-H)$	1200		
$\delta(C-H)$	1147		
	1131		

ν stretching o tensión; δ bending, deformación o flexión en el plano; γ bending, deformación o flexión fuera del plano; r rocking o balanceo; as modo antisimétrico; s modo asimétrico.

Como hechos más destacables, en lo que se refiere a la zona del IR cercano, cabe mencionar la aparición de dos bandas a 3286 cm^{-1} y 3217 cm^{-1} asignables a los modos de vibración de tensión asimétrico y simétrico, respectivamente, de la molécula de amoniaco presente en el complejo (Lippard & Ziegler, 2004; Muir et al., 1988; SDBS, 2024). Estas bandas de tensión aparecen a menor número de onda respecto del amoniaco libre (3444 y 3337 cm^{-1}) (Lide, 2005), lo que indica la coordinación del ligando ammina al centro metálico.

Otros modos de vibración del ligando ammina como los modos de vibración de flexión o deformación (bending), se detectan a 1562 cm^{-1} y 1385 cm^{-1} , mientras que un modo de vibración de balanceo (rocking) se encuentra a 782 cm^{-1} (Nakamoto, 1997). Asimismo, en relación con el grupo amino del ligando 3,4-dicloroanilina que se encuentra en el complejo estudiado, las bandas de vibración de tensión asimétricas y simétricas son asignables, de acuerdo con la bibliografía (Craciunescu et al., 1985), a 3286 cm^{-1} y 3176 cm^{-1} . Estas bandas se registran a $3420\text{-}3419\text{ cm}^{-1}$ y $3323\text{-}3321\text{ cm}^{-1}$ para el ligando libre, pudiéndose comprobar un desplazamiento a frecuencias más bajas que confirma la coordinación a través del átomo de nitrógeno del grupo amino. En cuanto a otros modos de vibración del grupo NH_2 , se han registrado tres bandas a 1633 cm^{-1} , 1040 cm^{-1} y 606 cm^{-1} , asignables a una banda de vibración de flexión en el plano, una banda de vibración fuera del plano y a una banda de balanceo, respectivamente.


En lo que se refiere a las vibraciones de los enlaces metal-ligando, cabría esperar la aparición de cuatro modos de tensión (Pt-ligando). Así, la banda que aparece a 660 cm^{-1} es asignable a la vibración $\nu(\text{Pt-NH}_2)$ de acuerdo con la bibliografía consultada (Craciunescu et al., 1985). La banda registrada a 522 cm^{-1} puede asignarse a la vibración $\nu(\text{Pt-NH}_3)$ que se encuentra en el CisPt a 510 cm^{-1} (Nakamoto, 1997). Por último, las dos bandas de vibración $\nu(\text{Pt-Cl})$ no se han registrado por quedar fuera del rango del equipo.

La caracterización estructural del complejo en disolución se realizó mediante espectroscopia de $^1\text{H-RMN}$ usando DMF-d_7 como disolvente. El estudio de las asignaciones de los protones en el complejo se ha realizado a partir del espectro del ligando libre 3,4-dicloroanilina en DMF-d_7 que se muestra en el Anexo (Figura A.13.).

En dicho espectro se registran entre 6,5 y 7,3 ppm dos dobletes y un doblete correspondientes a los tres hidrógenos del anillo de 3,4-diclorobenceno. El valor de las integrales indicando un hidrógeno por cada señal confirma esta suposición, así como el hecho de que en esta zona aparezcan los hidrógenos aromáticos. Las asignaciones de estos hidrógenos aromáticos se recogen en la siguiente Tabla 4.12.

4. Resultados y discusión

Tabla 4.12. Desplazamientos químicos (δ) y asignaciones del espectro de $^1\text{H-RMN}$ de 3,4-dicloroanilina para los átomos de hidrógeno aromáticos (J en Hz).

	H(5)	H(2)	H(6)
	7,24d ($J=8,5$)	6,91d ($J=3$)	6,70dd ($J=8,5; 2,5$)

Estas asignaciones se han llevado a cabo teniendo en cuenta los valores de las constantes de acoplamiento entre los hidrógenos orto, meta y para del benceno (Pretsch et al., 2001) (Tabla 4.13).

Tabla 4.13. Valores de las constantes de acoplamiento entre los hidrógenos orto, meta y para del benceno (J en Hz).

J_{orto}	J_{meta}	J_{para}
6,5 - 8,5	1,0 - 3,0	0,0 - 1,0

De estos valores se deduce que la señal que aparece en el espectro de 3,4-dicloroanilina como un doble doblete debe corresponder al átomo H(6) del anillo aromático, el cual se acopla con el hidrógeno orto H(5) con una constante de acoplamiento de 8,5 Hz y el hidrógeno en posición meta H(2) con un valor de J de 2,50 Hz.

Además, como el grupo amino de la 3,4-dicloroanilina no cede carga al centro metálico induce un efecto apantallante en las posiciones orto que compensa en parte el efecto desapantallante del cloro 3. Como resultado de esta compensación de efectos, las señales de los hidrógenos 2 y 6 aparecen en el ligando a campo más alto que la señal del hidrógeno 5 afectado solo por el efecto desapantallante del cloro 4.

Por último, en el espectro de 3,4-dicloroanilina también se registra una señal a 5,69 ppm que se integra por dos protones asignables a los dos hidrógenos del grupo amino. Este valor es coherente con el valor encontrado en el espectro $^1\text{H-RMN}$ de cloroformo deuterado (CDCl_3) de otras cloroanilinas en la (SDBS, 2024), en la que los hidrógenos del grupo amino se registran a campo alto entre 3,7 y 4,75 ppm.

La coordinación de un ligando a un ion metálico da lugar a la aparición de enlaces metal-ligando, lo que provoca variaciones en los desplazamientos químicos de

las señales de RMN con respecto al ligando libre. En la Figura 4.29., se muestra el espectro ^1H -RMN del complejo $[\text{PtCl}_2(3,4\text{-dicloroanilina})(\text{NH}_3)]$.

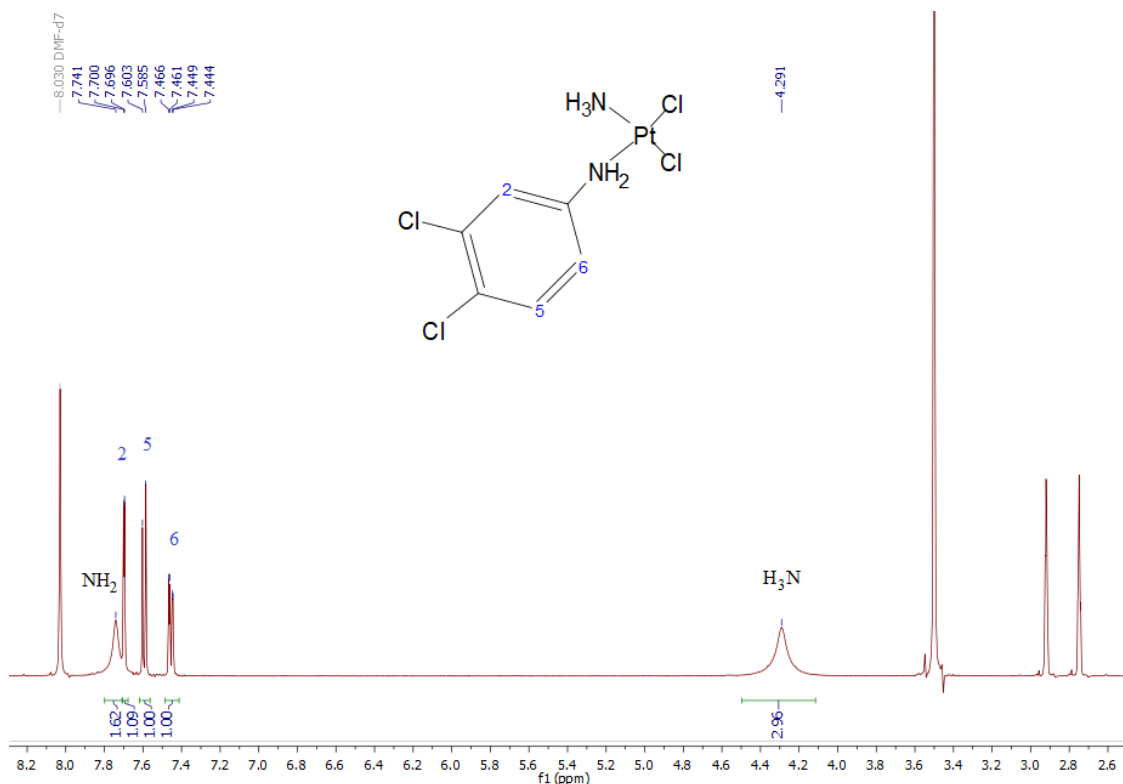
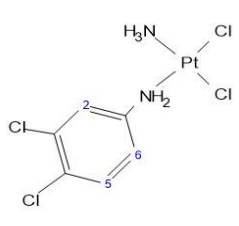


Figura 4.29. Espectro ^1H -RMN de $[\text{PtCl}_2(3,4\text{-dicloroanilina})(\text{NH}_3)]$ disuelto en DMF-d^7 . Señales numeradas del ligando 3,4-dicloroanilina y NH_3 .

Las asignaciones de los hidrógenos aromáticos del anillo de benceno del ligando orgánico se han hecho en coherencia con los realizados para el ligando libre teniendo en cuenta las constantes de apantallamiento y se muestran en la siguiente Tabla 4.14.

Tabla 4.14. Desplazamientos químicos (δ) y asignaciones del espectro de ^1H -RMN de $[\text{PtCl}_2(3,4\text{-dicloroanilina})(\text{NH}_3)]$ para los átomos de hidrógeno aromáticos (J en Hz).

	H(2)	H(5)	H(6)
		7,70 ($J=2$)	7,60 ($J=9$)

La señal ancha que se registra a 4,29 ppm y que se integra por 3 protones es asignable al ligando ammina. Esta asignación está de acuerdo con la forma y la posición a la que aparece la señal de este ligando en complejos con esferas de coordinación

4. Resultados y discusión

similares. Así, en $[\text{PtCl}_2(\text{ciclohexilamina})(\text{NH}_3)]$ (Giandomenico et al., 1995), la señal de la molécula de amoníaco aparece a 4,20 ppm, en $[\text{PtCl}_2(\text{isobutilamina})(\text{NH}_3)]$ (Giandomenico et al., 1995), la señal aparece a 4,25 ppm y, en $[\text{PtCl}_2(2\text{-amino-3-picolina})(\text{NH}_3)]$ (Nakamoto, 1997), la señal se registra a 4,40 ppm.

Finalmente, a 7,74 ppm se observa una señal ancha que se integra por dos protones correspondientes al grupo amino del ligando orgánico.

La coordinación del ion Pt(II) produce desplazamientos de las señales de ^1H -RMN a valores más altos de ppm del complejo con respecto al ligando sin coordinar. El mayor desplazamiento se produce en la señal del grupo NH_2 , lo que es coherente con la coordinación a través del átomo de hidrogeno de la 3,4-dicloroanilina.

En este sentido, como se puede comprobar en el espectro de ^1H -RMN del complejo (Figura 4.29.), las señales de los hidrógenos 2 y 5 se encuentran intercambiadas respecto a las posiciones a las que aparecen estos mismos hidrógenos en el espectro de la 3,4-dicloroanilina libre en el Anexo (Figura A.13.).

Este intercambio en la posición de estas señales se produce como resultado de la coordinación del grupo amino al centro metálico, lo que provoca que las posiciones de las señales de los átomos de hidrógeno 2 y 6 sufran un doble efecto desapantallante, a saber, el que inducen tanto el átomo de cloro en posición 3 como el grupo amino coordinado.

Este doble desapantallamiento resulta en que el desplazamiento a campo bajo de las señales de los hidrógenos 2 y 6 sea algo más del doble que el que sufre el protón unido al carbono 5 respecto a estas señales en el ligando, de manera que el orden de las señales de los átomos 2 y 5 se intercambian.

Todo lo indicado en el apartado de IR y RMN está de acuerdo con la estructura obtenida para este complejo por DRX.

Por otro lado, una vez caracterizado el complejo $[\text{PtCl}_2(3,4\text{-dicloroanilina})(\text{NH}_3)]$, se realizó el estudio de su actividad biológica. Así, se evaluó el

efecto citotóxico del complejo de Pt(II) y de su ligando en células de cáncer de mama MDA-MB-231, cáncer cervicouterino HeLa y leucemia promielocítica HL-60 en comparación con el efecto del CisPt. La Figura 4.30. muestra el efecto citotóxico de CisPt, 3,4-dicloroanilina y $[\text{PtCl}_2(3,4\text{-dicloroanilina})(\text{NH}_3)]$ en las diferentes líneas celulares. La estimulación de las células tumorales con concentraciones crecientes (0-100 μM) de $[\text{PtCl}_2(3,4\text{-dicloroanilina})(\text{NH}_3)]$ durante 24 horas indujo una notable disminución dosis-dependiente de la viabilidad celular, alcanzando un valor mínimo de viabilidad con la dosis de 2,5 μM , 25 μM y 100 μM en células HL-60, HeLa y MDA-MB-231, respectivamente (Figura 4.30. A, B, C).

Las concentraciones inhibitorias medias IC_{50} del complejo $[\text{PtCl}_2(3,4\text{-dicloroanilina})(\text{NH}_3)]$ fueron menores en todas las líneas celulares comparadas con aquellas del CisPt, siendo unas 10 veces más efectivo en la línea celular HL-60 y aproximadamente 2 veces más efectivo en las células MDA-MB-231 y HeLa (Figura 4.30. D). Además, el ligando libre (3,4-dicloroanilina) no produjo efectos significativos en la viabilidad de las diferentes células, excepto para las dosis más altas (Figura A.14.). Estos resultados están de acuerdo con las actividades citotóxicas encontradas para complejos de Pt(II) que contienen cloroanilinas (valores de IC_{50} que oscilan entre 0,14 y 1,6 μM) en una línea celular de carcinoma de epitelio uterino (células KB). Además, estos mismos complejos presentan resultados prometedores in vivo en ratones portadores de leucemias P388 y L1210 (Craciunescu et al., 1985).

4. Resultados y discusión

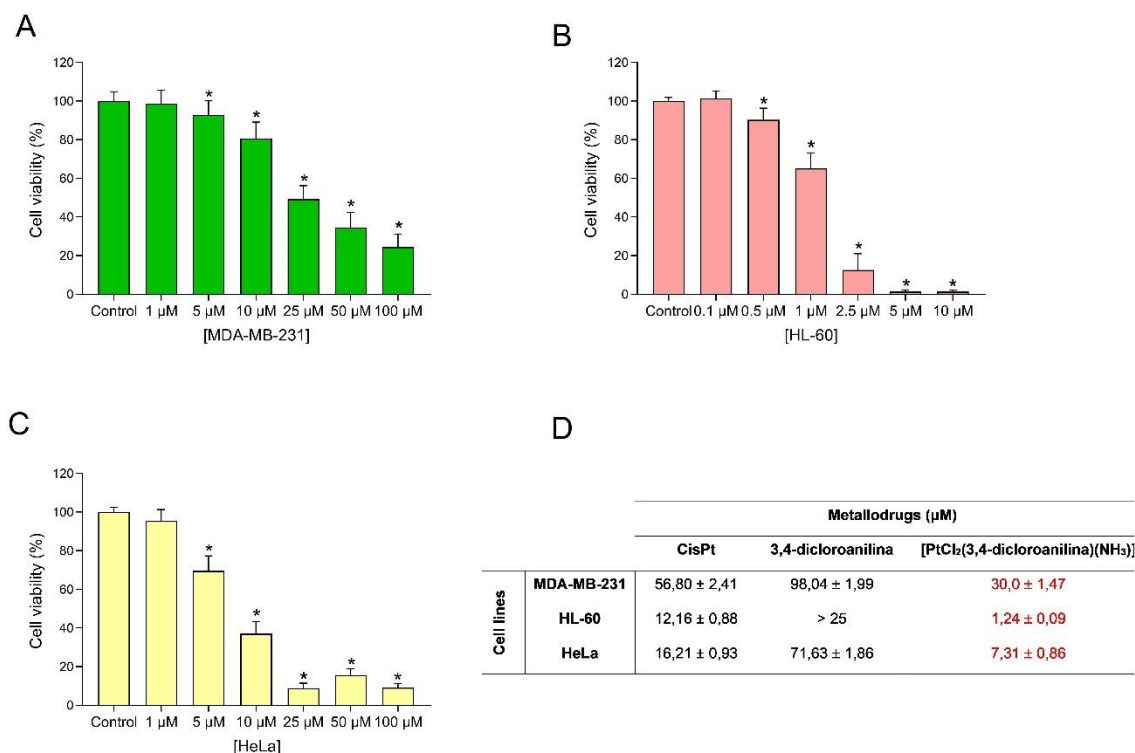


Figura 4.30. Curvas dosis-respuesta del complejo de Pt(II) sobre la viabilidad celular. Las líneas celulares MDA-MB-231 (A), HL-60 (B) y HeLa (C) fueron tratadas con concentraciones crecientes (0-100 μM, según se indica) del complejo [PtCl₂(3,4-dicloroanilina)(NH₃)] o el vehículo (0,2% DMF (v/v), control) durante 24 horas. Los datos representan la media ± D.E. de 6 experimentos independientes y se expresan como porcentaje en comparación con los valores del control. (D) Valores de IC₅₀ (media ± DE) de CisPt, 3,4-dicloroanilina, [PtCl₂(3,4-dicloroanilina)(NH₃)] frente a las líneas celulares MDA-MB-231, HL-60 y HeLa. *P < 0,05 en comparación con sus correspondientes valores de control (test de Dunnett).

A continuación, para comprobar el efecto coadyuvante de la melatonina, se realizó una coincubación del complejo [PtCl₂(3,4-dicloroanilina)(NH₃)] y la indolamina en las células MDA-MB-231 y HeLa, ya que resultaron ser las células más resistentes al complejo de Pt(II). Ambos fármacos se emplearon a las dosis y combinaciones indicadas en la Tabla 4.15. y 4.16., determinando la viabilidad celular tras 24 horas para calcular los valores del IC.

Tabla 4.15. Cálculo de los datos del índice de combinación (IC) para la combinación de $[\text{PtCl}_2(3,4\text{-dicloroanilina})(\text{NH}_3)]$ y melatonina en la inducción de muerte celular en las células HeLa.

$[\text{PtCl}_2(3,4\text{-dicloroanilina})(\text{NH}_3)]$ (μM)	Melatonina (mM)	Efecto (Fa)	IC
1	0,5	0,25	0,95
5	0,5	0,38	1,30
10	0,5	0,60	1,17
1	1	0,37	0,99
5	1	0,46	1,30
10	1	0,66	1,11
1	2	0,52	1,04
5	2	0,58	1,26
10	2	0,75	0,98

Tabla 4.16. Cálculo de los datos del índice de combinación (IC) para la combinación de $[\text{PtCl}_2(3,4\text{-dicloroanilina})(\text{NH}_3)]$ y melatonina en la inducción de muerte celular en las células MDA-MB-231.

