



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS**

IMPACTO DE COMPLEJOS ANTICANCERÍGENOS DE RUTENIO Y OSMIO SOBRE LA
ACTIVIDAD CATALÍTICA DE OXIDORREDUCTASAS

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

M. en C. HUGO RICO BAUTISTA

Tutor

Dr. Ronan Le Lagadec

Instituto de Química

Comité Tutor

Dra. Noráh Yolanda Barba Behrens

Facultad de Química

Dr. Abel Moreno Cárcamo

Instituto de Química

CDMX, MÉXICO, NOVIEMBRE DE 2016



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS**

*IMPACTO DE COMPLEJOS ANTICANCERÍGENOS DE RUTENIO Y OSMIO SOBRE LA
ACTIVIDAD CATALÍTICA DE OXIDORREDUCTASAS*

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

M. en C. HUGO RICO BAUTISTA

TUTOR

Dr. Ronan Le Lagadec

Instituto de Química

Comité Tutor

Dra. Noráh Yolanda Barba Behrens

Facultad de Química

Dr. Abel Moreno Cárcamo

Instituto de Química



CDMX, MÉXICO, NOVIEMBRE DE 2016

JURADO ASIGNADO

Presidente	Dr. Anatoly Yatsimirsky	Facultad de Química, UNAM
Vocal	Dra. Lena Ruiz Azuara	Facultad de Química, UNAM
Vocal	Dra. Noráh Yolanda Barba Behrens	Facultad de Química, UNAM
Vocal	Dr. Christian Gaidon	Université de Strasbourg, Francia
Secretario	Dra. Laura Gasque Silva	Facultad de Química, UNAM

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA

Laboratorio de Química Inorgánica 2
Instituto de Química, UNAM

NOMBRE DEL TUTOR

Dr. Ronan Le Lagadec

SUSTENTANTE

M. en C. Hugo Rico Bautista

AGRADECIMIENTOS

A María Concepción Rosario Bautista Ortega y José Rico Padilla por su inmenso amor, a Omar Rico Bautista por su cariño infinito.

A mi familia que siempre me ha apoyado en todo momento.

A la UNAM quien me formó como profesional.

A mi comité tutor el Dr. Ronan Le Lagadec, la Dra. Noráh Yolanda Barba Behrens y el Dr. Abel Moreno por la paciencia, guía y sus importantes consejos.

Al Dr. Christian Gaidon y su grupo de trabajo por permitirme colaborar en una estancia de investigación en Estrasburgo, Francia.

A la Dra. Nuria Victoria Sánchez Puig por enseñarme un nuevo mundo dentro de la biología molecular.

A los miembros del jurado por sus aportaciones a este trabajo.

A mis amigos que siempre están conmigo no importa la situación.

A todos mis compañeros que conocí en Inorgánica 2.

Al CONACyT por el proyecto (No. 153151), por la beca otorgada para mis estudios de doctorado (CVU/BECARIO 363873/245377), así como una beca mixta para una estancia de investigación en Estrasburgo, Francia.

A PAPIIT por los proyectos PAPIIT IN207316, PAPIIT IN204812.

Al posgrado en Ciencias Químicas por el financiamiento para presentar este proyecto en el congreso ISABC13 en Galway, Irlanda.

El presente trabajo fue presentado en los siguientes congresos:

- Plática: 5° Simposio Latino Americano de Química Inorgánica Biológica, Octubre 2016. Querétaro México.
- Poster: 13° Simposio Internacional Química Bioinorgánica Aplicada, Junio 2015. Galway, Irlanda.
- Poster: Congreso de Alumnos de Posgrado UNAM, 2013, 2014, 2015.
- Poster: Congreso del Instituto de Química 2012, 2013.

Parte de este trabajo fue publicada en la revista:

Journal of Inorganic Biochemistry

Hugo Rico Bautista, Rafael Omar Saavedra Díaz, Longzhu Q. Shen, Christophe Orvain, Christian Gaidon, Ronan Le Lagadec, Alexander D. Ryabov.

Impact of cyclometalated ruthenium(II) complexes on lactate dehydrogenase activity and cytotoxicity in gastric and colon cancer cells.

Volume 163, 2016, Pages 28–38.

GLOSARIO

GO = Glucosa oxidasa

LDH_{mc} = Lactato deshidrogenasa de músculo de conejo

PHD2 = Prolil hidroxilasa

HIF-1 α = Factor de hipoxia inducido

PDI = Proteínas disulfuro isomerasas

bpy = 2,2'-bipiridina

phpy = 2-fenilpiridinato

fen = 1,10-fenantrolina

NADH = Dinucleótido de nicotinamida y adenina en su forma reducida

NAD⁺ = Dinucleótido de nicotinamida y adenina en su forma oxidada

K_i = Constante de inhibición

*i*_{0.5} = Concentración inhibitoria 50

K_m = Constante de Michaelis-Menten

V_{max} = Velocidad máxima

DMSO = Dimetilsulfóxido

ABSTRACT

Our group has been studying the interactions between ruthenacycles and osmacycles with oxidoreductases, with emphasis on bio-sensing applications. In particular, we have prepared series of structurally similar complexes of the general formula $[M(C\sim N)_x(N\sim N)^{3-x}]^{m+}$ ($M = Ru, Os$; $C\sim N = o$ -2-phenylpyridinato; $N\sim N = 2,2'$ -bipyridine; $x = 0 - 3$), covering almost a 2 V potential range. The effects of the successive replacement of nitrogen atoms by σ -bound sp^2 carbon atoms on the reactivity towards redox-active enzymes have been explored. The complexes have also displayed cytotoxic activity, but the mechanism of action remains unknown. Recent publications have showed a relationship between oxidoreductases and the development of certain cancers, so it is thought that the route of action of these cyclometalated derivatives may be due to the interaction with oxidoreductases. We previously showed that our ruthenium complexes can act as effectors of glucose oxidase.