$[\text{PtCl}_2(3,4\text{-dicloroanilina})(\text{NH}_3)]$ (μM)	Melatonina (mM)	Efecto (Fa)	IC
5	0,5	0,13	1,46
10	0,5	0,31	0,87
25	0,5	0,60	0,82
5	1	0,15	1,87
10	1	0,31	1,07
25	1	0,64	0,76
5	2	0,21	1,96
10	2	0,45	0,82
25	2	0,69	0,70

Los resultados mostraron un efecto aditivo de la administración conjunta de $[\text{PtCl}_2(3,4\text{-dicloroanilina})(\text{NH}_3)]$ y melatonina en células HeLa al combinar la dosis de 1 μM del complejo de Pt(II) con las tres concentraciones (0,5, 1 y 2 mM) de melatonina, así como la combinación de 10 μM del complejo de Pt(II) con 2 mM melatonina. Por el contrario, el resto de combinaciones tuvieron efecto antagonista (Tabla 4.15.; Figura 4.31. A).

4. Resultados y discusión

Asimismo, como se puede observar en la Figura 4.31. B y la Tabla 4.16., las combinaciones de cualquier dosis de melatonina con las dosis altas (10 y 25 μM) del complejo de Pt(II) presentaron un efecto sinérgico en las células MDA-MB-231 (excepto la combinación 10 μM Pt + 1 mM Mel, que presentó efecto aditivo), a pesar de que a dosis bajas (5 μM) del complejo las combinaciones con melatonina tuvieron efecto antagonista. Esto sugiere que la capacidad de la melatonina como agente coadyuvante junto con el complejo $[\text{PtCl}_2(3,4\text{-dicloroanilina})(\text{NH}_3)]$ depende del tejido de donde procedan las células tumorales.

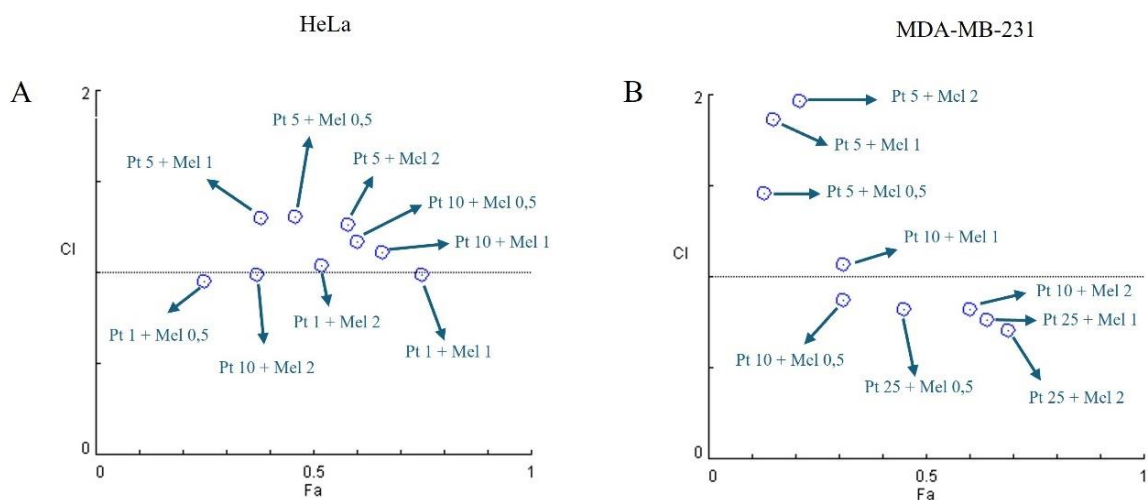


Figura 4.31. Efecto de la combinación de $[\text{PtCl}_2(3,4\text{-dicloroanilina})(\text{NH}_3)]$ y melatonina. Se muestra un gráfico de estimación del tratamiento combinado mediante los valores del índice de combinación (CI, eje y) y la fracción de células afectada (Fa, eje x) en las líneas celulares HeLa (A) y MDA-MB-231 (B). Para el cálculo se utilizaron $[\text{PtCl}_2(3,4\text{-dicloroanilina})(\text{NH}_3)]$ (Pt; 5, 10 y 25 μM) en MDA-MB-231 o (Pt; 1, 5 y 10 μM) en HeLa y melatonina (Mel; 0,5, 1 y 2 mM) para inducir la muerte celular a las concentraciones indicadas durante 24 horas.

5. CONCLUSIONES

5. Conclusiones

De los resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral en la que nos propusimos estudiar el efecto coadyuvante de la melatonina en la actividad quimioterapéutica de complejos metálicos derivados de CisPt utilizando células procedentes tanto de tumores sólidos (MDA-MB-231 y HeLa) como de tumores hematológicos (HL-60), podemos concluir que:

1. Los complejos de Pt(II) con ligandos bidentados derivados de heterociclos S, N y 3,5-difenilpirazol (PtDPhPzTn y PtDPhPzTz) mostraron un mayor efecto citotóxico que el fármaco de referencia CisPt y sus homólogos menos lipofílicos PtPzTz y PtPzTn en la línea celular MDA-MB-231. El complejo PtDPhPzTn presentó la mayor capacidad citotóxica. Además, el tratamiento combinado de PtDPhPzTn con melatonina potenció las propiedades pro-apoptóticas, citostáticas y/o antimigratorias del complejo de Pt(II) por sí solo en las células de cáncer de mama MDA-MB-231.
2. La incorporación de los complejos metálicos PtTdTn y PdTdTn en MSNs se llevó a cabo mediante la formación de enlaces covalentes entre los complejos y las MSNs, actuando como sistemas no clásicos de liberación de fármacos. Las MSNs funcionalizadas con los complejos metálicos no mejoraron su actividad citotóxica respecto de los complejos metálicos libres en la línea celular HeLa. Sin embargo, los sistemas funcionalizados con el derivado de melatonina 5MT junto con los respectivos compuestos de coordinación presentaron una mayor efectividad en comparación tanto con las MSNs solo funcionalizadas con los complejos metálicos como con los compuestos de coordinación libres. Así, los sistemas MSN-5MT-PtTdTn y MSN-5MT-PdTdTn mostraron un mayor efecto apoptótico y una mejor acumulación de los materiales en el citoplasma de las células HeLa debido a la presencia del derivado de melatonina.

3. El complejo de Pt(II) coordinado con la amina aromática 3,4-dicloroanilina se caracterizó mediante DRX, IR y ^1H -RMN. El complejo $[\text{PtCl}_2(3,4\text{-dicloroanilina})(\text{NH}_3)]$ mostró una potente actividad citotóxica en las líneas celulares testadas, siendo los valores de IC_{50} (HL-60) $<$ IC_{50} (HeLa) $<$ IC_{50} (MDA-MB-231). En general, los IC de la administración conjunta de melatonina y este complejo de Pt(II) presentaron un efecto sinérgico a altas dosis de complejo (10 y 25 μM) en las células MDA-MB-231 y aditivo a bajas concentraciones del complejo (1 μM) en las células HeLa. Por tanto, el efecto potenciador de la melatonina sobre la capacidad antitumoral de $[\text{PtCl}_2(3,4\text{-dicloroanilina})(\text{NH}_3)]$ parece depender del tejido de donde procedan las células tumorales.

6. BIBLIOGRAFÍA

6. Bibliografía

- Acuña-Castroviejo, D., Escames, G., Venegas, C., Díaz-Casado, M. E., Lima-Cabello, E., López, L. C., Rosales-Corral, S., Tan, D. X., & Reiter, R. J. (2014). Extrapineal melatonin: sources, regulation, and potential functions. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, *71*(16), 2997–3025. <https://doi.org/10.1007/S00018-014-1579-2>
- Agnieszka, G., Ewa, A., Anna, B., Krzysztof, B., Monika, C., & Elzbieta, S. (2014). Dinuclear berenil-platinum (II) complexes as modulators of apoptosis in human MCF-7 and MDA-MB231 breast cancer cells. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, *14*(8), 1179–1186. <https://doi.org/10.2174/1871520614666140623120809>
- Ahmad, S. (2010). Platinum–DNA Interactions and Subsequent Cellular Processes Controlling Sensitivity to Anticancer Platinum Complexes. *Chemistry & Biodiversity*, *7*(3), 543–566. <https://doi.org/10.1002/CBDV.200800340>
- Ajima, K., Yudasaka, M., Murakami, T., Maigné, A., Shiba, K., & Iijima, S. (2005). Carbon nanohorns as anticancer drug carriers. *Molecular Pharmaceutics*, *2*(6), 475–480. <https://doi.org/10.1021/mp0500566>
- Akhmetova, V. R., Akhmadiev, N. S., Abdullin, M. F., Dzhemileva, L. U., & D'Yakonov, V. A. (2020). Synthesis of new N,N'-Pd(Pt) complexes based on sulfanyl pyrazoles, and investigation of their in vitro anticancer activity. *RSC Advances*, *10*(26), 15116. <https://doi.org/10.1039/C9RA09783J>
- Alam, M. N., & Huq, F. (2016). Comprehensive review on tumour active palladium compounds and structure–activity relationships. *Coordination Chemistry Reviews*, *316*, 36–67. <https://doi.org/10.1016/J.CCR.2016.02.001>
- Almeida, E. R., Goliatt, P. V. Z. C., Dos Santos, H. F., & Picaud, F. (2024). Modeling the Cellular Uptake of Functionalized Carbon Nanohorns Loaded with Cisplatin through a Breast Cancer Cell Membrane. *Molecular Pharmaceutics*, *21*(1), 38–52. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.3c00379>
- Alsharif, Z. A., & Alam, M. A. (2017). Modular synthesis of thiazoline and thiazole derivatives by using a cascade protocol. *RSC Advances*, *7*(52), 32647–32651. <https://doi.org/10.1039/C7RA05993K>

- American Society of Clinical Oncology (ASCO). (2024). *¿Qué es la quimioterapia?* | *Cancer.Net*. <https://www.cancer.net/es/desplazarse-por-atencion-del-cancer/cómo-se-trata-el-cáncer/quimioterapia/qué-es-la-quimioterapia>
- Arendt, J., & Skene, D. J. (2005). Melatonin as a chronobiotic. *Sleep Medicine Reviews*, *9*(1), 25–39. <https://doi.org/10.1016/j.smr.2004.05.002>
- Arsalan, A., & Younus, H. (2018). Enzymes and nanoparticles: Modulation of enzymatic activity via nanoparticles. *International Journal of Biological Macromolecules*, *118*, 1833–1847. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2018.07.030>
- Aurelia Chis, A., Dobrea, C., Morgovan, C., Arseniu, A. M., Rus, L. L., Butuca, A., Juncan, A. M., Totan, M., Vonica-Tincu, A. L., Cormos, G., Muntean, A. C., Muresan, M. L., Gligor, F. G., & Frum, A. (2020). Applications and Limitations of Dendrimers in Biomedicine. *Molecules* *2020*, Vol. 25, Page 3982, *25*(17), 3982. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES25173982>
- Avgoustakis, K., Beletsi, A., Panagi, Z., Klepetsanis, P., Karydas, A. G., & Ithakissios, D. S. (2002). PLGA-mPEG nanoparticles of cisplatin: In vitro nanoparticle degradation, in vitro drug release and in vivo drug residence in blood properties. *Journal of Controlled Release*, *79*(1), 123–135. [https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(01\)00530-2](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(01)00530-2)
- Azzouzi, A. R., Lebdaï, S., Benzaghoul, F., & Stief, C. (2015). Vascular-targeted photodynamic therapy with TOOKAD® Soluble in localized prostate cancer: standardization of the procedure. *World Journal of Urology*, *33*(7), 937. <https://doi.org/10.1007/S00345-015-1535-2>
- Bai, X., Ali, A., Lv, Z., Wang, N., Zhao, X., Hao, H., Zhang, Y., & Rahman, F. U. (2021). Platinum complexes inhibit HER-2 enriched and triple-negative breast cancer cells metabolism to suppress growth, stemness and migration by targeting PKM/LDHA and CCND1/BCL2/ATG3 signaling pathways. *European Journal of Medicinal Chemistry*, *224*. <https://doi.org/10.1016/J.EJMECH.2021.113689>
- Balbín, A., Gaballo, F., Ceballos-Torres, J., Prashar, S., Fajardo, M., Kaluderović, G. N., & Gómez-Ruiz, S. (2014). Dual application of Pd nanoparticles supported

6. Bibliografía

- on mesoporous silica SBA-15 and MSU-2: supported catalysts for C–C coupling reactions and cytotoxic agents against human cancer cell lines. *RSC Advances*, 4(97), 54775–54787. <https://doi.org/10.1039/C4RA11759J>
- Barenholz, Y. (2012). Doxil®--the first FDA-approved nano-drug: lessons learned. *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society*, 160(2), 117–134. <https://doi.org/10.1016/J.JCONREL.2012.03.020>
- Basañez, G., Soane, L., & Hardwick, J. M. (2012). A new view of the lethal apoptotic pore. *PLoS Biology*, 10(9). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PBIO.1001399>
- Bayda, S., Adeel, M., Tuccinardi, T., Cordani, M., & Rizzolio, F. (2020). The History of Nanoscience and Nanotechnology: From Chemical–Physical Applications to Nanomedicine. *Molecules*, 25(1), 112. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES25010112>
- Bazsefidpar, P., Eftekhari, E., Jahromi, M. Z., Nikpoor, A. R., Moghadam, M. E., & Zolghadri, S. (2023). In-vitro cytotoxicity and in-vivo antitumor activity of two platinum complexes with 1,3-dimethyl pentyl glycine ligand against breast cancer. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 241, 112144. <https://doi.org/10.1016/J.JINORGBIO.2023.112144>
- Beck, O., Borg, S., & Lundman, A. (1982). Concentration of 5-methoxyindoles in the human pineal gland. *Journal of Neural Transmission*, 54(1–2), 111–116. <https://doi.org/10.1007/BF01249284/METRICS>
- Bejarano, I., Espino, J., González-Flores, D., Casado, J. G., Redondo, P. C., Rosado, J. A., Barriga, C., Pariente, J. A., & Rodríguez, A. B. (2009a). Role of Calcium Signals on Hydrogen Peroxide-Induced Apoptosis in Human Myeloid HL-60 Cells. *International Journal of Biomedical Science: IJBS*, 5(3), 246. [/pmc/articles/PMC3614781/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1714781/)
- Bejarano, I., Espino, J., Marchena, A. M., Barriga, C., Paredes, S. D., Rodríguez, A. B., & Pariente, J. A. (2011). Melatonin enhances hydrogen peroxide-induced apoptosis in human promyelocytic leukaemia HL-60 cells. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 353(1–2), 167–176. <https://doi.org/10.1007/S11010-011-0783-8>

- Bejarano, I., Redondo, P. C., Espino, J., Rosado, J. A., Paredes, S. D., Barriga, C., Reiter, R. J., Pariente, J. A., & Rodríguez, A. B. (2009b). Melatonin induces mitochondrial-mediated apoptosis in human myeloid HL-60 cells. *Journal of Pineal Research*, 46(4), 392–400. <https://doi.org/10.1111/J.1600-079X.2009.00675.X>
- Benítez-King, G., Huerto-Delgadillo, L., & Antón-Tay, F. (1993). Binding of 3H-melatonin to calmodulin. *Life Sciences*, 53(3), 201–207. [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(93\)90670-X](https://doi.org/10.1016/0024-3205(93)90670-X)
- Bielawski, K., Czarnomysy, R., Muszyńska, A., Bielawska, A., & Popławska, B. (2013). Cytotoxicity and induction of apoptosis of human breast cancer cells by novel platinum(II) complexes. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 35(2), 254–264. <https://doi.org/10.1016/J.ETAP.2012.12.010>
- Boess, F. G., Monsma, F. J., Carolo, C., Meyer, V., Rudler, A., Zwingelstein, C., & Sleight, A. J. (1997). Functional and radioligand binding characterization of rat 5-HT₆ receptors stably expressed in HEK293 cells. *Neuropharmacology*, 36(4–5), 713–720. [https://doi.org/10.1016/S0028-3908\(97\)00019-1](https://doi.org/10.1016/S0028-3908(97)00019-1)
- Boice, A., & Bouchier-Hayes, L. (2020). Targeting apoptotic caspases in cancer. *Biochimica et Biophysica Acta. Molecular Cell Research*, 1867(6). <https://doi.org/10.1016/J.BBAMCR.2020.118688>
- Bolos, C. A., Papazisis, K. T., Kortsaris, A. H., Voyatzi, S., Zambouli, D., & Kyriakidis, D. A. (2002). Antiproliferative activity of mixed-ligand dien-Cu(II) complexes with thiazole, thiazoline and imidazole derivatives. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 88(1), 25–36. [https://doi.org/10.1016/S0162-0134\(01\)00344-0](https://doi.org/10.1016/S0162-0134(01)00344-0)
- Boutin, J. A., Audinot, V., Ferry, G., & Delagrangé, P. (2005). Molecular tools to study melatonin pathways and actions. *Trends in Pharmacological Sciences*, 26(8), 412–419. <https://doi.org/10.1016/J.TIPS.2005.06.006>
- Boutin, J. A., & Ferry, G. (2019). Is There Sufficient Evidence that the Melatonin Binding Site MT₃ Is Quinone Reductase 2? *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 368(1), 59–65. <https://doi.org/10.1124/JPET.118.253260>

6. Bibliografía

- Bruckmann, F. D. S. ;, Nunes, F. B. ;, Salles, T. D. R. ;, Franco, C. ;, Cadoná, F. C., Rhoden, B., Schwaminger, S., Bondarenko, L., Da, F., Bruckmann, S., Nunes, F. B., Da, T., Salles, R., Franco, C., Cadoná, F. C., & Rodrigo, C. (2022). Biological Applications of Silica-Based Nanoparticles. *Magnetochemistry* 2022, Vol. 8, Page 131, 8(10), 131. <https://doi.org/10.3390/MAGNETOCHEMISTRY8100131>
- BRUKER, A. P. E. X. (2009). *Saint and SADABS* (Bruker AXS Inc.). [https://scholar.google.com/scholar_lookup?title=SADABS&publication_year=2012&author=A.X.S.I. Bruker](https://scholar.google.com/scholar_lookup?title=SADABS&publication_year=2012&author=A.X.S.I.Bruker)
- Bugarčić, Ž. D., Bogojeski, J., & van Eldik, R. (2015). Kinetics, mechanism and equilibrium studies on the substitution reactions of Pd(II) in reference to Pt(II) complexes with bio-molecules. *Coordination Chemistry Reviews*, 292, 91–106. <https://doi.org/10.1016/J.CCR.2015.02.016>
- Cade, C. E., & Clark, A. C. (2015). Proteases in apoptosis: Pathways, protocols and translational advances. In K. Bose (Ed.), *Caspases—Key Players in Apoptosis* (Springer). Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-19497-4/COVER>
- Cai, Q., Lin, W. Y., Xiao, F. S., Pang, W. Q., Chen, X. H., & Zou, B. S. (1999). The preparation of highly ordered MCM-41 with extremely low surfactant concentration. *Microporous and Mesoporous Materials*, 32(1–2), 1–15. [https://doi.org/10.1016/S1387-1811\(99\)00082-7](https://doi.org/10.1016/S1387-1811(99)00082-7)
- Carmody, R. J., & Cotter, T. G. (2001). Signalling apoptosis: a radical approach. *Redox Report: Communications in Free Radical Research*, 6(2), 77–90. <https://doi.org/10.1179/135100001101536085>
- Carrasco, C., Holguín-Arévalo, M. S., Martín-Partido, G., Rodríguez, A. B., & Pariente, J. A. (2014a). Chemopreventive effects of resveratrol in a rat model of cerulein-induced acute pancreatitis. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 387(1–2), 217–225. <https://doi.org/10.1007/S11010-013-1887-0/FIGURES/6>
- Carrasco, C., Marchena, A. M., Holguín-Arévalo, M. S., Martín-Partido, G., Rodríguez, A. B., Paredes, S. D., & Pariente, J. A. (2013). Anti-inflammatory

- effects of melatonin in a rat model of caerulein-induced acute pancreatitis. *Cell Biochemistry and Function*, 31(7), 585–590. <https://doi.org/10.1002/CBF.2942>
- Carrasco, C., Rodríguez, A. B., & Pariente, J. A. (2014b). Effects of melatonin on the oxidative damage and pancreatic antioxidant defenses in cerulein-induced acute pancreatitis in rats. *Hepatobiliary & Pancreatic Diseases International*, 13(4), 442–446. [https://doi.org/10.1016/S1499-3872\(14\)60271-X](https://doi.org/10.1016/S1499-3872(14)60271-X)
- Carrillo-Vico, A., Lardone, P. J., Naji, L., Fernández-Santos, J. M., Martín-Lacave, I., Guerrero, J. M., & Calvo, J. R. (2005). Beneficial pleiotropic actions of melatonin in an experimental model of septic shock in mice: regulation of pro-/anti-inflammatory cytokine network, protection against oxidative damage and anti-apoptotic effects. *Journal of Pineal Research*, 39(4), 400–408. <https://doi.org/10.1111/J.1600-079X.2005.00265.X>
- Cascales Angosto, M. (2003). Bases moleculares de la apoptosis. *Real Academia Nacional de Farmacia*, 69(1). https://core.ac.uk/display/230312047?utm_source=pdf&utm_medium=banner&utm_campaign=pdf-decoration-v1
- Castillo, R. R., Colilla, M., & Vallet-Regí, M. (2017). Advances in mesoporous silica-based nanocarriers for co-delivery and combination therapy against cancer. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 14(2), 229–243. <https://doi.org/10.1080/17425247.2016.1211637>
- Chaviara, A. T., Christidis, P. C., Papageorgiou, A., Chrysogelou, E., Hadjipavlou-Litina, D. J., & Bolos, C. A. (2005). In vivo anticancer, anti-inflammatory, and toxicity studies of mixed-ligand Cu(II) complexes of dien and its Schiff dibases with heterocyclic aldehydes and 2-amino-2-thiazoline. Crystal structure of [Cu(dien)(Br)(2a-2tzn)](Br)(H₂O). *Journal of Inorganic Biochemistry*, 99(11), 2102–2109. <https://doi.org/10.1016/J.JINORGBIO.2005.07.011>
- Chen, Y., Chen, H., & Shi, J. (2013). In vivo bio-safety evaluations and diagnostic/therapeutic applications of chemically designed mesoporous silica nanoparticles. *Advanced Materials (Deerfield Beach, Fla.)*, 25(23), 3144–3176. <https://doi.org/10.1002/ADMA.201205292>

6. Bibliografia

- Chiang, L., R. Jones, M., L. Ferreira, C., & Storr, T. (2012). Multifunctional Ligands in Medicinal Inorganic Chemistry- Current Trends and Future Directions. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 12(3), 122–144. <https://doi.org/10.2174/156802612799078973>
- Choudante, P. C., Nethi, S. K., Díaz-García, D., Prashar, S., Misra, S., Gómez-Ruiz, S., & Patra, C. R. (2022). Tin-loaded mesoporous silica nanoparticles: Antineoplastic properties and genotoxicity assessment. *Biomaterials Advances*, 137, 212819. <https://doi.org/10.1016/J.BIOADV.2022.212819>
- Colilla, M., & Vallet-Regí, M. (2020). Targeted Stimuli-Responsive Mesoporous Silica Nanoparticles for Bacterial Infection Treatment. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(22), 1–32. <https://doi.org/10.3390/IJMS21228605>
- Craciunescu, D. G., Furlani, A., Scarcia, V., Ghirvu, C., & Doadrio, A. (1985). On the synthesis, cytostatic and antitumor properties of new Pt(II) and Pt(IV) complexes with chloroanilines. *Chemico-Biological Interactions*, 53(1–2), 45–56. [https://doi.org/10.1016/S0009-2797\(85\)80083-1](https://doi.org/10.1016/S0009-2797(85)80083-1)
- Crul, M., van Waardenburg, R. C. A. M., Beijnen, J. H., & Schellens, J. H. M. (2002). DNA-based drug interactions of cisplatin. *Cancer Treatment Reviews*, 28(6), 291–303. [https://doi.org/10.1016/S0305-7372\(02\)00093-2](https://doi.org/10.1016/S0305-7372(02)00093-2)
- Cui, H., Goddard, R., Pörschke, K. R., Hamacher, A., & Kassack, M. U. (2014). Bispidine analogues of cisplatin, carboplatin, and oxaliplatin. Synthesis, structures, and cytotoxicity. *Inorganic Chemistry*, 53(7), 3371–3384. https://doi.org/10.1021/IC402737F/SUPPL_FILE/IC402737F_SI_002.CIF
- Czabotar, P. E., Lessene, G., Strasser, A., & Adams, J. M. (2014). Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 15(1), 49–63. <https://doi.org/10.1038/nrm3722>
- Czarnomysy, R., Surażyński, A., Muszynska, A., Gornowicz, A., Bielawska, A., & Bielawski, K. (2018a). A novel series of pyrazole-platinum(II) complexes as potential anti-cancer agents that induce cell cycle arrest and apoptosis in breast cancer cells. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 33(1), 1006–1023. <https://doi.org/10.1080/14756366.2018.1471687>

- Dabholkar, M., Vionnet, J., Bostick-Bruton, F., Yu, J. J., & Reed, E. (1994). Messenger RNA levels of XPAC and ERCC1 in ovarian cancer tissue correlate with response to platinum-based chemotherapy. *The Journal of Clinical Investigation*, *94*(2), 703–708. <https://doi.org/10.1172/JCI117388>
- D’Arcy, M. S. (2019). Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biology International*, *43*(6), 582–592. <https://doi.org/10.1002/CBIN.11137>
- Dasari, S., & Bernard Tchounwou, P. (2014). Cisplatin in cancer therapy: Molecular mechanisms of action. *European Journal of Pharmacology*, *740*, 364–378. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.07.025>
- Dauchy, R. T., Xiang, S., Mao, L., Brimer, S., Wren, M. A., Yuan, L., Anbalagan, M., Hauch, A., Frasc, T., Rowan, B. G., Blask, D. E., & Hill, S. M. (2014). Circadian and Melatonin Disruption by Exposure to Light at Night Drives Intrinsic Resistance to Tamoxifen Therapy in Breast Cancer. *Cancer Research*, *74*(15), 4099. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-3156>
- De Almagro, M. C., & Vucic, D. (2012). The inhibitor of apoptosis (IAP) proteins are critical regulators of signaling pathways and targets for anti-cancer therapy. *Experimental Oncology*, *34*(3), 200–211.
- De La Cruz Martínez, F. (2014). *Complejos de paladio y platino con ligandos derivados de 2-tiazolina*. Universidad de Extremadura.
- Dehand, J., Jordanov, J., & Beck, J. P. (1975). Anti-tumour activity of heavy transition metal complexes against hepatoma cells. *Chemico-Biological Interactions*, *11*(6), 605–609. [https://doi.org/10.1016/0009-2797\(75\)90035-6](https://doi.org/10.1016/0009-2797(75)90035-6)
- Di Pasqua, A. J., Wallner, S., Kerwood, D. J., & Dabrowiak, J. C. (2009). Adsorption of the PtII Anticancer Drug Carboplatin by Mesoporous Silica. *Chemistry & Biodiversity*, *6*(9), 1343–1349. <https://doi.org/10.1002/CBDV.200900021>
- Díaz-García, D., Fischer-Fodor, E., Vlad, C. I., Méndez-Arriaga, J. M., Prashar, S., & Gómez-Ruiz, S. (2021). Study of cancer cell cytotoxicity, internalization and modulation of growth factors induced by transferrin-conjugated formulations of metallodrug-functionalized mesoporous silica nanoparticles. *Microporous*

6. Bibliografía

- and Mesoporous Materials*, 323, 111238.
<https://doi.org/10.1016/J.MICROMESO.2021.111238>
- Díaz-García, D., Montalbán-Hernández, K., Mena-Palomo, I., Achimas-Cadariu, P., Rodríguez-Diéguez, A., López-Collazo, E., Prashar, S., Paredes, K. O., Filice, M., Fischer-Fodor, E., & Gómez-Ruiz, S. (2020). Role of Folic Acid in the Therapeutic Action of Nanostructured Porous Silica Functionalized with Organotin(IV) Compounds against Different Cancer Cell Lines. *Pharmaceutics*, 12(6), 1–23.
<https://doi.org/10.3390/PHARMACEUTICS12060512>
- Díaz-García, D., Prashar, S., Gómez-Ruiz, S., Rey, U., Carlos, J., & Tulipán, C. / (2023). Biological Use of Nanostructured Silica-Based Materials Functionalized with Metallodrugs: The Spanish Perspective. *International Journal of Molecular Sciences* 2023, Vol. 24, Page 2332, 24(3), 2332.
<https://doi.org/10.3390/IJMS24032332>
- Dichwalkar, T., Patel, S., Bapat, S., Pancholi, P., Jasani, N., Desai, B., Yellepeddi, V. K., & Sehdev, V. (2017). Omega-3 Fatty Acid Grafted PAMAM-Paclitaxel Conjugate Exhibits Enhanced Anticancer Activity in Upper Gastrointestinal Cancer Cells. *Macromolecular Bioscience*, 17(8).
<https://doi.org/10.1002/MABI.201600457>
- Dilruba, S., & Kalayda, G. V. (2016). Platinum-based drugs: past, present and future. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 2016 77:6, 77(6), 1103–1124.
<https://doi.org/10.1007/S00280-016-2976-Z>
- Ding, S., Lin, N., Sheng, X., Zhao, Y., Su, Y., Xu, L., Tong, R., Yan, Y., Fu, Y., He, J., Gao, Y., Yuan, A., Ye, L., Reiter, R. J., & Pu, J. (2019). Melatonin stabilizes rupture-prone vulnerable plaques via regulating macrophage polarization in a nuclear circadian receptor ROR α -dependent manner. *Journal of Pineal Research*, 67(2). <https://doi.org/10.1111/JPI.12581>
- Dotes, M. V. F., Sigüenza, C., & González-Díaz, P. F. (1986). Vibrational study of solid 3,4- and 2,6-dichloroanilines. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular Spectroscopy*, 42(9), 1029–1034. [https://doi.org/10.1016/0584-8539\(86\)80016-2](https://doi.org/10.1016/0584-8539(86)80016-2)

- Dragovich, T., Rudin, C. M., & Thompson, C. B. (1998). Signal transduction pathways that regulate cell survival and cell death. *Oncogene*, *17*(25), 3207–3213. <https://doi.org/10.1038/SJ.ONC.1202587>
- Dubocovich, M. L., & Markowska, M. (2005). Functional MT1 and MT2 melatonin receptors in mammals. *Endocrine*, *27*(2), 101–110. <https://doi.org/10.1385/ENDO:27:2:101>
- Elmore, S. (2007). Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology*, *35*(4), 495. <https://doi.org/10.1080/01926230701320337>
- El-Shenawy, S. M., Abdel-Salam, O. M. E., Baiuomy, A. R., El-Batran, S., & Arbid, M. S. (2002). Studies on the anti-inflammatory and anti-nociceptive effects of melatonin in the rat. *Pharmacological Research*, *46*(3), 235–243. [https://doi.org/10.1016/S1043-6618\(02\)00094-4](https://doi.org/10.1016/S1043-6618(02)00094-4)
- El-Sokkary, G. H., Ismail, I. A., & Saber, S. H. (2019). Melatonin inhibits breast cancer cell invasion through modulating DJ-1/KLF17/ID-1 signaling pathway. *Journal of Cellular Biochemistry*, *120*(3), 3945–3957. <https://doi.org/10.1002/JCB.27678>
- Espino, J., Bejarano, I., Ortiz, Á., Lozano, G. M., García, J. F., Pariente, J. A., & Rodríguez, A. B. (2010a). Melatonin as a potential tool against oxidative damage and apoptosis in ejaculated human spermatozoa. *Fertility and Sterility*, *94*(5), 1915–1917. <https://doi.org/10.1016/J.FERTNSTERT.2009.12.082>
- Espino, J., Bejarano, I., Paredes, S. D., Barriga, C., Reiter, R. J., Pariente, J. A., & Rodríguez, A. B. (2011a). Melatonin is able to delay endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis in leukocytes from elderly humans. *Age*, *33*(4), 497–507. <https://doi.org/10.1007/S11357-010-9194-0/TABLES/1>
- Espino, J., Bejarano, I., Paredes, S. D., Barriga, C., Rodríguez, A. B., & Pariente, J. A. (2011b). Protective effect of melatonin against human leukocyte apoptosis induced by intracellular calcium overload: relation with its antioxidant actions. *Journal of Pineal Research*, *51*(2), 195–206. <https://doi.org/10.1111/J.1600-079X.2011.00876.X>
- Espino, J., Bejarano, I., Paredes, S. D., González, D., Barriga, C., Reiter, R. J., Pariente, J. A., & Rodríguez, A. B. (2010b). Melatonin counteracts alterations

6. Bibliografía

- in oxidative metabolism and cell viability induced by intracellular calcium overload in human leucocytes: changes with age. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 107(1), 590–597. <https://doi.org/10.1111/J.1742-7843.2010.00546.X>
- Espino, J., Bejarano, I., Redondo, P. C., Rosado, J. A., Barriga, C., Reiter, R. J., Pariente, J. A., & Rodríguez, A. B. (2010c). Melatonin reduces apoptosis induced by calcium signaling in human leukocytes: Evidence for the involvement of mitochondria and bax activation. *Journal of Membrane Biology*, 233(1–3), 105–118. <https://doi.org/10.1007/S00232-010-9230-0/FIGURES/6>
- Espino, J., Fernández-Delgado, E., Estirado, S., de la Cruz-Martinez, F., Villa-Carballar, S., Viñuelas-Zahinos, E., Luna-Giles, F., & Pariente, J. A. (2020). Synthesis and structure of a new thiazoline-based palladium(II) complex that promotes cytotoxicity and apoptosis of human promyelocytic leukemia HL-60 cells. *Scientific Reports*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/S41598-020-73488-0>
- Fanelli, M., Formica, M., Fusi, V., Giorgi, L., Micheloni, M., & Paoli, P. (2016). New trends in platinum and palladium complexes as antineoplastic agents. *Coordination Chemistry Reviews*, 310, 41–79. <https://doi.org/10.1016/J.CCR.2015.11.004>
- Farez, M. F., Calandri, I. L., Correale, J., & Quintana, F. J. (2016). Anti-inflammatory effects of melatonin in multiple sclerosis. *BioEssays : News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*, 38(10), 1016–1026. <https://doi.org/10.1002/BIES.201600018>
- Faria, J. V., Vegi, P. F., Miguita, A. G. C., dos Santos, M. S., Boechat, N., & Bernardino, A. M. R. (2017). Recently reported biological activities of pyrazole compounds. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 25(21), 5891–5903. <https://doi.org/10.1016/J.BMC.2017.09.035>
- Feldman, E. J. (2015). Novel Therapeutics for Therapy-Related Acute Myeloid Leukemia: 2014. *Clinical Lymphoma, Myeloma & Leukemia*, 15 Suppl(S), S91–S93. <https://doi.org/10.1016/J.CLML.2015.02.031>

- Fereig, S. A., El-Zaafarany, G. M., Arafa, M. G., & Abdel-Mottaleb, M. M. A. (2020). Tackling the various classes of nano-therapeutics employed in topical therapy of psoriasis. *Drug Delivery*, 27(1), 662–680. <https://doi.org/10.1080/10717544.2020.1754527>
- Fernández Delgado, E. (2023). *Síntesis y caracterización de nuevos quimioterápicos derivados de pirazol y heterociclos S, N: Efectos sobre la apoptosis en líneas celulares tumorales*. Universidad de Extremadura.
- Fernández-Delgado, E., de la Cruz-Martínez, F., Galán, C., Franco, L., Espino, J., Viñuelas-Zahínos, E., Luna-Giles, F., & Bejarano, I. (2020). Pt(II) and Pd(II) complexes with a thiazoline derivative ligand: Synthesis, structural characterization, antiproliferative activity and evaluation of pro-apoptotic ability in tumor cell lines HT-29 and U-937. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 202. <https://doi.org/10.1016/J.JINORGBIO.2019.110870>
- Fernández-Delgado, E., Estirado, S., Espino, J., Viñuelas-Zahínos, E., Luna-Giles, F., Rodríguez Moratinos, A. B., & Pariente, J. A. (2022). Influence of ligand lipophilicity in Pt(II) complexes on their antiproliferative and apoptotic activities in tumour cell lines. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 227. <https://doi.org/10.1016/J.JINORGBIO.2021.111688>
- Fernando J. Barros, De la Cruz, F., Luna, F., Viñuelas, E., Pedrero, R., Bernalte, A., Franco, L., & Espino, J. (2015). Cristal structure and citotoxic activity in cancer cells of a new 2-thiazoline-based platinum(II) complex. *ISABC13: 13th International Symposium on Applied Bioinorganic Chemistry*. <https://speciation.net/Events/ISABC13-13th-International-Symposium-on-Applied-Bioinorganic-Chemistry-~/2014/09/08/7325.html>
- Ferreira, M., Assunção, L. S., Filippin-Monteiro, F. B., Creczynski-Pasa, T. B., & Sá, M. M. (2013). Synthesis of 1,3-thiazine-2,4-diones with potential anticancer activity. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 70, 411–418. <https://doi.org/10.1016/J.EJMECH.2013.10.017>
- Florea, A. M., & Büsselberg, D. (2011). Cisplatin as an anti-tumor drug: cellular mechanisms of activity, drug resistance and induced side effects. *Cancers*, 3(1), 1351–1371. <https://doi.org/10.3390/CANCERS3011351>