In this work, we studied the effects of the cyclometalated complexes on the activity of lactate dehydrogenase, glucose oxidase, prolil hydroxylase, and protein disulfide isomerase in order to shed light on how our derivatives can interact with oxidoreductases.

RESUMEN

Nuestro grupo de trabajo ha estudiado la interacción entre rutenacilos y osmacilos con enzimas oxidorreductasas aplicado en biosensores. En particular hemos preparado una serie de compuestos estructuralmente similares, con fórmula general $[M(C\sim N)_x(N\sim N)^{3-x}]^{m+}$ ($M = Ru, Os$; $C\sim N = o$ -2-fenilpiridinato; $N\sim N = 2,2'$ -bipiridina; $x = 0 - 3$), cubriendo un rango cercano a 2 V de diferencia, entre los diferentes compuestos. Se ha explorado el efecto de reemplazar sucesivamente enlaces metal nitrógeno por enlaces metal carbono, sobre la reactividad hacia enzimas oxidorreductasas.

Estos mismos complejos muestran actividad citotóxica, desafortunadamente no se conoce su mecanismo de acción. Recientes publicaciones han mostrado la relación entre enzimas oxidorreductasas y el desarrollo del cáncer, por lo que es posible que el mecanismo de acción de los complejos de rutenio y osmio pueda estar relacionado con la interacción de algunas enzimas oxidorreductasas. Un trabajo previo ha demostrado que los complejos de rutenio pueden afectar la actividad catalítica de la glucosa oxidasa.

En este trabajo se estudió el efecto de algunos complejos ciclotalados de rutenio y osmio sobre la actividad catalítica de glucosa oxidasa, lactato deshidrogenasa, prolil hidroxilasa y la familia de enzimas proteínas disulfuro isomerasas, con el objetivo de desvelar el mecanismo de acción de los complejos y obtener información de la interacción de estos complejos con las enzimas oxidorreductasas.

ÍNDICE

Glosario	VI
Abstract	VII
Resumen	VIII
1.0. Introducción	1
2.0. Antecedentes	5
2.1. Cáncer	6
2.2. Compuestos de los metales de transición como agentes anticancerosos	9
2.3. Actividad anticancerosa de compuestos de rutenio y osmio	13
2.4. Cinética enzimática	23
2.5. Enzimas oxidorreductasas	31
2.5.1. Glucosa oxidasa (GO)	31
2.5.2. Lactato deshidrogenasa (LDH)	34
2.5.3. Prolil hidroxilasa (PHD2)	37
2.5.4. Proteínas disulfuro isomerasas (PDI)	41
3.0. Hipótesis	47
4.0. Objetivos	49
5.0. Resultados y discusión	51
5.1. Estabilidad complejos organometálicos	53
5.2. Actividad citotóxica	57
5.3. Glucosa oxidasa	62
5.4. Lactato deshidrogenasa	71
5.4.1. Simulación de sitios de unión de los complejos con la LDH	81
5.4.2. LDH en HCT116 cáncer de colon	86
5.5. Prolil hidroxilasa	94
5.6. Proteínas disulfuro isomerasas	98
5.7. Análisis estructural	103

6.0. Conclusiones y perspectivas	109
7.0. Métodos y metodología	112
7.1. Reactivos	114
7.2. Equipos	115
7.3. Síntesis de los compuestos ciclometalados de rutenio y osmio	117
7.4. Estudio de los complejos ciclometalados con las enzimas	129
7.4.1. Glucosa oxidasa (GO)	129
7.4.2. Lactato deshidrogenasa (LDH)	130
7.4.3. Prolil hidroxilasa (PHD2)	131
7.4.4. Proteínas disulfuro isomerasas (PDI)	133
8.0 Referencias	134
9.0 Anexos y Artículo publicado	143

1.0 INTRODUCCIÓN

1.0 INTRODUCCIÓN

Los compuestos de los metales de transición han sido utilizados desde hace más de medio siglo, principalmente como catalizadores [1]. Sin embargo, con el paso del tiempo el estudio de estos compuestos se fue diversificando, es así que numerosos grupos de investigación se enfocaron en estudiar compuestos de los metales de transición en medios biológicos, por ejemplo, en diferentes enzimas oxidorreductasas como las nitrogenasas [2], enzimas que contienen hierro y molibdeno para la fijación de nitrógeno, la vitamina B₁₂ [3], un anillo de porfirina modificado que tiene cobalto como átomo central, la hemoglobina, una proteína con un átomo de hierro coordinado por un grupo hemo, que sirve para transportar el oxígeno en la sangre [4].

El papel central de los compuestos de los metales de transición en enzimas o como fármacos fomentó el estudio de estos complejos en el área de la medicina. Si bien se tienen datos ancestrales de complejos metálicos en la medicina tradicional. Por ejemplo, en China, se tiene registro de compuestos de oro con fines terapéuticos desde el año 2500 a.C. En el libro *Bencao*, un compendio sobre la medicina tradicional China, se menciona el uso de oro para diferentes tratamientos [5]. En el quinto y último libro escrito por Dioscorides, *De materia médica*, se recomienda usar sales de arsénico como antiséptico, astringente y cicatrizante, además se menciona que se usó como depilatorio [6]. Los complejos de vanadio han sido utilizados en diversas terapias; los primeros reportes publicados en la revista *La Presse Médicale* datan de 1899, cuando M. B. Lyonnet, M. Martin y M. Laran, los utilizaron para disminuir la glucosa en sangre [7]. Pero fue hasta 1971 cuando el compuesto *cis*-diamindicloroplatino(II) entró a pruebas clínicas, que comenzó una nueva área de investigación, la química inorgánica medicinal [8].