6. Bibliografia

- Foroodi, F., Wilhelmina, C. D., & Singh, G. (2009). Interactions of doxycycline with chemotherapeutic agents in human breast adenocarcinoma MDA-MB-231 cells. *Anti-Cancer Drugs*, 20(2), 115–122. <https://doi.org/10.1097/CAD.0B013E32831C14EC>
- Friedberg, E. C., Aguilera, A., Gellert, M., Hanawalt, P. C., Hays, J. B., Lehmann, A. R., Lindahl, T., Lowndes, N., Sarasin, A., & Wood, R. D. (2006). DNA repair: From molecular mechanism to human disease. *DNA Repair*, 5(8), 986–996. <https://doi.org/10.1016/J.DNAREP.2006.05.005>
- Fukunaga, K., Horikawa, K., Shibata, S., Takeuchi, Y., & Miyamoto, E. (2002). Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II-dependent long-term potentiation in the rat suprachiasmatic nucleus and its inhibition by melatonin. *Journal of Neuroscience Research*, 70(6), 799–807. <https://doi.org/10.1002/JNR.10400>
- Galabova, B. B. (2021). Mesoporous silica nanoparticles: Synthesis, functionalization, drug loading and release - A review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 20(5), 1091–1100. <https://doi.org/10.4314/TJPR.V20I5.30>
- Galluzzi, L., & Kroemer, G. (2017). Secondary Necrosis: Accidental No More. *Trends in Cancer*, 3(1), 1–2. <https://doi.org/10.1016/J.TRECAN.2016.12.001>
- Galluzzi, L., Vitale, I., Abrams, J. M., Alnemri, E. S., Baehrecke, E. H., Blagosklonny, M. V., Dawson, T. M., Dawson, V. L., El-Deiry, W. S., Fulda, S., Gottlieb, E., Green, D. R., Hengartner, M. O., Kepp, O., Knight, R. A., Kumar, S., Lipton, S. A., Lu, X., Madeo, F., ... Kroemer, G. (2012). Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death and Differentiation*, 19(1), 107–120. <https://doi.org/10.1038/CDD.2011.96>
- Galzin, A. M., Eon, M. T., Esnaud, H., Lee, C. R., Pevet, P., & Langer, S. Z. (1988). Day–night rhythm of 5-methoxytryptamine biosynthesis in the pineal gland of the golden hamster (*Mesocricetus auratus*). *Journal of Endocrinology*, 118(3), 389–397. <https://doi.org/10.1677/JOE.0.1180389>

- Gamboa Varela, J., De Chatterjee, A., Guevara, P., Ramirez, V., Metta-Magaña, A. J., Villagrán, D., Varela-Ramirez, A., Das, S., & Nuñez, J. E. (2014). Synthesis, characterization, and evaluation of cis-diphenyl pyridineamine platinum(II) complexes as potential anti-breast cancer agents. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, *19*(6), 967–979. <https://doi.org/10.1007/S00775-014-1133-6/METRICS>
- Gao, J., Liu, Y. G., & Zingaro, R. A. (2009). Cytotoxic activities, cellular uptake, gene regulation, and optical imaging of novel platinum(II) complexes. *Chemical Research in Toxicology*, *22*(10), 1705–1712. <https://doi.org/10.1021/TX900180V>
- Garrido-Castro, A. C., Lin, N. U., & Polyak, K. (2019). Insights into molecular classifications of triple-negative breast cancer: improving patient selection for treatment. *Cancer Discovery*, *9*(2), 176. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-18-1177>
- Gavas, S., Quazi, S., & Karpiński, T. M. (2021). Nanoparticles for Cancer Therapy: Current Progress and Challenges. *Nanoscale Research Letters*, *16*(1). <https://doi.org/10.1186/S11671-021-03628-6>
- Gelaleti, G. B., Borin, T. F., Maschio-Signorini, L. B., Moschetta, M. G., Jardim-Perassi, B. V., Calvino, G. B., Facchini, M. C., Vitoria-Petit, A. M., & de Campos Zuccari, D. A. P. (2017). Efficacy of melatonin, IL-25 and siIL-17B in tumorigenesis-associated properties of breast cancer cell lines. *Life Sciences*, *183*, 98–109. <https://doi.org/10.1016/J.LFS.2017.06.013>
- Giandomenico, C. M., Abrams, M. J., Murrer, B. A., Vollano, J. F., Rheinheimer, M. I., Wyer, S. B., Bossard, G. E., & Higgins, J. D. (1995). Carboxylation of Kinetically Inert Platinum(IV) Hydroxy Complexes. An Entrée into Orally Active Platinum(IV) Antitumor Agents. *Inorganic Chemistry*, *34*(5), 1015–1021. <https://doi.org/10.1021/IC00109A004>
- Gillies, L. A., & Kuwana, T. (2014). Apoptosis regulation at the mitochondrial outer membrane. *Journal of Cellular Biochemistry*, *115*(4), 632–640. <https://doi.org/10.1002/JCB.24709>

6. Bibliografía

- Gisbert-Garzarán, M., Lozano, D., & Vallet-Regí, M. (2020). Mesoporous Silica Nanoparticles for Targeting Subcellular Organelles. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(24), 1–18. <https://doi.org/10.3390/IJMS21249696>
- Goldar, S., Khaniani, M. S., Derakhshan, S. M., & Baradaran, B. (2015). Molecular mechanisms of apoptosis and roles in cancer development and treatment. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention: APJCP*, 16(6), 2129–2144. <https://doi.org/10.7314/APJCP.2015.16.6.2129>
- González-González, A., González, A., Rueda, N., Alonso-González, C., Menéndez, J. M., Martínez-Campa, C., Mitola, S., & Cos, S. (2020). Usefulness of melatonin as complementary to chemotherapeutic agents at different stages of the angiogenic process. *Scientific Reports*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/S41598-020-61622-X>
- Green, D. R. (2022a). Caspase Activation and Inhibition. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 14(8). <https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A041020>
- Green, D. R. (2022b). Caspases and Their Substrates. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 14(3), a041012. <https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A041012>
- Groom, C. R., Bruno, I. J., Lightfoot, M. P., & Ward, S. C. (2016). The Cambridge Structural Database. *STRUCTURAL SCIENCE CRYSTAL ENGINEERING MATERIALS*, 72(2), 171–179. <https://doi.org/10.1107/S2052520616003954>
- Gupta, J., Quadros, M., & Momin, M. (2023). Mesoporous silica nanoparticles: Synthesis and multifaceted functionalization for controlled drug delivery. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 81, 104305. <https://doi.org/10.1016/J.JDDST.2023.104305>
- Gupta, S. C., Hevia, D., Patchva, S., Park, B., Koh, W., & Aggarwal, B. B. (2012). Upsides and downsides of reactive oxygen species for cancer: the roles of reactive oxygen species in tumorigenesis, prevention, and therapy. *Antioxidants & Redox Signaling*, 16(11), 1295–1322. <https://doi.org/10.1089/ARS.2011.4414>

- Hajipour, F., Mahdavinia, M., & Fereidoonzehad, M. (2022). Half-Lantern Cyclometalated Platinum(II) Complexes as Anticancer Agents: Molecular Docking, Apoptosis, Cell Cycle Analysis, and Cytotoxic Activity Evaluations. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 22(6), 1149–1158. <https://doi.org/10.2174/1871520621666210713112105>
- Hambley, T. W. (1997). The influence of structure on the activity and toxicity of Pt anti-cancer drugs. *Coordination Chemistry Reviews*, 166, 181–223. [https://doi.org/10.1016/S0010-8545\(97\)00023-4](https://doi.org/10.1016/S0010-8545(97)00023-4)
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646–674. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2011.02.013>
- Hardeland, R., Cardinali, D. P., Srinivasan, V., Spence, D. W., Brown, G. M., & Pandi-Perumal, S. R. (2011). Melatonin--a pleiotropic, orchestrating regulator molecule. *Progress in Neurobiology*, 93(3), 350–384. <https://doi.org/10.1016/J.PNEUROBIO.2010.12.004>
- Hardeland, R., Madrid, J. A., Tan, D. X., & Reiter, R. J. (2012). Melatonin, the circadian multioscillator system and health: the need for detailed analyses of peripheral melatonin signaling. *Journal of Pineal Research*, 52(2), 139–166. <https://doi.org/10.1111/J.1600-079X.2011.00934.X>
- Hasan, M., Marzouk, M. A., Adhikari, S., Wright, T. D., Miller, B. P., Matossian, M. D., Elliott, S., Wright, M., Alzoubi, M., Collins-Burow, B. M., Burow, M. E., Holzgrabe, U., Zlotos, D. P., Stratford, R. E., & Witt-Enderby, P. A. (2019). Pharmacological, mechanistic, and pharmacokinetic assessment of novel melatonin-tamoxifen drug conjugates as breast cancer drugs. *Molecular Pharmacology*, 96(2), 272–296. <https://doi.org/10.1124/MOL.119.116202/-/DC1>
- He, H., Xiao, H., Kuang, H., Xie, Z., Chen, X., Jing, X., & Huang, Y. (2014). Synthesis of mesoporous silica nanoparticle–oxaliplatin conjugates for improved anticancer drug delivery. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 117, 75–81. <https://doi.org/10.1016/J.COLSURFB.2014.02.014>

6. Bibliografia

- He, X., Deng, H., & Hwang, H. min. (2019). The current application of nanotechnology in food and agriculture. *Journal of Food and Drug Analysis*, 27(1), 1–21. <https://doi.org/10.1016/J.JFDA.2018.12.002>
- Jadid, M. F. S., Aghaei, E., Taheri, E., Seyyedsani, N., Chavoshi, R., Abbasi, S., Khorrami, A., Goleij, P., Hajazimian, S., Taefehshokr, S., Isazadeh, A., & Shanehbandi, D. (2021). Melatonin increases the anticancer potential of doxorubicin in Caco-2 colorectal cancer cells. *Environmental Toxicology*, 36(6), 1061–1069. <https://doi.org/10.1002/TOX.23105>
- Jafari, S., Derakhshankhah, H., Alaei, L., Fattahi, A., Varnamkhasti, B. S., & Saboury, A. A. (2019). Mesoporous silica nanoparticles for therapeutic/diagnostic applications. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 109, 1100–1111. <https://doi.org/10.1016/J.BIOPHA.2018.10.167>
- Jamieson, E. R., & Lippard, S. J. (1999). Structure, recognition, and processing of cisplatin-DNA adducts. *Chemical Reviews*, 99(9), 2467–2498. <https://doi.org/10.1021/CR980421N>
- Jardin, I., Diez-Bello, R., Falcon, D., Alvarado, S., Regodon, S., Salido, G. M., Smani, T., & Rosado, J. A. (2021). Melatonin downregulates TRPC6, impairing store-operated calcium entry in triple-negative breast cancer cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 296. <https://doi.org/10.1074/JBC.RA120.015769>
- Jitkaew, S., Witasp, E., Zhang, S., Kagan, V. E., & Fadeel, B. (2009). Induction of caspase- and reactive oxygen species-independent phosphatidylserine externalization in primary human neutrophils: role in macrophage recognition and engulfment. *Journal of Leukocyte Biology*, 85(3), 427. <https://doi.org/10.1189/JLB.0408232>
- Jockers, R., Maurice, P., Boutin, J. A., & Delagrangé, P. (2008). Melatonin receptors, heterodimerization, signal transduction and binding sites: what's new? *British Journal of Pharmacology*, 154(6), 1182. <https://doi.org/10.1038/BJP.2008.184>
- Kankala, R. K., Zhang, H., Liu, C. G., Kanubaddi, K. R., Lee, C. H., Wang, S. Bin, Cui, W., Santos, H. A., Lin, K. L., & Chen, A. Z. (2019). Metal Species–Encapsulated Mesoporous Silica Nanoparticles: Current Advancements and

- Latest Breakthroughs. *Advanced Functional Materials*, 29(43), 1902652. <https://doi.org/10.1002/ADFM.201902652>
- Kapdi, A. R., & Fairlamb, I. J. S. (2014). Anti-cancer palladium complexes: a focus on PdX₂L₂, palladacycles and related complexes. *Chemical Society Reviews*, 43(13), 4751–4777. <https://doi.org/10.1039/C4CS00063C>
- Kelland, L. (2007). The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nature Reviews. Cancer*, 7(8), 573–584. <https://doi.org/10.1038/NRC2167>
- Keter, F. K., & Darkwa, J. (2012). Perspective: The potential of pyrazole-based compounds in medicine. *BioMetals*, 25(1), 9–21. <https://doi.org/10.1007/S10534-011-9496-4/METRICS>
- Khoury, A., Elias, E., Mehanna, S., Shebawy, W., Deo, K. M., Mansour, N., Khalil, C., Sayyed, K., Sakoff, J. A., Gilbert, J., Daher, C. F., Gordon, C. P., Taleb, R. I., & Aldrich-Wright, J. R. (2022). Novel Platinum(II) and Platinum(IV) Antitumor Agents that Exhibit Potent Cytotoxicity and Selectivity. *Journal of Medicinal Chemistry*, 65(24), 16481–16493. <https://doi.org/10.1021/ACS.JMEDCHEM.2C01310>
- Kilic, U., Kilic, E., Tuzcu, Z., Tuzcu, M., Ozercan, I. H., Yilmaz, O., Sahin, F., & Sahin, K. (2013). Melatonin suppresses cisplatin-induced nephrotoxicity via activation of Nrf-2/HO-1 pathway. *Nutrition and Metabolism*, 10(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/1743-7075-10-7/TABLES/2>
- Kinker, G. S., Ostrowski, L. H., Ribeiro, P. A. C., Chanoch, R., Muxel, S. M., Tirosh, I., Spadoni, G., Rivara, S., Martins, V. R., Santos, T. G., Markus, R. P., & Fernandes, P. A. C. M. (2021). MT1 and MT2 melatonin receptors play opposite roles in brain cancer progression. *Journal of Molecular Medicine*, 99(2), 289–301. <https://doi.org/10.1007/S00109-020-02023-5/FIGURES/5>
- Kleszczyński, K., Bilka, B., Stegemann, A., Flis, D. J., Ziolkowski, W., Pyza, E., Luger, T. A., Reiter, R. J., Böhm, M., & Slominski, A. T. (2018). Melatonin and Its Metabolites Ameliorate UVR-Induced Mitochondrial Oxidative Stress in Human MNT-1 Melanoma Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(12), 3786. <https://doi.org/10.3390/IJMS19123786>

6. Bibliografía

- Koşar, P. A., Nazıroğlu, M., Övey, İ. S., & Çiğ, B. (2016). Synergic Effects of Doxorubicin and Melatonin on Apoptosis and Mitochondrial Oxidative Stress in MCF-7 Breast Cancer Cells: Involvement of TRPV1 Channels. *The Journal of Membrane Biology*, 249(1–2), 129–140. <https://doi.org/10.1007/S00232-015-9855-0>
- Laux, P., Tentschert, J., Riebeling, C., Braeuning, A., Creutzenberg, O., Epp, A., Fessard, V., Haas, K. H., Haase, A., Hund-Rinke, K., Jakubowski, N., Kearns, P., Lampen, A., Rauscher, H., Schoonjans, R., Störmer, A., Thielmann, A., Mühle, U., & Luch, A. (2018). Nanomaterials: certain aspects of application, risk assessment and risk communication. *Archives of Toxicology*, 92(1), 121–141. <https://doi.org/10.1007/S00204-017-2144-1>
- Lazarević, T., Rilak, A., & Bugarčić, Ž. D. (2017). Platinum, palladium, gold and ruthenium complexes as anticancer agents: Current clinical uses, cytotoxicity studies and future perspectives. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 142, 8–31. <https://doi.org/10.1016/J.EJMECH.2017.04.007>
- Lee, H. W., Choi, Y. W., Han, J. H., Kim, J. H., Jung, J. H., Jeong, S. H., Kang, S. Y., Choi, J. H., Oh, Y. T., Park, K. J., Hwang, S. C., & Sheen, S. S. (2009). Expression of excision repair cross-complementation group 1 protein predicts poor outcome in advanced non-small cell lung cancer patients treated with platinum-based doublet chemotherapy. *Lung Cancer*, 65(3), 377–382. <https://doi.org/10.1016/J.LUNGCAN.2008.12.005>
- Lee, Y. T., Tan, Y. J., & Oon, C. E. (2018). Molecular targeted therapy: Treating cancer with specificity. *European Journal of Pharmacology*, 834, 188–196. <https://doi.org/10.1016/J.EJPHAR.2018.07.034>
- León, J., Macías, M., Escames, G., Camacho, E., Khaldy, H., Martín, M., Espinosa, A., Gallo, M. A., & Acuña-Castroviejo, D. (2000). Structure-related inhibition of calmodulin-dependent neuronal nitric-oxide synthase activity by melatonin and synthetic kynurenines. *Molecular Pharmacology*, 58(5), 967–975. <https://doi.org/10.1124/MOL.58.5.967>
- Li, H., Wu, X., Yang, B., Li, J., Xu, L., Liu, H., Li, S., Xu, J., Yang, M., & Wei, M. (2019). Evaluation of biomimetically synthesized mesoporous silica

- nanoparticles as drug carriers: Structure, wettability, degradation, biocompatibility and brain distribution. *Materials Science & Engineering. C, Materials for Biological Applications*, 94, 453–464. <https://doi.org/10.1016/J.MSEC.2018.09.053>
- Li, H., Yu, H., Zhu, C., Hu, J., Du, M., Zhang, F., & Yang, D. (2016). Cisplatin and doxorubicin dual-loaded mesoporous silica nanoparticles for controlled drug delivery. *RSC Advances*, 6(96), 94160–94169. <https://doi.org/10.1039/C6RA17213J>
- Lide, D. R. (2005). CRC Handbook of Chemistry and Physics 85th edition. In *CRC press*. https://books.google.com/books/about/CRC_Handbook_of_Chemistry_and_Physics_85.html?hl=es&id=WDI18hA006AC
- Lippard, S. J., & Ziegler, C. J. (2004). *Coordination complexes, and methods for preparing by combinatorial methods, assaying and using the same*. (Patent USOO6806289B1). United States Patent. <https://patentimages.storage.googleapis.com/5a/7e/9b/e6ed2e03c040b8/US6806289.pdf>
- Lissoni, P. (2007). Biochemotherapy with immunomodulating pineal hormones other than melatonin: 5-methoxytryptamine as a new oncostatic pineal agent. *Pathologie Biologie*, 55(3–4), 198–200. <https://doi.org/10.1016/j.patbio.2006.12.008>
- Lissoni, P., Malugani, F., Bukovec, R., Bordin, V., Perego, M., Mengo, S., Ardizzoia, A., & Tancini, G. (2003). Reduction of cisplatin-induced anemia by the pineal indole 5-methoxytryptamine in metastatic lung cancer patients. *Neuroendocrinology Letters Nos.1*, 24.
- Lissoni, P., Messina, G., & Rovelli, F. (2012). Cancer as the main aging factor for humans: the fundamental role of 5-methoxy-tryptamine in reversal of cancer-induced aging processes in metabolic and immune reactions by non-melatonin pineal hormones. *Current Aging Science*, 5(3), 231–235. <https://doi.org/10.2174/1874609811205030010>

6. Bibliografia

- Liu, J., Clough, S. J., Hutchinson, A. J., Adamah-Biassi, E. B., Popovska-Gorevski, M., & Dubocovich, M. L. (2016). MT1 and MT2 Melatonin Receptors: A Therapeutic Perspective. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, *56*, 361–383. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-PHARMTOX-010814-124742>
- Liu, Y., & Chen, X. J. (2013). Adenine nucleotide translocase, mitochondrial stress, and degenerative cell death. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2013*. <https://doi.org/10.1155/2013/146860>
- Liu, Y. P., Ling, Y., Qi, Q. F., Zhang, Y. P., Zhang, C. S., Zhu, C. T., Wang, M. H., & Pan, Y. D. (2013). The effects of ERCC1 expression levels on the chemosensitivity of gastric cancer cells to platinum agents and survival in gastric cancer patients treated with oxaliplatin-based adjuvant chemotherapy. *Oncology Letters*, *5*(3), 935–942. <https://doi.org/10.3892/OL.2012.1096>
- Lohiya, D. V, Mehendale, A. M., Lohiya, D. V, Lahoti, H. S., & Agrawal, V. N. (2023). Novel Chemotherapy Modalities for Different Cancers. *Cureus*, *15*(9). <https://doi.org/10.7759/CUREUS.45474>
- Lulla, P. D., Mamonkin, M., & Brenner, M. K. (2019). Adoptive Cell Therapy for Acute Myeloid Leukemia and T-cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *Cancer Journal (Sudbury, Mass.)*, *25*(3), 199. <https://doi.org/10.1097/PPO.0000000000000376>
- Ma, H., Iyer, S. P., Parmar, S., & Gong, Y. (2019). Adoptive cell therapy for acute myeloid leukemia. *Leukemia & Lymphoma*, *60*(6), 1370–1380. <https://doi.org/10.1080/10428194.2018.1553300>
- Macciò, A., & Madeddu, C. (2013). Cisplatin : an old drug with a newfound efficacy -- from mechanisms of action to cytotoxicity. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, *14*(13), 1839–1857. <https://doi.org/10.1517/14656566.2013.813934>
- Maciél, L. L. F., Silva, M. B., Moreira, R. O., Cardoso, A. P., Fernandes, C., Horn, A., de Aquino Almeida, J. C., & Kanashiro, M. M. (2022). In Vitro and In Vivo Relevant Antineoplastic Activity of Platinum(II) Complexes toward Triple-Negative MDA-MB-231 Breast Cancer Cell Line. *Pharmaceutics*, *14*(10). <https://doi.org/10.3390/PHARMACEUTICS14102013/S1>

- Macrae, C. F., Bruno, I. J., Chisholm, J. A., Edgington, P. R., McCabe, P., Pidcock, E., Rodriguez-Monge, L., Taylor, R., Van De Streek, J., & Wood, P. A. (2008). Mercury CSD 2.0 - New features for the visualization and investigation of crystal structures. *Journal of Applied Crystallography*, *41*(2), 466–470. <https://doi.org/10.1107/S0021889807067908>
- Mai, Z., Chen, J., Hu, Y., Liu, F., Fu, B., Zhang, H., Dong, X., Huang, W., & Zhou, W. (2017). Novel functional mesoporous silica nanoparticles loaded with Vitamin E acetate as smart platforms for pH responsive delivery with high bioactivity. *Journal of Colloid and Interface Science*, *508*, 184–195. <https://doi.org/10.1016/J.JCIS.2017.07.027>
- Makovec, T. (2019). Cisplatin and beyond: molecular mechanisms of action and drug resistance development in cancer chemotherapy. *Radiology and Oncology*, *53*(2), 148–158. <https://doi.org/10.2478/RAON-2019-0018>
- Mari, M., Morales, A., Colell, A., García-Ruiz, C., & Fernández-Checa, J. C. (2009). Mitochondrial glutathione, a key survival antioxidant. *Antioxidants & Redox Signaling*, *11*(11), 2685–2700. <https://doi.org/10.1089/ARS.2009.2695>
- Maroufi, N. F., Rashidi, M., Vahedian, V., Jahanbazi, R., Mostafaei, S., Akbarzadeh, M., Kazemzadeh, H., Nejabati, H. R., Isazadeh, A., Rashidi, M. R., & Nouri, M. (2022). Effect of Apatinib plus melatonin on vasculogenic mimicry formation by cancer stem cells from breast cancer cell line. *Breast Cancer*, *29*(2), 260–273. <https://doi.org/10.1007/S12282-021-01310-4/METRICS>
- McIlwain, D. R., Berger, T., & Mak, T. W. (2013). Caspase functions in cell death and disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *5*(4), 1–28. <https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A008656>
- Mehrzadi, S., Pourhanifeh, M. H., Mirzaei, A., Moradian, F., & Hosseinzadeh, A. (2021). An updated review of mechanistic potentials of melatonin against cancer: pivotal roles in angiogenesis, apoptosis, autophagy, endoplasmic reticulum stress and oxidative stress. *Cancer Cell International*, *21*(1). <https://doi.org/10.1186/S12935-021-01892-1>
- Méndez, J., Monteagudo, A., & Griebenow, K. (2012). Stimulus-responsive controlled release system by covalent immobilization of an enzyme into

6. Bibliografía

- mesoporous silica nanoparticles. *Bioconjugate Chemistry*, 23(4), 698–704. https://doi.org/10.1021/BC200301A/SUPPL_FILE/BC200301A_SI_001.PDF
- Mendoza, J., Martínez, J., Hernández, C., Pérez-Montiel, D., Castro, C., Fabián-Morales, E., Santibáñez, M., González-Barrios, R., Díaz-Chávez, J., Andonegui, M. A., Reynoso, N., Oñate, L. F., Jiménez, M. A., Núñez, M., Dyer, R., & Herrera, L. A. (2013). Association between ERCC1 and XPA expression and polymorphisms and the response to cisplatin in testicular germ cell tumours. *British Journal of Cancer*, 109(1), 68. <https://doi.org/10.1038/BJC.2013.303>
- Mi, Y., Zhao, J., & Feng, S. S. (2013). Targeted co-delivery of docetaxel, cisplatin and herceptin by vitamin E TPGS-cisplatin prodrug nanoparticles for multimodality treatment of cancer. *Journal of Controlled Release*, 169(3), 185–192. <https://doi.org/10.1016/J.JCONREL.2013.01.035>
- Montoliu Ferrera, H. J. (2000). *Caspasas. Las enzimas encargadas de ejecutar la apoptosis.* Características de Las Caspasas. <https://www.geocities.ws/hmontoliu/caspase/caspase-1.html>
- Morelli, C., Maris, P., Sisci, D., Perrotta, E., Brunelli, E., Perrotta, I., Panno, M. L., Tagarelli, A., Versace, C., Casula, M. F., Testa, F., Andò, S., Nagy, J. B., & Pasqua, L. (2011). PEG-templated mesoporous silica nanoparticles exclusively target cancer cells. *Nanoscale*, 3(8), 3198–3207. <https://doi.org/10.1039/C1NR10253B>
- Moreno, D., de Ilarduya, C. T., Bandrés, E., Buñuales, M., Azcona, M., García-Foncillas, J., & Garrido, M. J. (2008). Characterization of cisplatin cytotoxicity delivered from PLGA-systems. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 68(3), 503–512. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2007.08.006>
- Muir, M. M., Cadiz, M. E., & Baez, A. (1988). Synthesis and characterization of new platinum(II) complexes containing thiazole and imidazole donors. *Inorganica Chimica Acta*, 151(3), 209–213. [https://doi.org/10.1016/S0020-1693\(00\)83469-6](https://doi.org/10.1016/S0020-1693(00)83469-6)
- Munaweera, I., Shi, Y., Koneru, B., Patel, A., Dang, M. H., Di Pasqua, A. J., & Balkus, K. J. (2015). Nitric oxide- and cisplatin-releasing silica nanoparticles

- for use against non-small cell lung cancer. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 153, 23–31. <https://doi.org/10.1016/J.JINORGBIO.2015.09.002>
- Nagendra Prasad, T., Eeda, K. R., Gudise, V. B., Basha, S. F., & Anwar, S. (2019). Design, synthesis and biological evaluation of substituted 2-amino-1,3-thiazine derivatives as antituberculosis and anti-cancer agents. *Synthetic Communications*, 49(10), 1277–1285. <https://doi.org/10.1080/00397911.2019.1597125>
- Nakamoto, K. (1997). Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds, 5th ed. In *Wiley*. John Wiley and Sons. <https://doi.org/10.1002/9780470405840>
- Nam, L., Coll, C., Erthal, L. C. S., de la Torre, C., Serrano, D., Martínez-Mañez, R., Santos-Martínez, M. J., & Ruiz-Hernández, E. (2018). Drug Delivery Nanosystems for the Localized Treatment of Glioblastoma Multiforme. *Materials*, 11(5). <https://doi.org/10.3390/MA11050779>
- Newman, M. S., Colbern, G. T., Working, P. K., Engbers, C., & Amantea, M. A. (1999). Comparative pharmacokinetics, tissue distribution, and therapeutic effectiveness of cisplatin encapsulated in long-circulating, pegylated liposomes (SPI-077) in tumor-bearing mice. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 43(1), 1–7. <https://doi.org/10.1007/s002800050855>
- Niemelä, E., Desai, D., Nkizinkiko, Y., Eriksson, J. E., & Rosenholm, J. M. (2015). Sugar-decorated mesoporous silica nanoparticles as delivery vehicles for the poorly soluble drug celastrol enables targeted induction of apoptosis in cancer cells. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics : Official Journal of Arbeitsgemeinschaft Fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V*, 96, 11–21. <https://doi.org/10.1016/J.EJPB.2015.07.009>
- Nigam, S., & Bahadur, D. (2017). Dendrimer-conjugated iron oxide nanoparticles as stimuli-responsive drug carriers for thermally-activated chemotherapy of cancer. *Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces*, 155, 182–192. <https://doi.org/10.1016/J.COLSURFB.2017.04.025>
- Nooshinfar, E., Bashash, D., Safaroghli-Azar, A., Bayati, S., Rezaei-Tavirani, M., Ghaffari, S. H., & Akbari, M. E. (2016). Melatonin promotes ATO-induced

6. Bibliografía

- apoptosis in MCF-7 cells: Proposing novel therapeutic potential for breast cancer. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 83, 456–465. <https://doi.org/10.1016/J.BIOPHA.2016.07.004>
- Ortiz, F., Acuña-Castroviejo, D., Doerrier, C., Dayoub, J. C., López, L. C., Venegas, C., García, J. A., López, A., Volt, H., Luna-Sánchez, M., & Escames, G. (2015). Melatonin blunts the mitochondrial/NLRP3 connection and protects against radiation-induced oral mucositis. *Journal of Pineal Research*, 58(1), 34–49. <https://doi.org/10.1111/JPI.12191>
- Ou, L., Lin, S., Song, B., Liu, J., Lai, R., & Shao, L. (2017). The mechanisms of graphene-based materials-induced programmed cell death: a review of apoptosis, autophagy, and programmed necrosis. *International Journal of Nanomedicine*, 12, 6633–6646. <https://doi.org/10.2147/IJN.S140526>
- Outcalt, R. J. (1987). On the reaction of 2-chloroethylisothiocyanate with aromatic amines. *Journal of Heterocyclic Chemistry*, 24(5), 1425–1428. <https://doi.org/10.1002/JHET.5570240540>
- Ovejero-Paredes, K., Díaz-García, D., Mena-Palomo, I., Marciello, M., Lozano-Chamizo, L., Morato, Y. L., Prashar, S., Gómez-Ruiz, S., & Filice, M. (2022). Synthesis of a theranostic platform based on fibrous silica nanoparticles for the enhanced treatment of triple-negative breast cancer promoted by a combination of chemotherapeutic agents. *Biomaterials Advances*, 137, 212823. <https://doi.org/10.1016/J.BIOADV.2022.212823>
- Pandi-Perumal, S. R., Srinivasan, V., Maestroni, G. J. M., Cardinali, D. P., Poeggeler, B., & Hardeland, R. (2006). Melatonin. *The FEBS Journal*, 273(13), 2813–2838. <https://doi.org/10.1111/J.1742-4658.2006.05322.X>
- Panzer, A., Lottering, M. L., Bianchi, P., Glencross, D. K., Stark, J. H., & Seegers, J. C. (1998). Melatonin has no effect on the growth, morphology or cell cycle of human breast cancer (MCF-7), cervical cancer (HeLa), osteosarcoma (MG-63) or lymphoblastoid (TK6) cells. *Cancer Letters*, 122(1–2), 17–23. [https://doi.org/10.1016/S0304-3835\(97\)00360-1](https://doi.org/10.1016/S0304-3835(97)00360-1)
- Pariante, R., Bejarano, I., Espino, J., Rodríguez, A. B., & Pariante, J. A. (2017). Participation of MT3 melatonin receptors in the synergistic effect of melatonin

- on cytotoxic and apoptotic actions evoked by chemotherapeutics. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 80(5), 985–998. <https://doi.org/10.1007/S00280-017-3441-3>
- Pariente, R., Bejarano, I., Rodríguez, A. B., Pariente, J. A., & Espino, J. (2018). Melatonin increases the effect of 5-fluorouracil-based chemotherapy in human colorectal adenocarcinoma cells in vitro. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 440(1–2), 43–51. <https://doi.org/10.1007/S11010-017-3154-2/FIGURES/5>
- Pariente, R., Pariente, J. A., Rodríguez, A. B., & Espino, J. (2016). Melatonin sensitizes human cervical cancer HeLa cells to cisplatin-induced cytotoxicity and apoptosis: effects on oxidative stress and DNA fragmentation. *Journal of Pineal Research*, 60(1), 55–64. <https://doi.org/10.1111/JPI.12288>
- Petroněk, M. S., Stolwijk, J. M., Murray, S. D., Steinbach, E. J., Zakharia, Y., Buettner, G. R., Spitz, D. R., & Allen, B. G. (2021). Utilization of redox modulating small molecules that selectively act as pro-oxidants in cancer cells to open a therapeutic window for improving cancer therapy. *Redox Biology*, 42. <https://doi.org/10.1016/J.REDOX.2021.101864>
- Pistritto, G., Trisciuglio, D., Ceci, C., Alessia Garufi, & D’Orazi, G. (2016). Apoptosis as anticancer mechanism: function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies. *Aging*, 8(4), 603–619. <https://doi.org/10.18632/AGING.100934>
- Plati, J., Bucur, O., & Khosravi-Far, R. (2011). Apoptotic cell signaling in cancer progression and therapy. *Integrative Biology: Quantitative Biosciences from Nano to Macro*, 3(4), 279. <https://doi.org/10.1039/C0IB00144A>
- Poeggeler, B., Thuermann, S., Dose, A., Schoenke, M., Burkhardt, S., & Hardeland, R. (2002). Melatonin’s unique radical scavenging properties - Roles of its functional substituents as revealed by a comparison with its structural analogs. *Journal of Pineal Research*, 33(1), 20–30. <https://doi.org/10.1034/j.1600-079X.2002.01873.x>
- Poyton, R. O., Ball, K. A., & Castello, P. R. (2009). Mitochondrial generation of free radicals and hypoxic signaling. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 20(7), 332–340. <https://doi.org/10.1016/J.TEM.2009.04.001>

6. Bibliografía

- Poza, J. J., Pujol, M., Ortega-Albás, J. J., & Romero, O. (2022). Melatonin in sleep disorders. *Neurología*, *37*(7), 575–585. <https://doi.org/10.1016/J.NRLENG.2018.08.004>
- Pretsch, E., Bühlmann, P., Affolter, C., Herrera, A., & Martínez, R. (2001). *Determinación Estructural de Compuestos Orgánicos* (Springer-V). <https://www.cervantes.com/libro/9788407005262/determinacion-estructural-de-compuestos-organicos/>
- Price, J. H., Williamson, A. N., Schramm, R. F., & Wayland, B. B. (1972). Palladium(II) and Platinum(II) Alkyl Sulfoxide Complexes. Examples of Sulfur-Bonded, Mixed Sulfur- and Oxygen-Bonded, and Totally Oxygen-Bonded Complexes. *Inorganic Chemistry*, *11*(6), 1280–1284. https://doi.org/10.1021/IC50112A025/ASSET/IC50112A025.FP.PNG_V03
- Pu, X., Li, J., Qiao, P., Li, M., Wang, H., Zong, L., Yuan, Q., & Duan, S. (2019). Mesoporous Silica Nanoparticles as a Prospective and Promising Approach for Drug Delivery and Biomedical Applications. *Current Cancer Drug Targets*, *19*(4), 285–295. <https://doi.org/10.2174/1568009619666181206114904>
- Querino, A. L. de A., Enes, K. B., Chaves, O. A., Dittz, D., Couri, M. R. C., Diniz, R., & Silva, H. (2020). Modified pyrazole platinum(II) complex can circumvent albumin and glutathione: Synthesis, structure and cytotoxic activity. *Bioorganic Chemistry*, *100*. <https://doi.org/10.1016/J.BIOORG.2020.103936>
- Rabik, C. A., & Dolan, M. E. (2007). Molecular Mechanisms of Resistance and Toxicity Associated with Platinating Agents. *Cancer Treatment Reviews*, *33*(1), 9. <https://doi.org/10.1016/J.CTRV.2006.09.006>
- Raynaud, F., & Pévet, P. (1991). 5-Methoxytryptamine is metabolized by monoamine oxidase A in the pineal gland and plasma of golden hamsters. *Neuroscience Letters*, *123*(2), 172–174. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(91\)90923-H](https://doi.org/10.1016/0304-3940(91)90923-H)
- Reiter, R. J. (1993). The melatonin rhythm: both a clock and a calendar. *Experientia*, *49*(8), 654–664. <https://doi.org/10.1007/BF01923947>
- Reiter, R. J., Rosales-Corral, S. A., Tan, D. X., Acuna-Castroviejo, D., Qin, L., Yang, S. F., & Xu, K. (2017). Melatonin, a Full Service Anti-Cancer Agent: Inhibition

- of Initiation, Progression and Metastasis. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(4). <https://doi.org/10.3390/IJMS18040843>
- Reiter, R. J., Tan, D. X., & Lorena, F. B. (2010). Melatonin: A Multitasking Molecule. *Progress in Brain Research*, 181(C), 127–151. [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(08\)81008-4](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(08)81008-4)
- Reppert, S. M., Godson, C., Mahle, C. D., Weaver, D. R., Slaugenhaupt, S. A., & Gusella, J. F. (1995). Molecular characterization of a second melatonin receptor expressed in human retina and brain: the Mel1b melatonin receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(19), 8734–8738. <https://doi.org/10.1073/PNAS.92.19.8734>
- Reppert, S. M., Weaver, D. R., & Ebisawa, T. (1994). Cloning and characterization of a mammalian melatonin receptor that mediates reproductive and circadian responses. *Neuron*, 13(5), 1177–1185. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(94\)90055-8](https://doi.org/10.1016/0896-6273(94)90055-8)
- Rochon, F. D., & Buculei, V. (2005). Study of Pt(II)-cyclic amines complexes of the types cis- and trans-Pt(amine)₂I₂ and cis- and trans-Pt(amine)₂(NO₃)₂ and their aqueous products. *Inorganica Chimica Acta*, 358(6), 2040–2056. <https://doi.org/10.1016/J.ICA.2004.12.030>
- Rosenberg, B., Van Camp, L., & Krigas, T. (1965). Inhibition of Cell Division in Escherichia coli by Electrolysis Products from a Platinum Electrode. *Nature*, 205(4972), 698–699. <https://doi.org/10.1038/205698a0>
- Sadelain, M. (2016). A new induction to the gene and cell therapy hall of fame: Genome editing. *Molecular Therapy*, 24(3), 407–408. <https://doi.org/10.1038/mt.2016.25>
- Sang, X., Li, L., Rui, C., Liu, Y., Liu, Z., Tao, Z., Cheng, H., & Liu, P. (2021). Induction of EnR stress by Melatonin enhances the cytotoxic effect of Lapatinib in HER2-positive breast cancer. *Cancer Letters*, 518, 82–93. <https://doi.org/10.1016/J.CANLET.2021.06.011>
- Shaker, M., Adam, S., Makhlof, M. M., Mamdouh, |, Mohamed, A., Ahmed, |, Mohamad, D. M., Desoky, A., & Mohamad, M. (2022). Promoted catalytic potential in sulfides oxidation and biological screening of green Pd(II) and