La historia de los compuestos de los metales de transición enfocada en la medicina es extensa, así como también es amplia la parte negativa. Por ejemplo, el uso del arsénico como veneno en los siglos XV y XVI [9], los problemas de intoxicaciones con mercurio conocidos como "enfermedad de Minamata" en la isla japonesa de Minamata entre 1953 fecha en que se detectó la enfermedad y 1968 cuando el gobierno Japonés reconoció que el causante de la intoxicación en esta isla eran los desechos de mercurio de la empresa Chisso Corporation [10]. En México ocurrió un caso severo de

intoxicación en Tultitlán, Estado de México, por la empresa Cromatos de México, por malos manejos de residuos de cromo, afectando a cientos de personas de la localidad [11].

La dicotomía de los compuestos de los metales de transición entre su efecto tóxico y su efecto farmacológico depende de ciertas condiciones como su dosis, como diría Paracelso "todas las sustancias pueden ser venenos, su dosificación hace la diferencia para que se comporte como un veneno o un remedio". La estructura del compuesto metálico es muy importante debido a sus propiedades intrínsecas, como el estado de oxidación del metal o los ligantes que se encuentran unidos al centro metálico, los cuales modifican las propiedades del complejo. En conjunto todas estas características permiten modular el efecto que pueda tener el complejo en el organismo.

A pesar de que el uso de metales de transición en la medicina data de varios siglos atrás, el estudio deliberado de estos compuestos como posibles agentes terapéuticos es reciente. Es así que enfermedades como la artritis, la diabetes, o el cáncer tienen hoy en día compuestos de metales de transición como fármacos. Uno de los compuestos emblema para el desarrollo de esta área de la química fue el *cis*-platino, sintetizado por Peyrone en 1844 [12], pero fue Barnett Rosenberg quien descubrió sus propiedades anticancerosas en 1960, cuando observó la inhibición de la división celular en *Escherichia coli* por un electrodo de platino cuando examinaba la influencia de la corriente eléctrica en la división celular [13]. Sin embargo, fue hasta diciembre de 1978 después de 18 años de investigación enfocada en sus efectos farmacológicos, y después de las diferentes fases clínicas que fue aprobado por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos [14].

Los complejos de platino son utilizados en diferentes tipos de cáncer como el de mama, el de testículo, el de ovario, el de vesícula, el de esófago, el de pulmón, el de cervix, el de estómago, el de próstata y los melanomas y sarcomas, entre otros [14][15]. A pesar de tener ventas por cerca de \$500 millones de dólares, el *cis*-platino tiene diversos efectos adversos, como son la toxicidad renal, toxicidad sobre el oído, toxicidad periférica [15]. Algunas de las complicaciones con las que el paciente tiene que luchar son náuseas, vómitos, anemia, caída del cabello, falta de apetito y problemas de fertilidad.

Debido a los problemas adversos que tiene el *cis*-platino, se estudiaron otros metales de transición que tuvieran menos efectos secundarios. Los compuestos de rutenio y osmio fueron de los más prometedores, con algunas ventajas sobre los compuestos de platino, como la capacidad de tener mayor número de coordinación, usualmente seis sitios vacantes, con diversas geometrías, como la octaédrica, bipirámide trigonal, medio sándwich, entre otras. Usualmente tiene los estados de oxidación 0, +2, +3, +4, aunque se conocen compuestos en estado de oxidación -2 y +8 en $[\text{Ru}(\text{CO})_4]^{-2}$ y $[\text{RuO}_4]$ en configuraciones electrónicas d^{10} y d^0 respectivamente. Existen casos similares para los complejos de osmio, abarcando prácticamente todos los estados de oxidación posibles para los metales de transición [16].

Tomando en cuenta las ventajas estructurales que representan los complejos de rutenio y osmio sobre los de platino, nuestro grupo de trabajo desarrolló una serie particular de complejos de rutenio y osmio con ligantes bidentados con la 2,2-bipiridina y con el ligante 2-fenilpiridinato. Con este último ligante se pueden formar hasta dos fragmentos ciclometalados en el caso de rutenio y hasta tres en el caso de osmio. Cada fragmento ciclometalado consiste en un enlace metal carbono, un enlace metal átomo electrodonador como N, O, S y deben formar un ciclo entre estos dos enlaces, además el enlace carbono metal reduce el potencial redox de los complejos [17][18].

Al estudiar esta serie de compuestos ciclometalados de rutenio y osmio, se observó que tienen una mejor actividad anticancerosas que el *cis*-platino y con una disminución en la toxicidad hacia células sanas [19][20].

Gran parte de este trabajo es comprender el mecanismo de acción celular para explicar el efecto citotóxico de los complejos organometálicos de rutenio y osmio. En una primera aproximación, pensamos que podría alterar algunas enzimas oxidorreductasas involucradas en procesos cancerígenos, es por ello que es muy importante controlar el potencial redox, por medio de los enlaces carbono metal, ya que cada uno de éstos enlaces disminuye el potencial redox del complejo. Por otro lado, los ligantes 2,2-bipiridina y 2-fenilpiridinato sólo se diferencian en la forma de coordinación, mientras que la 2,2-bipiridina se coordina por medio de dos átomos de nitrógeno, el 2-fenilpiridinato utiliza un átomo de nitrógeno y uno de carbono, siendo así que los compuestos formados tienen prácticamente la misma estructura, permitiéndonos estudiar la influencia de algunos parámetros importantes de los complejos como el potencial redox o el estado de oxidación.

2.0 ANTECEDENTES

2.1 CÁNCER

Dentro de las enfermedades que más afectan a la sociedad se encuentra el cáncer, tanto así, que la Organización Mundial de la Salud declaró que era la primera causa de muerte en el mundo, con cerca de 14.1 millones de personas diagnosticadas con esta enfermedad en 2012, de las cuales murieron cerca de 8.2 millones en ese mismo año [21].

Las estadísticas acerca del cáncer son preocupantes, el número de pacientes diagnosticados con esta enfermedad incrementa día con día. En el año 2012 los tipos de cáncer con mayor incidencia en el mundo fueron el de pulmón, pecho y próstata con 1.82, 1.67 y 1.09 millones de nuevos casos diagnosticados respectivamente [22]. En México los tipos de cáncer con mayor incidencia son el de próstata, el de colon y el de testículo en hombres, y el de mama y el cervicouterino en mujeres [22].

Tabla 1. Casos diagnosticados en el año 2012 para los principales tipos de cáncer [21].

Cáncer	Diagnósticos 10 ⁶
Pulmón	1.82
Pecho	1.67
Próstata	1.09
Estómago	0.95
Hígado	0.78

A pesar de que en ocasiones se piensa en el cáncer como una sola enfermedad, en realidad son un amplio grupo de enfermedades. Según la Organización Mundial de la Salud hay más de 100 tipos diferentes de cáncer, ya que cualquier parte del cuerpo puede desarrollar cáncer. Las diferencias entre cada uno es en sus requerimientos metabólicos, los cuales dependen del tipo de célula y del tipo de tejido en donde se localicen. Existen dos tipos de tumor, el benigno y el maligno. El primero se caracteriza por no invadir tejidos cercanos ni extenderse a otros tejidos. Por otro lado el tumor maligno invade tejidos cercanos y se desarrolla en otros tejidos diferentes al de origen. Este proceso se genera cuando una célula cancerígena se traslada a un tejido distante por el torrente sanguíneo y se desarrolla en este nuevo tejido, a este proceso se le conoce como metástasis.

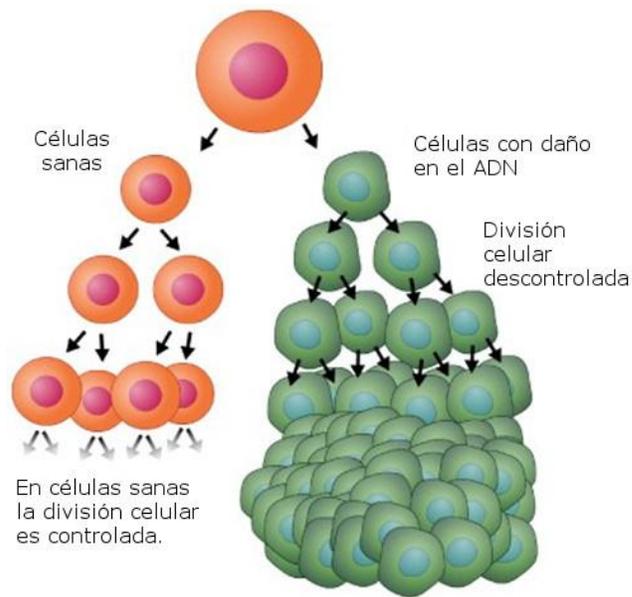


Figura 1. Proceso de la formación de un tumor cancerígeno.

A pesar de que son numerosos los diferentes tipos de cáncer tienen ciertas características en común. El crecimiento descontrolado de las células es el más evidente. Bajo estas circunstancias se pierde el control a las respuestas normales de crecimiento, por lo que las células se dividen hasta aglomerarse en una masa dentro de un espacio delimitado, formando un ambiente diferente al de las células sanas. Como consecuencia se necesita mayor cantidad de nutrientes y requerimientos energéticos conforme se desarrolla el tumor. Sin embargo, conforme crece el tumor disminuye la formación de vasos sanguíneos, los cuales llevan oxígeno y nutrientes a las células, por lo que disminuye considerablemente la cantidad de nutrientes, se crea un ambiente reductor por la baja concentración de oxígeno. Usualmente la concentración de oxígeno en el tumor sólido es menor a $3 \mu\text{M}$, mientras que en un tejido normal es alrededor de $14 \mu\text{M}$ [23]. Otro factor importante es el pH, el cual disminuye aproximadamente de 7.4 en células sanas a 6.0 en tumores sólidos, esto por la formación de ácidos como el ácido láctico. Aunque recientemente se demostró que la hidrólisis del ATP en la respiración oxidativa contribuye en gran medida a disminuir el pH extracelular, ya que genera dióxido de carbono y ácido carbónico que no son fácilmente removidos por la disminución de los vasos sanguíneos, los cuales se encargan de transportar nutrientes y oxígeno a los diferentes tejidos del organismo [24].

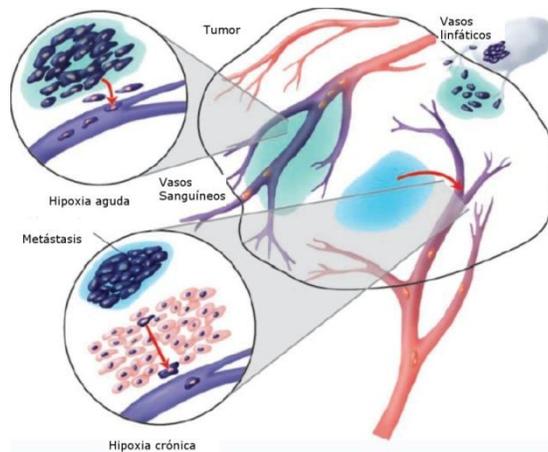


Figura 2. Medio ambiente dentro de un tumor cancerígeno [25].