6. Bibliografía

- Co(II) complexes of salicylidene isatin hydrazone ligand. *Applied Organometallic Chemistry*, 36(6), e6688. <https://doi.org/10.1002/AOC.6688>
- Shang, Y., Xu, S. P., Wu, Y., Jiang, Y. X., Wu, Z. Y., Yuan, S. Y., & Yao, S. L. (2009). Melatonin reduces acute lung injury in endotoxemic rats. *Chinese Medical Journal*, 122(12), 1388–1393. <https://doi.org/10.3760/CMA.J.ISSN.0366-6999.2009.12.006>
- Sheldrick, G. M. (2015). Crystal structure refinement with SHELXL. *Acta Crystallographica. Section C, Structural Chemistry*, 71, 3–8. <https://doi.org/10.1107/S2053229614024218>
- Sheldrick, M. (2014). *Program for Crystal Structures Solution (SHELXS-14)*.
- Short, N. J., Rytting, M. E., & Cortes, J. E. (2018). Acute myeloid leukaemia. *Lancet (London, England)*, 392(10147), 593–606. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31041-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31041-9)
- Shubach, A. P. J., Galindo, A. M., & Mora, R. M. S. (2015). Regulacion de la familia de proteínas BCL-2 en células infectadas con Chlamydia trachomatis. *NOVA*, 13(24), 83–93. <https://go.gale.com/ps/i.do?p=IFME&sw=w&issn=17942470&v=2.1&it=r&id=GALE%7CA540331530&sid=googleScholar&linkaccess=fulltext>
- Siddiqui, B., Rehman, A. ur, Haq, I. ul, Al-Dossary, A. A., Elaissari, A., & Ahmed, N. (2022). Exploiting recent trends for the synthesis and surface functionalization of mesoporous silica nanoparticles towards biomedical applications. *International Journal of Pharmaceutics: X*, 4, 100116. <https://doi.org/10.1016/J.IJPX.2022.100116>
- Sing, K. S. W., Everett, D. H., Haul, R. A. W., Moscou, L., Pierotti, R. A., Rouquerol, J., & Siemieniewska, T. (1985). Reporting Physisorption Data for Gas/Solid Systems with Special Reference to the Determination of Surface Area and Porosity. *Pure and Applied Chemistry*, 57(4), 603–619. <https://doi.org/10.1351/PAC198557040603>
- Sing, K. S. W., & Williams, R. T. (2004). Physisorption Hysteresis Loops and the Characterization of Nanoporous Materials. *Adsorption Science and Technology*, 22(10), 773–782. <https://doi.org/10.1260/0263617053499032>

- Sodagar Taleghani, A., Ebrahimnejad, P., Heidarinasab, A., & Akbarzadeh, A. (2019). Sugar-conjugated dendritic mesoporous silica nanoparticles as pH-responsive nanocarriers for tumor targeting and controlled release of deferasirox. *Materials Science & Engineering. C*, *98*, 358–368. <https://doi.org/10.1016/J.MSEC.2018.12.138>
- Sondhi, S. M., Rani, R., Gupta, P. P., Agrawal, S. K., & Saxena, A. K. (2009). Synthesis, anticancer, and anti-inflammatory activity evaluation of methanesulfonamide and amidine derivatives of 3,4-diaryl-2-imino-4-thiazolines. *Molecular Diversity*, *13*(3), 357–366. <https://doi.org/10.1007/S11030-009-9125-0/METRICS>
- Song, F., Li, Y., Wang, S., Zhang, L., & Chen, Q. L. (2019). Multifunctional dual-mesoporous silica nanoparticles loaded with a protein and dual antitumor drugs as a targeted delivery system. *New Journal of Chemistry*, *43*(44), 17284–17297. <https://doi.org/10.1039/C9NJ03001H>
- Spectral database for organic compounds SDBS*. (2024).
- Su, S. C., Hsieh, M. J., Yang, W. E., Chung, W. H., Reiter, R. J., & Yang, S. F. (2017). Cancer metastasis: Mechanisms of inhibition by melatonin. *Journal of Pineal Research*, *62*(1), e12370. <https://doi.org/10.1111/JPI.12370>
- Sun, G. (2024). Death and survival from executioner caspase activation. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, *156*. <https://doi.org/10.1016/J.SEMCDB.2023.07.005>
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, *71*(3), 209–249. <https://doi.org/10.3322/CAAC.21660>
- Takami, A. (2018). Hematopoietic stem cell transplantation for acute myeloid leukemia. *International Journal of Hematology*, *107*(5), 513–518. <https://doi.org/10.1007/S12185-018-2412-8>
- Tan, D. X., Manchester, L. C., Qin, L., & Reiter, R. J. (2016). Melatonin: A Mitochondrial Targeting Molecule Involving Mitochondrial Protection and

6. Bibliografía

- Dynamics. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(12).
<https://doi.org/10.3390/IJMS17122124>
- Tang, D., Kang, R., Berghe, T. Vanden, Vandenabeele, P., & Kroemer, G. (2019). The molecular machinery of regulated cell death. *Cell Research*, 29(5), 347–364. <https://doi.org/10.1038/S41422-019-0164-5>
- Torabi, M., Aghanejad, A., Savadi, P., Barzegari, A., Omidi, Y., & Barar, J. (2023). Fabrication of mesoporous silica nanoparticles for targeted delivery of sunitinib to ovarian cancer cells. *BioImpacts: BI*, 13(3), 255–267. <https://doi.org/10.34172/BI.2023.25298>
- Tower, J. (2015). Programmed cell death in aging. *Ageing Research Reviews*, 23(Pt A), 90–100. <https://doi.org/10.1016/J.ARR.2015.04.002>
- Tran, Q. H., Hoang, D. H., Song, M., Choe, W., Kang, I., Kim, S. S., & Ha, J. (2021). Melatonin and doxorubicin synergistically enhance apoptosis via autophagy-dependent reduction of AMPK α 1 transcription in human breast cancer cells. *Experimental & Molecular Medicine*, 53(9), 1413–1422. <https://doi.org/10.1038/S12276-021-00675-Y>
- Tripisciano, C., Kraemer, K., Taylor, A., & Borowiak-Palen, E. (2009). Single-wall carbon nanotubes based anticancer drug delivery system. *Chemical Physics Letters*, 478(4), 200–205. <https://doi.org/10.1016/j.cplett.2009.07.071>
- Tsvetkova, D., & Ivanova, S. (2022). Application of Approved Cisplatin Derivatives in Combination Therapy against Different Cancer Diseases. *Molecules* 2022, Vol. 27, Page 2466, 27(8), 2466. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES27082466>
- Ugalde-Arbizu, M., Aguilera-Correa, J. J., García-Almodóvar, V., Ovejero-Paredes, K., Díaz-García, D., Esteban, J., Páez, P. L., Prashar, S., San Sebastian, E., Filice, M., & Gómez-Ruiz, S. (2023). Dual Anticancer and Antibacterial Properties of Silica-Based Theranostic Nanomaterials Functionalized with Coumarin343, Folic Acid and a Cytotoxic Organotin(IV) Metallodrug. *Pharmaceutics*, 15(2). <https://doi.org/10.3390/PHARMACEUTICS15020560>
- Uguz, A. C., Cig, B., Espino, J., Bejarano, I., Naziroglu, M., Rodríguez, A. B., & Pariente, J. A. (2012). Melatonin potentiates chemotherapy-induced

- cytotoxicity and apoptosis in rat pancreatic tumor cells. *Journal of Pineal Research*, 53(1), 91–98. <https://doi.org/10.1111/J.1600-079X.2012.00974.X>
- Villanueva, P. J., Martinez, A., Baca, S. T., DeJesus, R. E., Larragoity, M., Contreras, L., Gutierrez, D. A., Varela-Ramirez, A., & Aguilera, R. J. (2018). Pyronaridine exerts potent cytotoxicity on human breast and hematological cancer cells through induction of apoptosis. *PLoS ONE*, 13(11). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0206467>
- Vojtek, M., Marques, M. P. M., Ferreira, I. M. P. L. V. O., Mota-Filipe, H., & Diniz, C. (2019). Anticancer activity of palladium-based complexes against triple-negative breast cancer. *Drug Discovery Today*, 24(4), 1044–1058. <https://doi.org/10.1016/J.DRUDIS.2019.02.012>
- Voronina, S., Okeke, E., Parker, T., & Tepikin, A. (2014). How to win ATP and influence Ca(2+) signaling. *Cell Calcium*, 55(3), 131–138. <https://doi.org/10.1016/J.CECA.2014.02.010>
- Wang, Y., Zhao, Q., Han, N., Bai, L., Li, J., Liu, J., Che, E., Hu, L., Zhang, Q., Jiang, T., & Wang, S. (2015). Mesoporous silica nanoparticles in drug delivery and biomedical applications. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 11(2), 313–327. <https://doi.org/10.1016/J.NANO.2014.09.014>
- Wheate, N. J., Walker, S., Craig, G. E., & Oun, R. (2010). The status of platinum anticancer drugs in the clinic and in clinical trials. *Dalton Transactions*, 39(35), 8113–8127. <https://doi.org/10.1039/C0DT00292E>
- Willis, S. N., Fletcher, J. I., Kaufmann, T., Van Delft, M. F., Chen, L., Czabotar, P. E., Ierino, H., Lee, E. F., Fairlie, W. D., Bouillet, P., Strasser, A., Kluck, R. M., Adams, J. M., & Huang, D. C. S. (2007). Apoptosis initiated when BH3 ligands engage multiple Bcl-2 homologs, not Bax or Bak. *Science (New York, N.Y.)*, 315(5813), 856–859. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1133289>
- Wilson, J. J., & Lippard, S. J. (2014). Synthetic methods for the preparation of platinum anticancer complexes. *Chemical Reviews*, 114(8), 4470–4495. <https://doi.org/10.1021/CR4004314>

6. Bibliografía

- Wong, R. S. Y. (2011). Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research: CR*, 30(1), 87. <https://doi.org/10.1186/1756-9966-30-87>
- Woo, S. M., Min, K. J., & Kwon, T. K. (2015). Melatonin-mediated Bim up-regulation and cyclooxygenase-2 (COX-2) down-regulation enhances tunicamycin-induced apoptosis in MDA-MB-231 cells. *Journal of Pineal Research*, 58(3), 310–320. <https://doi.org/10.1111/JPI.12217>
- Wu, P. H., Gurevich, N., & Carlen, P. L. (1988). Serotonin-1A receptor activation in hippocampal CA1 neurons by 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino)tetralin, 5-methoxytryptamine and 5-hydroxytryptamine. *Neuroscience Letters*, 86(1), 72–76. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(88\)90185-1](https://doi.org/10.1016/0304-3940(88)90185-1)
- Wu, W. J., Zhang, Y., Zeng, Z. L., Li, X. B., Hu, K. S., Luo, H. Y., Yang, J., Huang, P., & Xu, R. H. (2013). β -Phenylethyl isothiocyanate reverses platinum resistance by a GSH-dependent mechanism in cancer cells with epithelial-mesenchymal transition phenotype. *Biochemical Pharmacology*, 85(4), 486–496. <https://doi.org/10.1016/J.BCP.2012.11.017>
- Xiang, S., Dauchy, R. T., Hauch, A., Mao, L., Yuan, L., Wren, M. A., Belancio, V. P., Mondal, D., Frasch, T., Blask, D. E., & Hill, S. M. (2015). Doxorubicin Resistance in Breast Cancer is Driven by Light at Night Induced Disruption of the Circadian Melatonin Signal. *Journal of Pineal Research*, 59(1), 60. <https://doi.org/10.1111/JPI.12239>
- Yamada, J., Sugimoto, Y., Yoshikawa, T., & Horisaka, K. (1997). Hyperglycemia induced by the 5-HT receptor agonist, 5-methoxytryptamine, in rats: involvement of the peripheral 5-HT_{2A} receptor. *European Journal of Pharmacology*, 323(2–3), 235–240. [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(97\)00029-0](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(97)00029-0)
- Yang, P., Gai, S., & Lin, J. (2012). Functionalized mesoporous silica materials for controlled drug delivery. *Chemical Society Reviews*, 41(9), 3679–3698. <https://doi.org/10.1039/C2CS15308D>
- Yu, Q., Zhang, B., Li, J., Zhang, B., Wang, H., & Li, M. (2016). Endoplasmic reticulum-derived reactive oxygen species (ROS) is involved in toxicity of cell

- wall stress to *Candida albicans*. *Free Radical Biology & Medicine*, 99, 572–583. <https://doi.org/10.1016/J.FREERADBIOMED.2016.09.014>
- Zakeri, Z. F., & Ahuja, H. S. (1997). Cell death/apoptosis: normal, chemically induced, and teratogenic effect. *Mutation Research*, 396(1–2), 149–161. [https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(97\)00181-4](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(97)00181-4)
- Zhang, H. M., & Zhang, Y. (2014). Melatonin: a well-documented antioxidant with conditional pro-oxidant actions. *Journal of Pineal Research*, 57(2), 131–146. <https://doi.org/10.1111/JPI.12162>
- Zhang, J., Wang, L., Xie, W., Hu, S., Zhou, H., Zhu, P., & Zhu, H. (2020). Melatonin attenuates ER stress and mitochondrial damage in septic cardiomyopathy: A new mechanism involving BAP31 upregulation and MAPK-ERK pathway. *Journal of Cellular Physiology*, 235(3), 2847–2856. <https://doi.org/10.1002/JCP.29190>
- Zhang, J., Wang, X., Vikash, V., Ye, Q., Wu, D., Liu, Y., & Dong, W. (2016). ROS and ROS-Mediated Cellular Signaling. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/4350965>
- Zhang, Y., Wang, Z., Dong, Y., Cao, J., & Chen, Y. (2022). Melatonin Nuclear Receptors Mediate Green-and-Blue-Monochromatic-Light-Combinations-Inhibited B Lymphocyte Apoptosis in the Bursa of Chickens via Reducing Oxidative Stress and Nfkb Expression. *Antioxidants*, 11(4). <https://doi.org/10.3390/ANTIOX11040748>
- Zhao, Y., Trewyn, B. G., Slowing, I. I., & Lin, V. S. Y. (2009). Mesoporous silica nanoparticle-based double drug delivery system for glucose-responsive controlled release of insulin and cyclic AMP. *Journal of the American Chemical Society*, 131(24), 8398–8400. <https://doi.org/10.1021/JA901831U>
- Zhong, Q., & Da Rocha, S. R. P. (2016). Poly(amidoamine) Dendrimer-Doxorubicin Conjugates: In Vitro Characteristics and Pseudosolution Formulation in Pressurized Metered-Dose Inhalers. *Molecular Pharmaceutics*, 13(3), 1058–1072. <https://doi.org/10.1021/ACS.MOLPHARMACEUT.5B00876>
- Zhou, W., Gurubhagavatula, S., Liu, G., Park, S., Neuberg, D. S., Wain, J. C., Lynch, T. J., Su, L., & Christiani, D. C. (2004). Excision Repair Cross-

6. Bibliografía

Complementation Group 1 Polymorphism Predicts Overall Survival in Advanced Non-Small Cell Lung Cancer Patients Treated With Platinum-Based Chemotherapy. *Clinical Cancer Research*, 10(15), 4939–4943. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-04-0247>

Zhou, Y., Huang, S., Shen, H., Ma, M., Zhu, B., & Zhang, D. (2017). Detection of Glutathione in Oral Squamous Cell Carcinoma Cells With a Fluorescent Probe During the Course of Oxidative Stress and Apoptosis. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 75(1), 223.e1-223.e10. <https://doi.org/10.1016/J.JOMS.2016.08.010>

Zhu, H., & Almasan, A. (2017). Development of venetoclax for therapy of lymphoid malignancies. *Drug Design, Development and Therapy*, 11, 685–694. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S109325>

7. ANEXOS

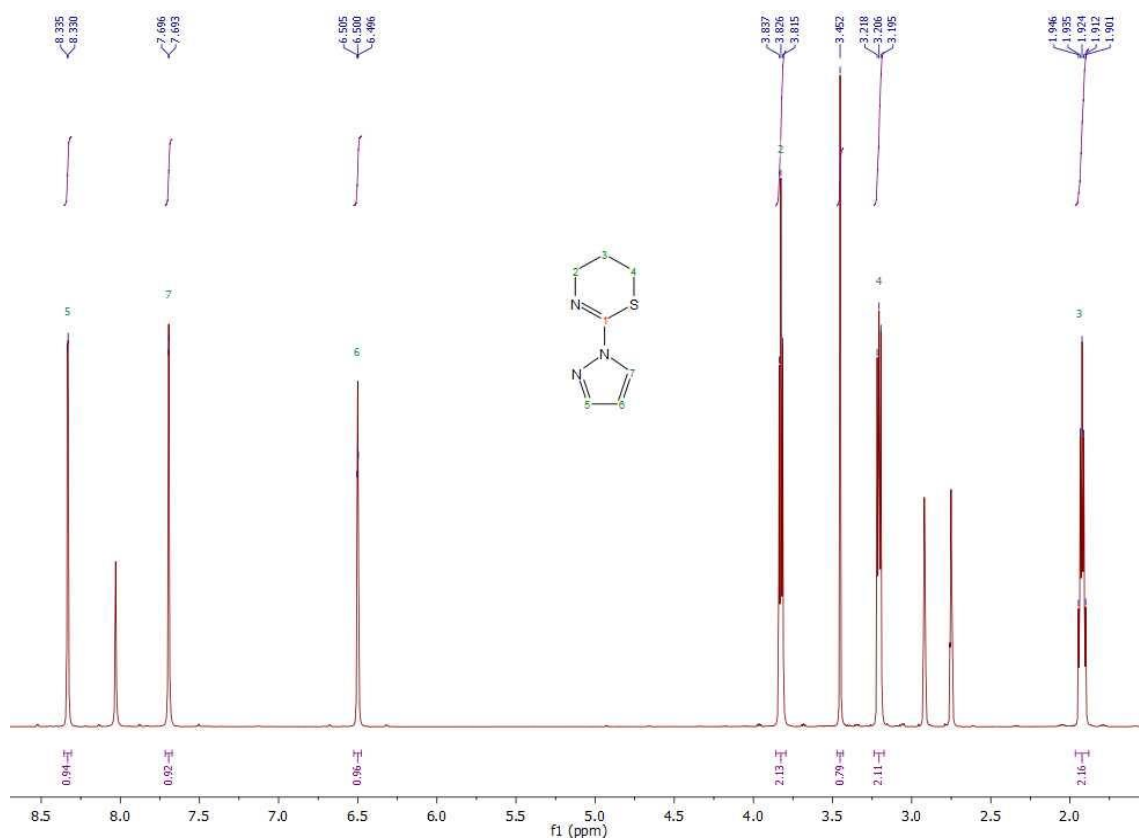


Figura A.1. Espectro ^1H RMN de PzTz en DMF- d_7 .