El tratamiento para los diferentes tipos de cáncer no es sencillo debido a las particularidades de cada uno de ellos, por lo que podríamos dividirlos en tres grandes áreas:

- Las cirugías. El tumor sólido es físicamente removido, usualmente se combinan las cirugías con la radioterapia y la quimioterapia.
- La radioterapia. Se usa entre el 45 y 60% de las terapias. Ésta terapia utiliza energía como rayos X o rayos gama para reducir el tumor cancerígeno al dañar el ADN y producir la muerte celular.
- La quimioterapia. El uso de cualquier sustancia química con un efecto farmacológico puede ser considerada como quimioterapia. Sin embargo, usualmente se refiere sólo a las terapias en tratamientos cancerígenos. La quimioterapia se utiliza en un 22% de los pacientes.

Mientras que las cirugías y las radioterapias son tratamientos considerados como locales, debido a que se enfocan en una sola región, la quimioterapia es considerada un tratamiento sistémico, ya que las sustancias viajan a través del sistema sanguíneo hasta donde se localiza el tumor.

Existen diversos compuestos que han sido utilizados para combatir el cáncer y alrededor de 400 actualmente han sido aprobados para utilizarlos en quimioterapia, terapias hormonales, terapias biológicas [21]. Desafortunadamente, presentan efectos adversos, tales como resistencia y altas toxicidades. Es por ello que es deseable tener compuestos que tengan menos efectos secundarios, pero sobre todo que sean menos tóxicos y que no presenten resistencia, es decir que no se necesite incrementar la dosis una vez que se empieza la terapia.

2.2 COMPUESTOS DE LOS METALES DE TRANSICIÓN COMO AGENTES ANTICANCEROSOS

En la búsqueda de fármacos que puedan ser utilizados como agentes anticancerosos, las investigaciones han mostrado que no existe una cura única para los distintos tipos de cáncer debido a la diversidad de funciones de las células. Las terapias y medicamentos se adecúan al tipo de cáncer pues el desarrollo de células cancerígenas es diferente en cada tejido. Por ejemplo, en el caso de las leucemias se utilizan compuestos de arsénico para combatir la enfermedad [6]. Complejos de oro(I) y oro(III) con ligantes nitrogenados aromáticos, mostraron efectos citotóxicos importantes y actualmente son investigados ampliamente [26]. Compuestos de iridio con geometría medio sándwich mostraron actividad anticancerosos en células resistentes al *cis*-platino [27].

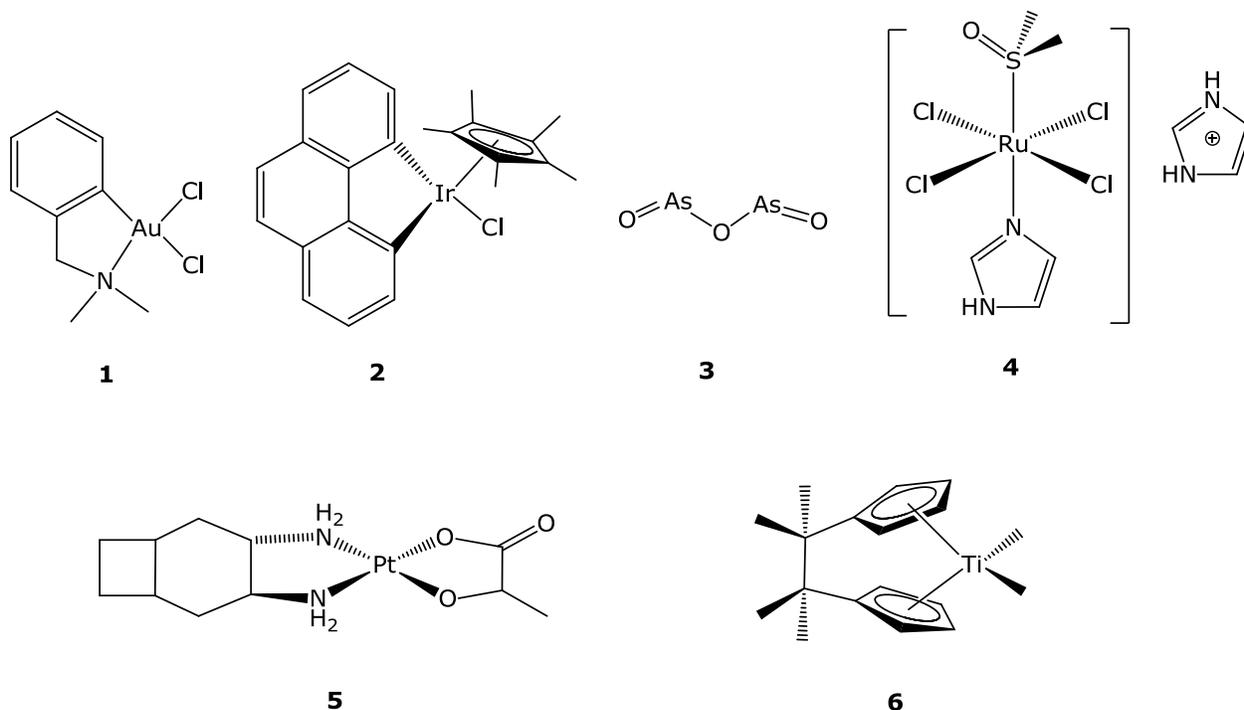


Figura 3. Compuestos de diferentes metales que muestran propiedades citotóxicas.

Precisamente el compuesto *cis*-diaminodichloroplatino(II) fue el que revolucionó la perspectiva de los compuestos de los metales de transición en la medicina. Desde que fue aprobado en 1978 por la Administración de

Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos, el *cis*-platino es uno de los compuestos más utilizados en quimioterapias, casi el 70% de los pacientes que reciben esta terapia utilizan este compuesto de platino [28]. A pesar de que el *cis*-platino es ampliamente utilizado en diversos tipos de cáncer, tiene algunos efectos secundarios que pueden provocar la suspensión del tratamiento o en casos más severos puede llevar a la muerte al paciente. De los efectos adversos destacaremos tres que son particularmente nocivos. El primero es consecuencia del mecanismo de acción del *cis*-platino el cual se hidroliza en los enlaces Pt-Cl. Posteriormente sobre el platino puede formar enlaces covalentes con el ADN (en donde inicialmente estaban los enlaces con cloro), principalmente con la guanina, aunque también puede formar enlaces con proteínas [29].

Estas interacciones impiden la replicación del ADN, desencadenando señalamientos para su reparación, provocando la muerte celular por apoptosis cuando es imposible la reparación. El principal mecanismo se produce por la interacción intramolecular guanina-guanina o guanina-adenina dentro de una misma hebra de ADN, con cerca del 85-90% del total de daños causados por este compuesto [30]. Este mecanismo es adecuado en el caso de células cancerígenas, pero el *cis*-platino no diferencia células cancerígenas de células sanas, por lo que también lleva a la apoptosis células sanas.

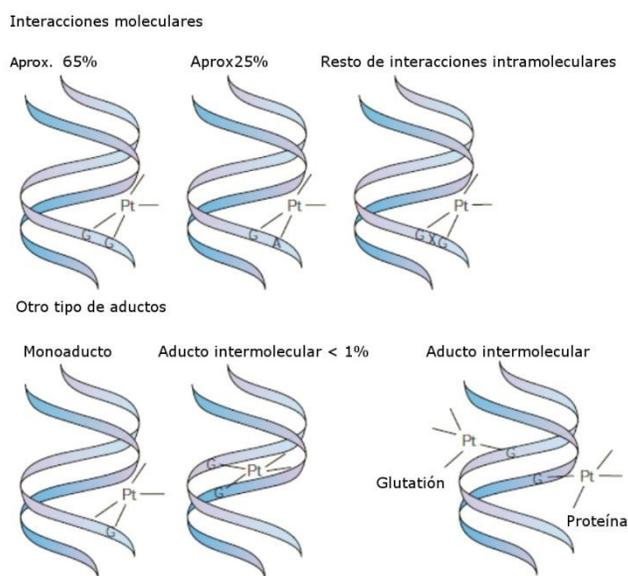


Figura 4. Interacción del *cis*-platino con el ADN [31].

El segundo efecto adverso es la resistencia que produce la terapia con *cis*-platino, la cual lleva a la disminución de la apoptosis de las células cancerígenas, por lo que se requiere de una mayor dosis para lograr el efecto deseado. La resistencia puede ser a causa de una exposición prolongada al platino o en algunos casos la resistencia es un fenómeno inherente al tipo de cáncer. De cualquier forma el aumento en la concentración del *cis*-platino dirige a la tercera adversidad, la bioacumulación del compuesto metálico, ya que no puede ser removido fácilmente del organismo, por lo que se acumula principalmente en el riñón, causando severos casos de nefrotoxicidad, aunque en este órgano también es la principal ruta para la excreción de este compuesto [32].

Tratando de mejorar las características del *cis*-platino se sintetizaron en todo el mundo una gran cantidad de compuestos de platino, probando su actividad biológica, particularmente como anticancerosos. Siendo así que en 1989 se aprobó el carboplatino por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos, el cual es utilizado en cánceres de cabeza, cuello, testicular, cervical y de ovario. En 2002 se aprobó el oxaliplatino por la misma agencia en los Estados Unidos, el cual es utilizado en el cáncer de colon. Aunado a estos compuestos, de forma local se utiliza en Japón el nedaplatino, en China el lobaplatino y en Corea del Sur el heptaplatino [23]. De cualquier forma de todos los compuestos de platino probados *in vitro*, sólo 30 compuestos de platino entraron a pruebas clínicas, de los cuales se utilizan de forma comercial 3 compuestos a nivel mundial y 3 más a nivel local.

La mayoría de los compuestos de platino no han superado las fases clínicas debido a los problemas de alta toxicidad. Incluso los compuestos que han sido aprobados tienen problemas de toxicidad. Este es un grave inconveniente para los compuestos de platino, ya que limita su uso como medicamento debido a que no son aprobados por instancias internacionales.

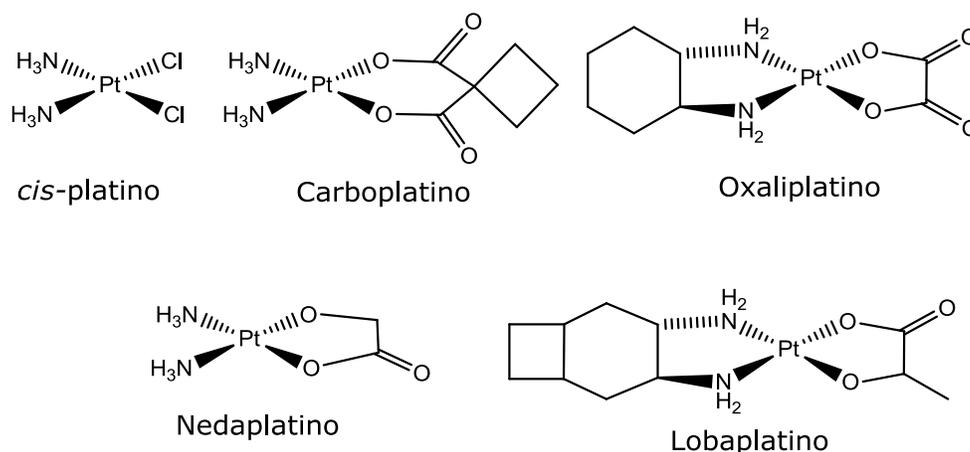


Figura 5. Compuestos de platino utilizados en terapias anticancerígenas.