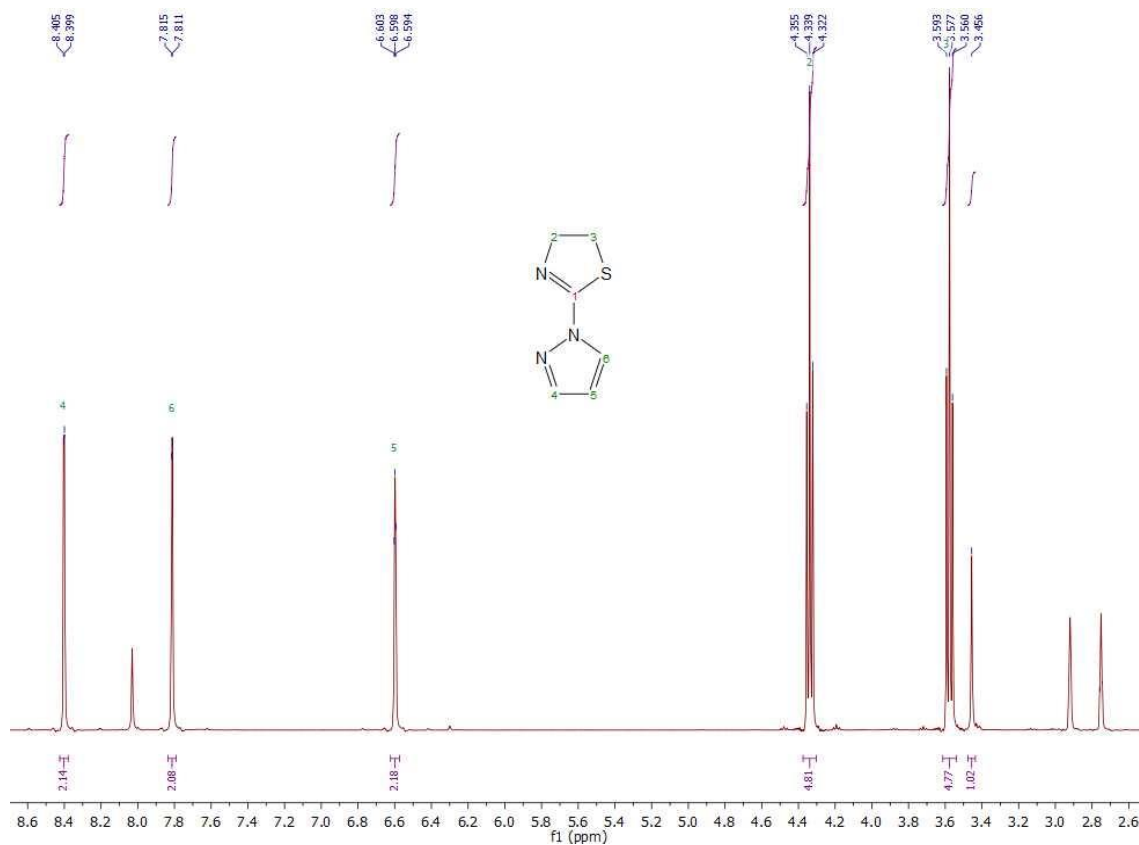


Figura A.2. Espectro ^1H RMN de PzTn en DMF- d_7 .

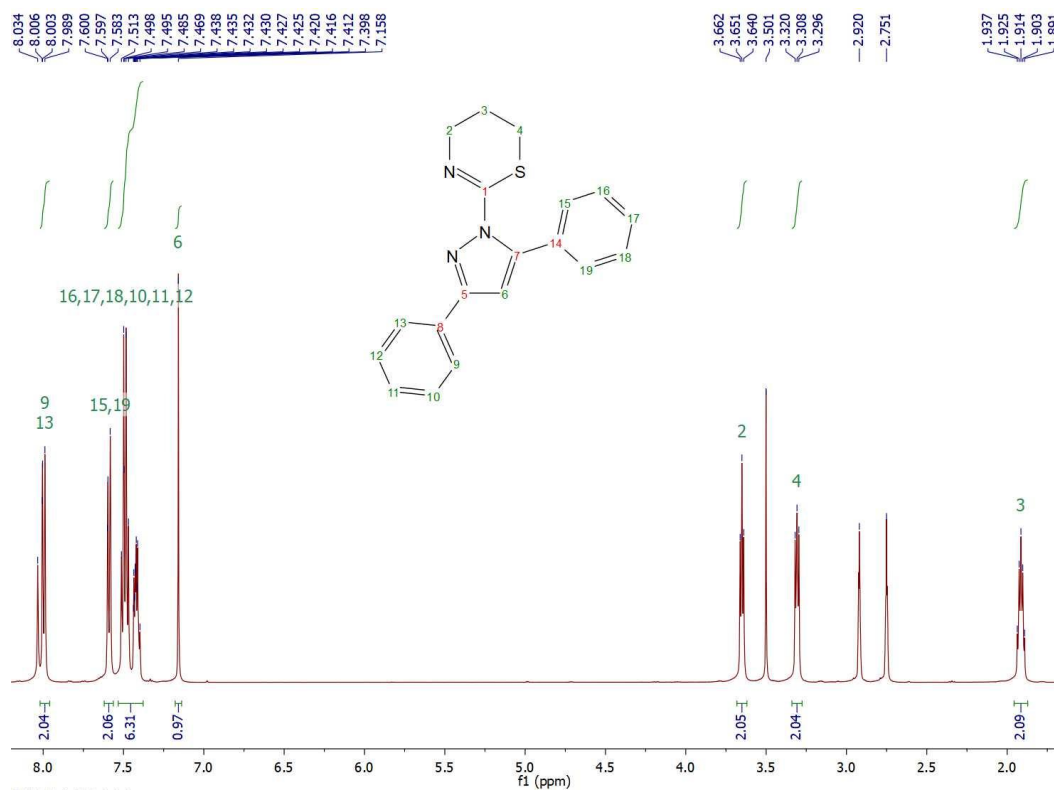


Figura A.3. Espectro ^1H RMN de DPhPzTz en DMF- d_7 .

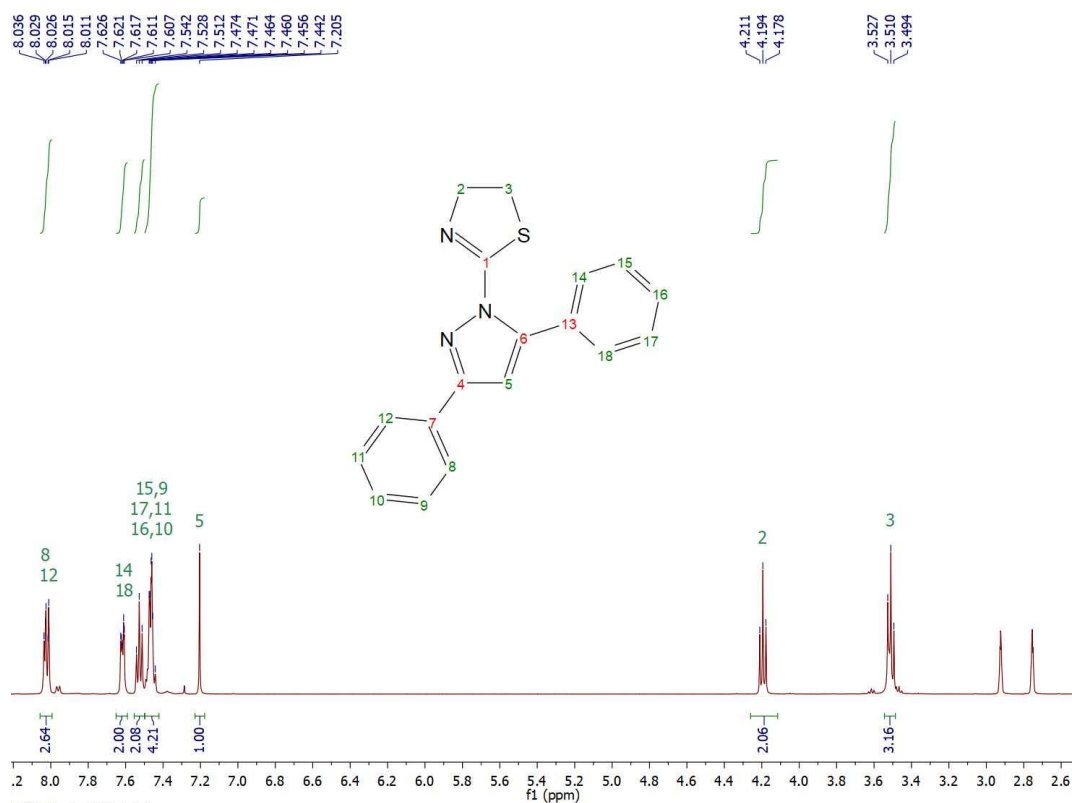


Figura A.4. Espectro ^1H RMN de DPhPzTn en DMF- d_7 .

7. Anexos

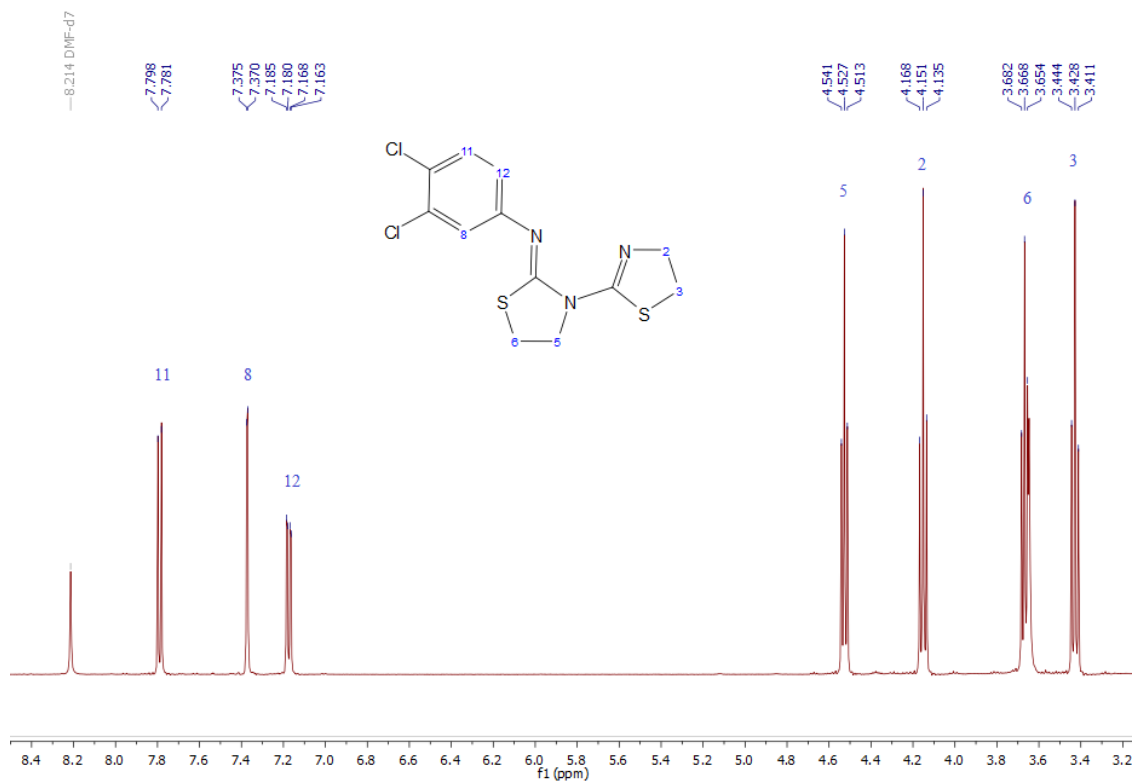


Figura A.5. Espectro ^1H RMN de TdTn en DMF- d_7 .

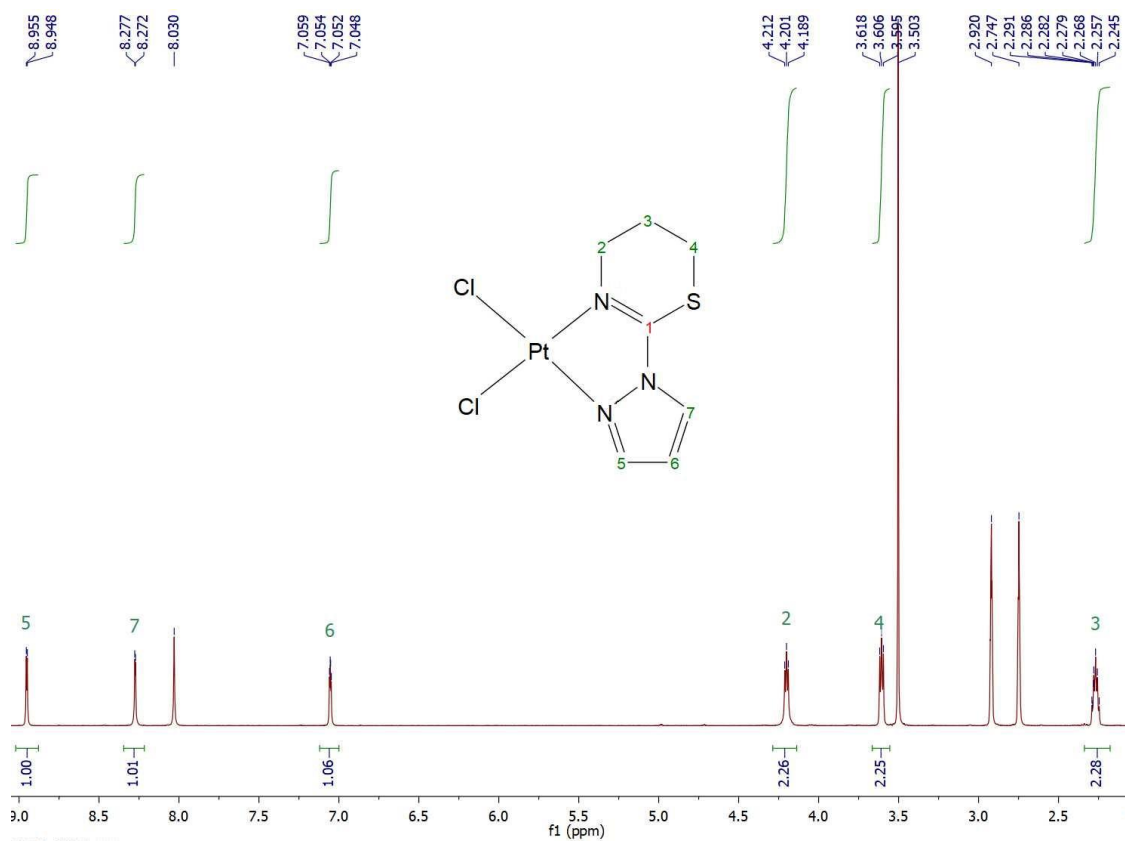


Figura A.6. Espectro ^1H RMN de PtPzTz en DMF- d_7 .

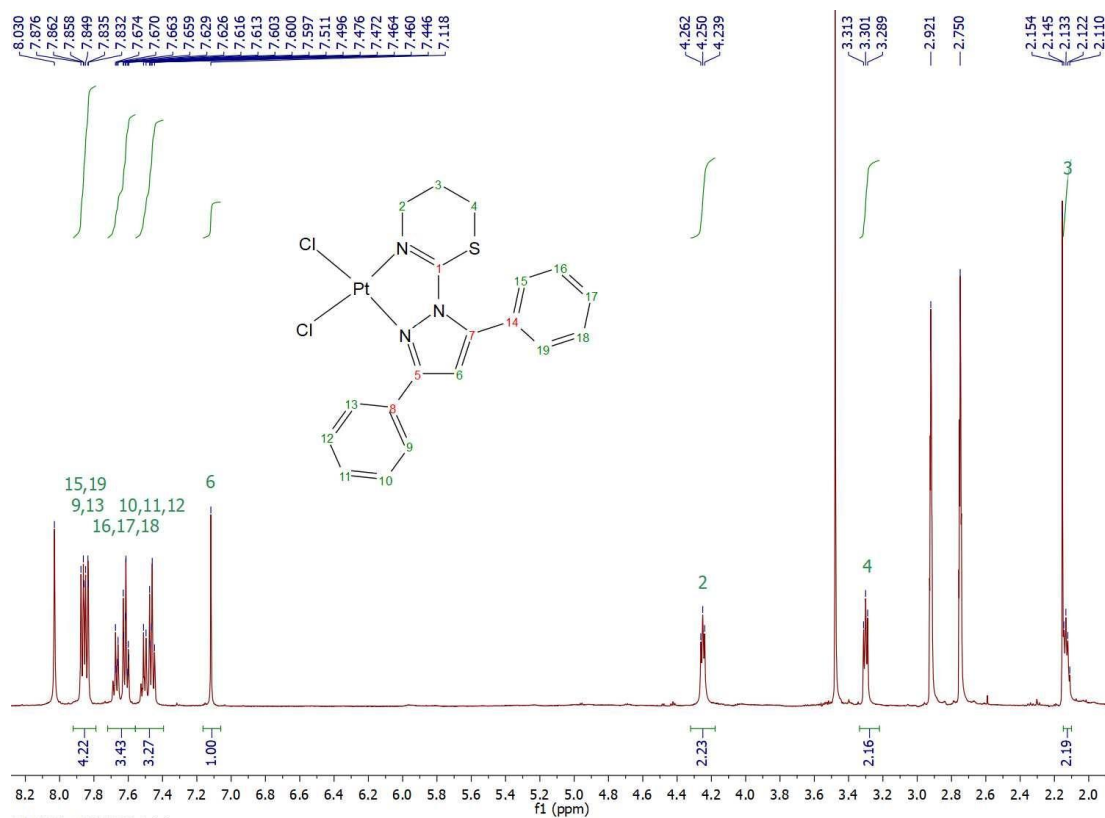


Figura A.7. Espectro ^1H RMN de PtDPhPzTz en DMF- d_7 .