Para tener alternativas a los compuestos ya existentes hay dos opciones, una seguir sintetizando y probando la actividad biológica de nuevos compuestos de platino, o cambiar de metal y utilizar nuevos compuestos para tener nuevas alternativas y evitar la alta toxicidad de los compuestos de platino.

De los compuestos de metales de transición que se han estudiado por sus propiedades citotóxicas están el oro, iridio, rodio, hierro, paladio [23], sin embargo hasta el momento la mejor opción para sustituir a los compuestos de platino en las terapias anticancerosas son los compuestos de rutenio y osmio, ya que tienen una actividad anticancerosa similar al *cis*-platino, o incluso en algunos casos mejor, pero con menores efectos adversos.

2.3 ACTIVIDAD ANTICANCEROSA DE COMPUESTOS DE RUTENIO Y OSMIO

Los compuestos de los metales de transición tienen una gran diversidad de reactividad dependiendo principalmente del metal, pero que puede modularse por los ligantes unidos al centro metálico, también puede influir en la reactividad el estado de oxidación del metal, su potencial de óxido-reducción, incluso sí el compuesto es iónico o neutro. Siendo así que los compuestos de platino son muy diferentes a los de rutenio y osmio en cuanto a las estructuras que pueden formar. Por ejemplo, los compuestos de platino(II) tienen una geometría cuadrada con cuatro ligantes, mientras que los compuestos de rutenio(II), rutenio(III), osmio(II) y osmio(III) usualmente tienen seis sitios de coordinación con geometrías octaédrica y tipo medio sándwich, por lo que incrementa el número de ligantes con respecto a los de platino, que podrían modular la reactividad del complejo, así como una mayor diversidad en las geometrías, ya que también puede encontrarse el rutenio y osmio con cinco sitios de coordinación con geometrías bipirámide trigonal o pirámide base cuadrada. Tratando de aprovechar las diferencias entre estos metales se han sintetizado compuestos de rutenio y osmio con un promisorio futuro para ser aprobados como medicamentos en terapias anticancerosas.

Existen diferentes grupos alrededor del mundo que han probado la actividad biológica de compuestos de rutenio. Por ejemplo, el grupo de Paul Dyson ha estudiado una serie de complejos de rutenio(II), con un arreglo tipo medio sándwich, $[\text{Ru}(\eta^6\text{-areno})(\text{PTA})\text{Cl}]$ (PTA = 1,3,5-triaza-7-fosfatriciclo[3.3.1.1]decano), los cuales han mostrado efectos antimetastásicos importantes frente a líneas celulares resistentes al *cis*-platino de cáncer humano de ovario A2780 [33]. Otra serie de complejos de rutenio con una estructura de tipo "piano-stool", $[\text{Ru}(\eta^6\text{-areno})(\text{azpy})\text{I}]^+$ (azpy = N,N-dimetilfenil azopiridina), estudiada por Peter Sadler, ha tenido una muy alta citotoxicidad contra células de cáncer humano de ovarios A2780 y de pulmones A549 [34]. Actualmente existen dos complejos de rutenio estudiados por los grupos de (Gianni Sava y Enzo Alessio) y Bernhard K. Keppler, llamados NAMI-A y KP1019 respectivamente, que han superado la primera fase de pruebas clínicas [35].

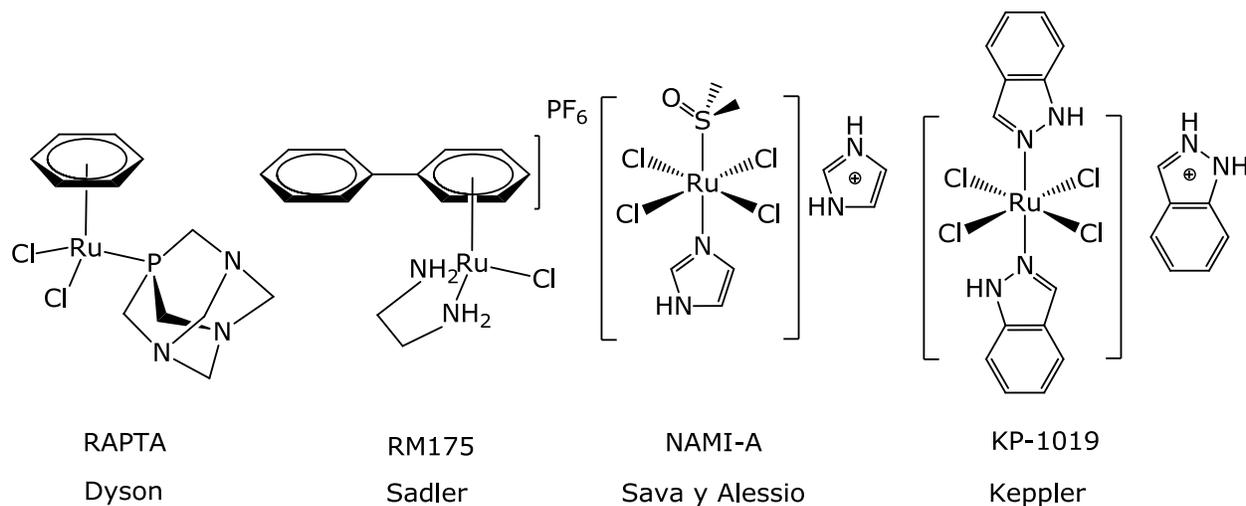


Figura 6. Compuestos de rutenio con propiedades citotóxicas.