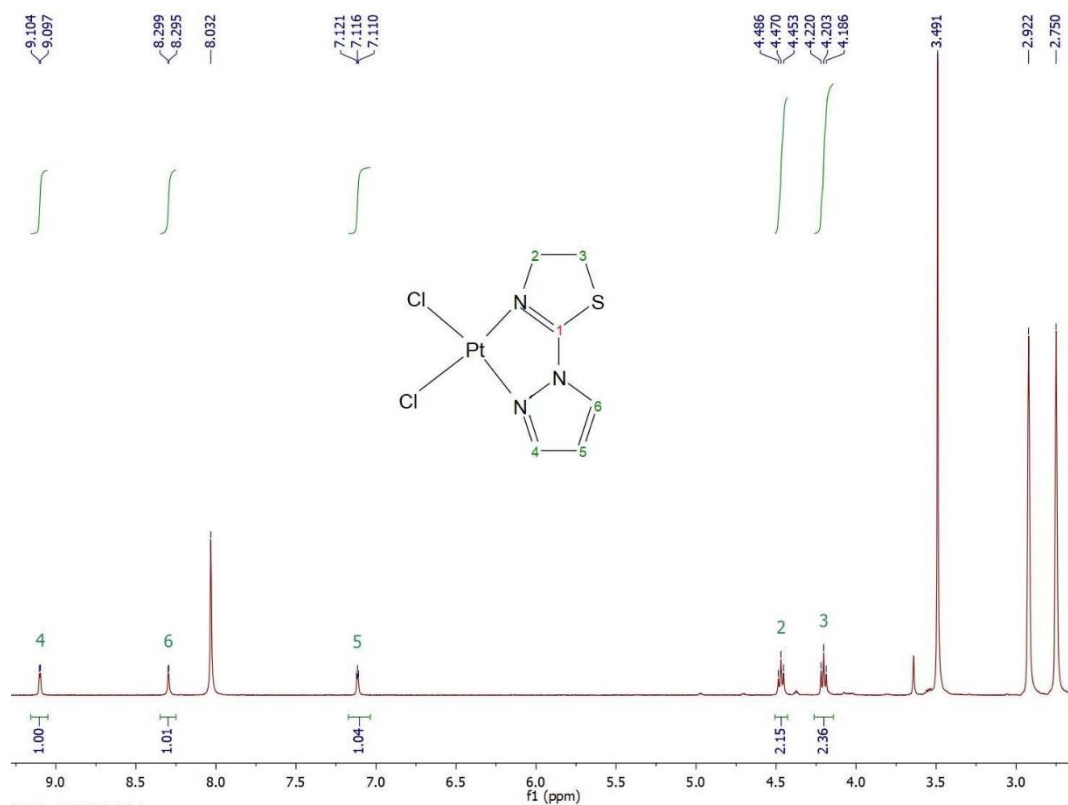


Figura A.8. Espectro ^1H RMN de PtPzTn en DMF- d_7 .

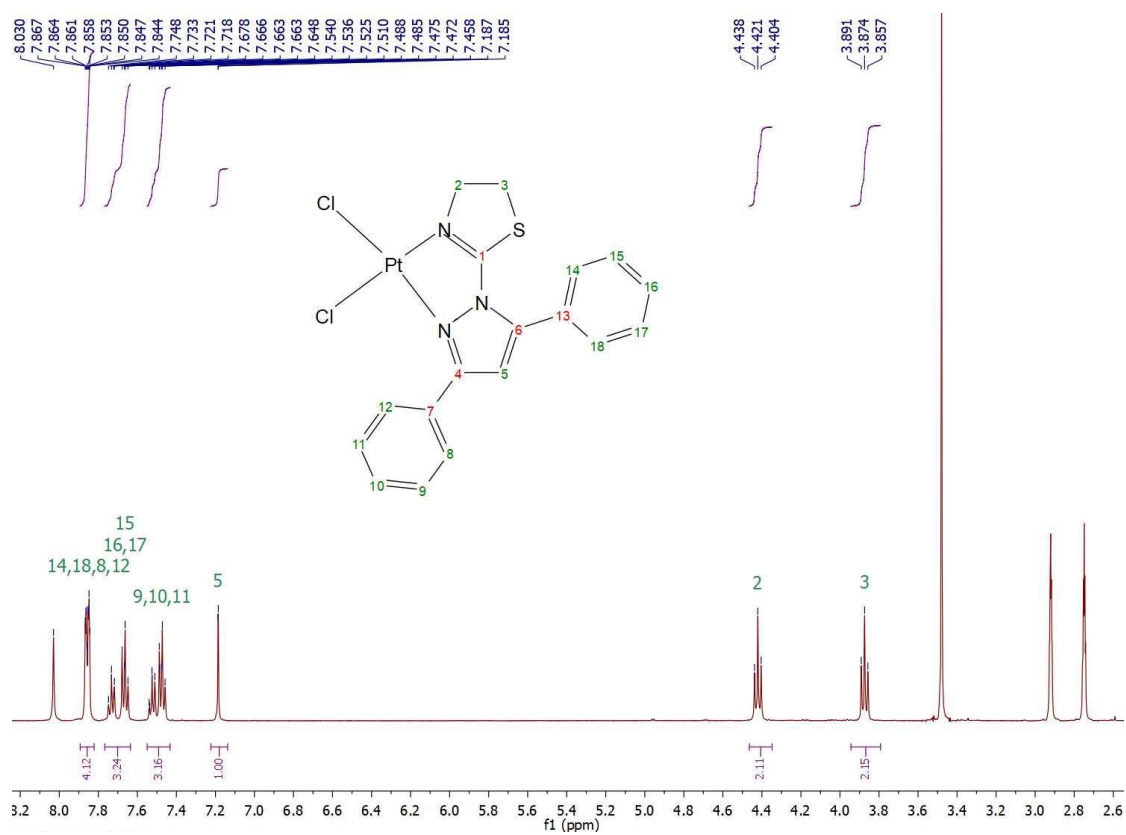


Figura A.9. Espectro ^1H RMN de PtDPhPzTn en DMF- d_7 .

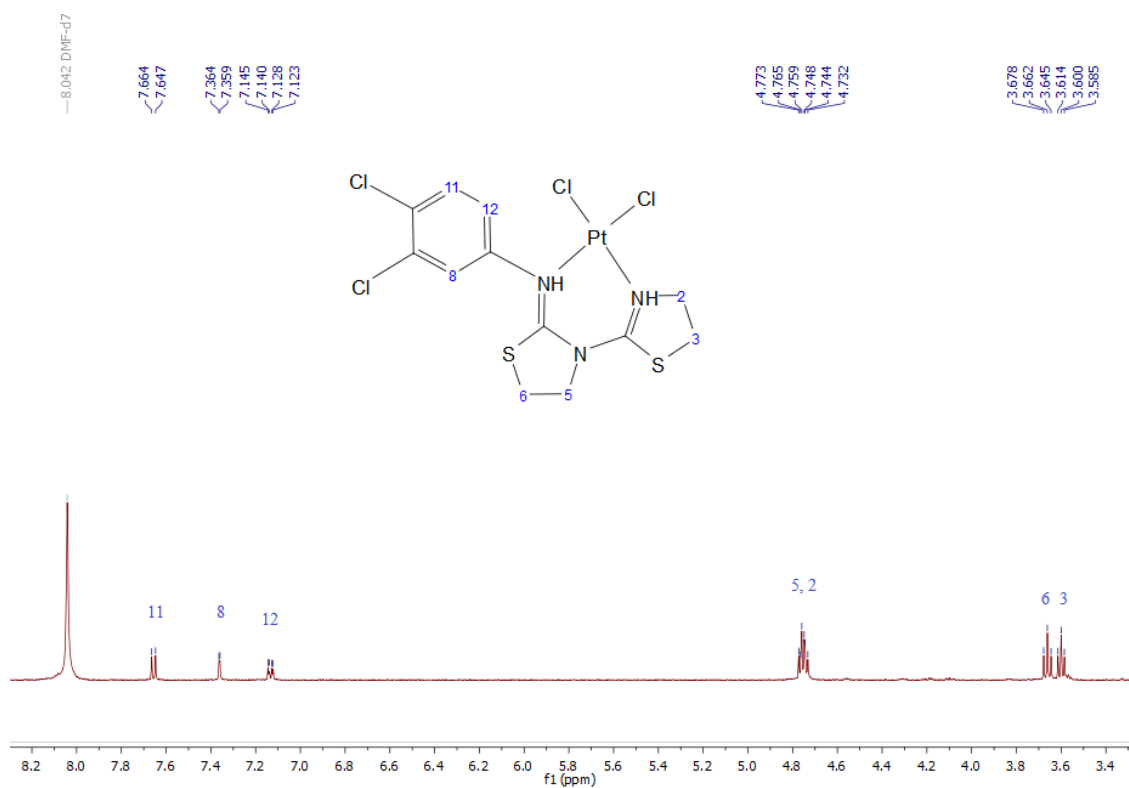


Figura A.10. Espectro ^1H RMN de PtTdTn en DMF- d_7 .

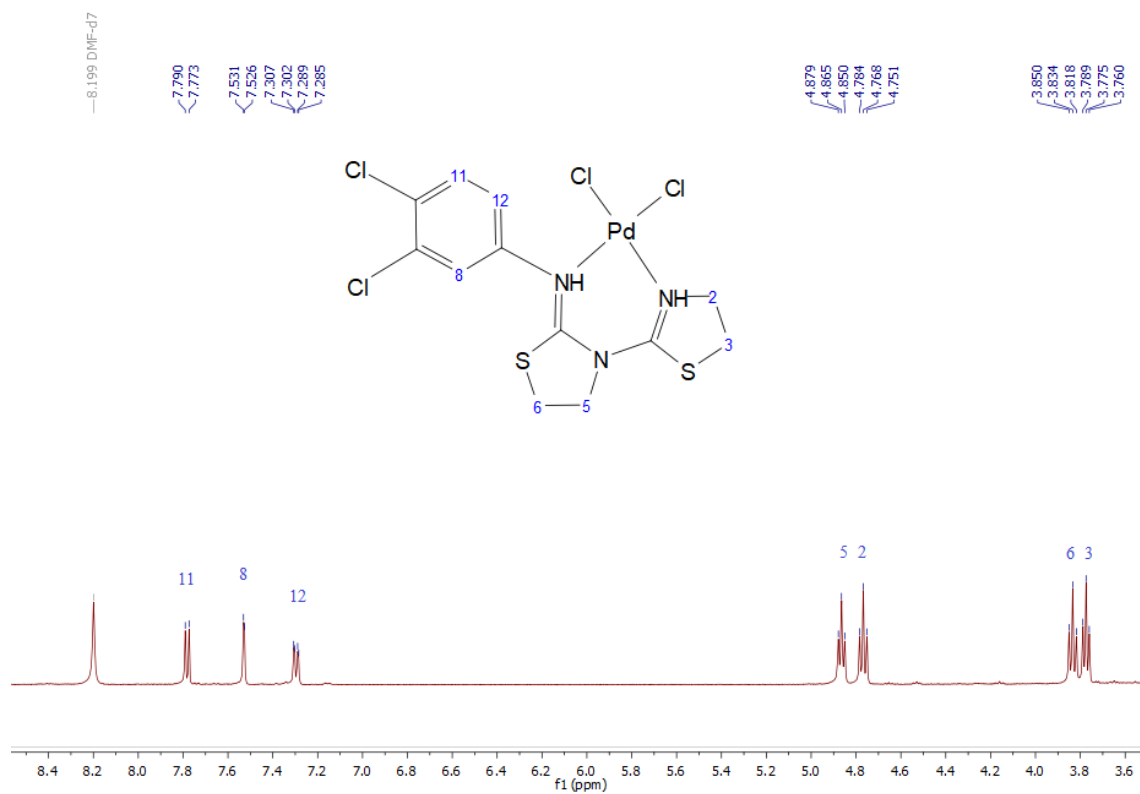
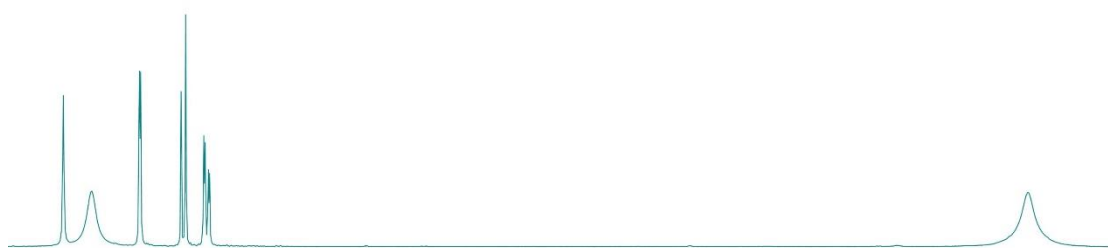


Figura A.11. Espectro ^1H RMN de PdTdTn en DMF- d_7 .

tiempo = 0



tiempo = 7 días

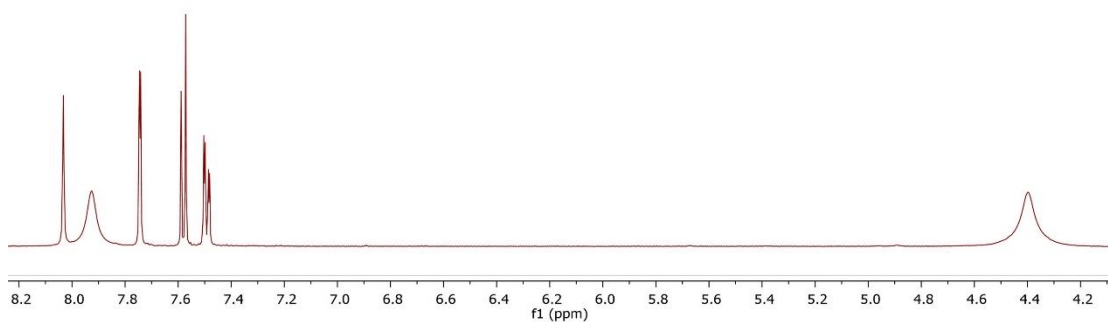


Figura A.12. Estabilidad por ^1H RMN de $[\text{PtCl}_2(3,4\text{-dicloroanilina})(\text{NH}_3)]$ en DMF- d_7 .

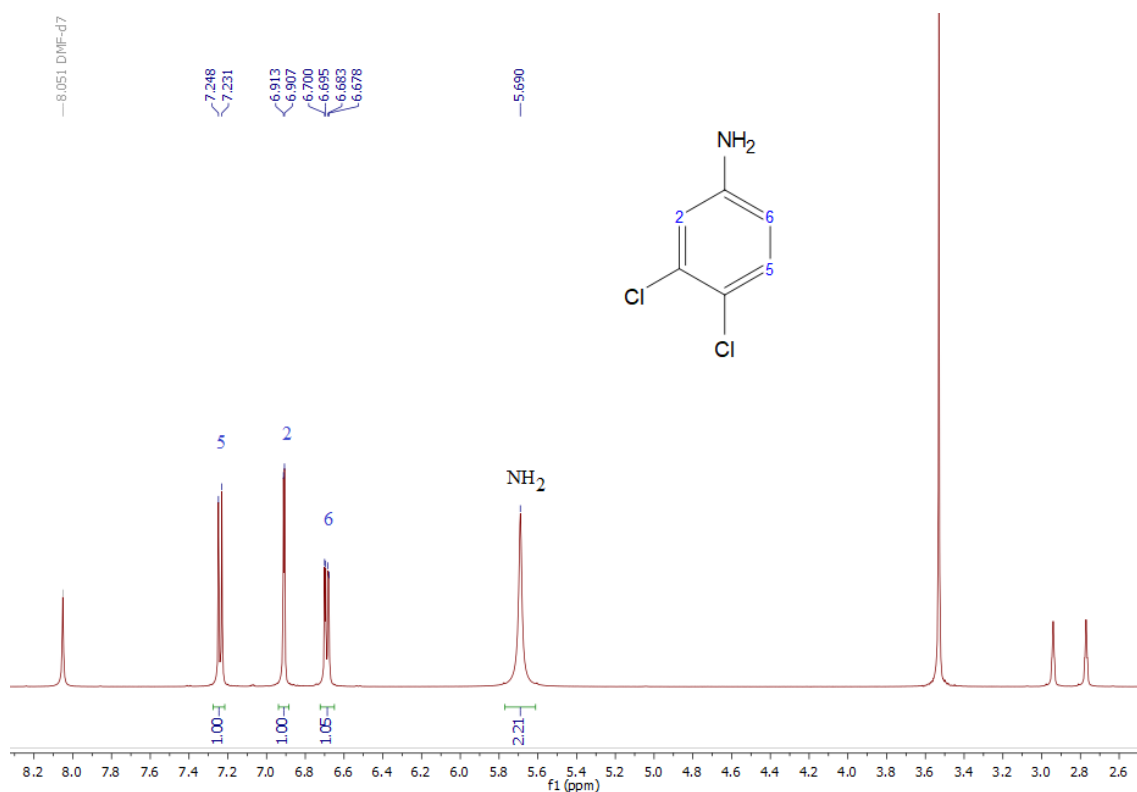


Figura A.13. Espectro ^1H -RMN de 3,4-dicloroanilina en DMF- d_7 .

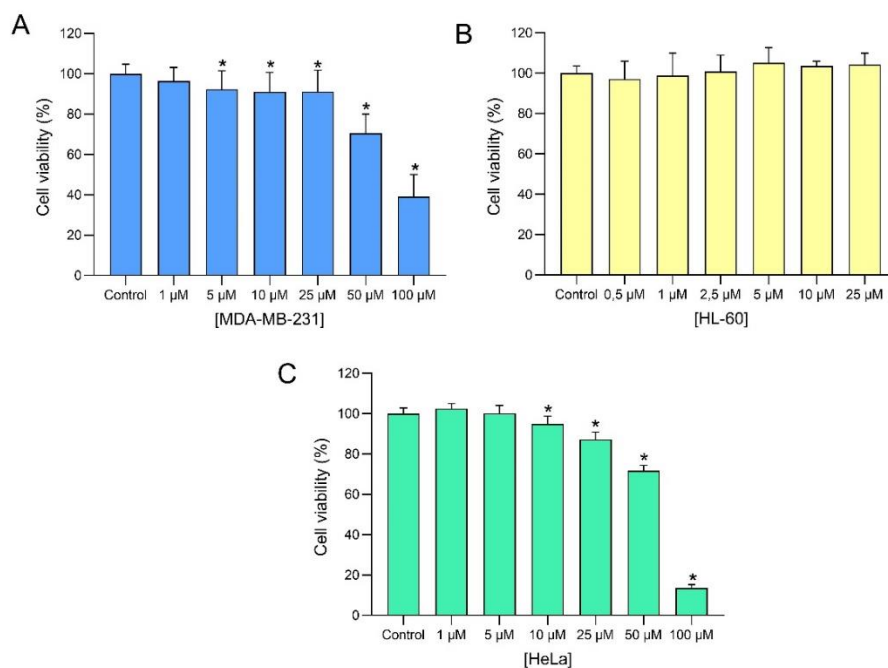


Figura A.14. Curvas dosis-respuesta del ligando 3,4-dicloroanilina sobre la viabilidad celular en diferentes líneas celulares tumorales. El ligando se incubó durante 24 horas con concentraciones crecientes (0-100 μM , según se indica) o el vehículo (0,2% DMF (v/v), control) en las líneas celulares MDA-MB-231 (A), HL-60 (B) y HeLa (C). Los datos representan la media \pm D.E. de 6 experimentos independientes y se expresan como porcentaje en comparación con los valores del control. * $P < 0,05$ en comparación con sus correspondientes valores de control (test de Dunnett).