Nuestro grupo en el Instituto de Química de la UNAM en México y de Michel Pfeffer y Christian Gaidon de la Universidad de Estrasburgo en Francia han estudiado complejos ciclometalados de rutenio y osmio, teniendo efectos citotóxicos similares al *cis*-platino, con una menor toxicidad hacia los tejidos sanos, probablemente debido a que los complejos de rutenio y osmio pueden utilizar los mecanismos de transporte del hierro como la albúmina y la ferritina [36][20]. También se demostró que estos compuestos pudieron eliminar líneas de células resistentes al *cis*-platino [19].

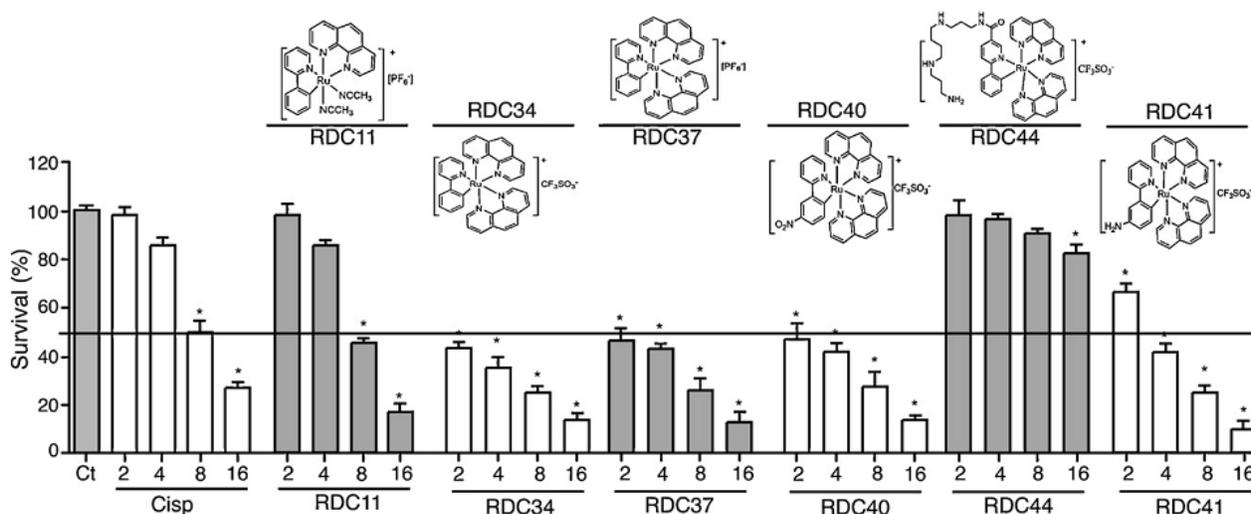


Figura 7. Complejos ciclometalados de rutenio probados con la línea celular HCT116 (cáncer de colon) [37].

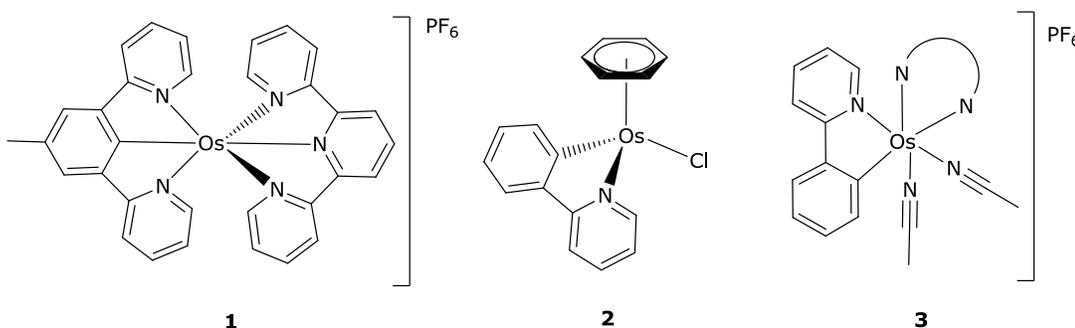


Figura 8. Complejos ciclometalados de osmio probados con la línea celular A172 (glioblastoma humano), con efectos antitumorales similares a los de rutenio [20].

Los compuestos de rutenio y osmio probados con líneas celulares cancerígenas son muy diversos. El éxito obtenido es parcial, ya que, varios de estos compuestos tienen actividad anticancerosa en líneas celulares que son resistentes a los compuestos de platino, la actividad antitumoral supera la de algunos compuestos utilizados en la actualidad y los efectos indeseables son menores comparados con los compuestos de platino. Sin embargo, no se ha logrado avanzar en las pruebas clínicas, en parte, debido a que no se sabe con exactitud el mecanismo de acción de estos compuestos.

Evidentemente no todos reaccionan de la misma forma, pero se piensa que los compuestos tipo medio sándwich pueden tener reacciones de hidrólisis

intercambiando ligantes cloro por ligantes acuo, ya que el areno es generalmente estable frente a reacciones de hidrólisis. La hidrólisis se presenta principalmente de forma intracelular ya que la concentración de iones cloruro es relativamente baja $[Cl^-] = 4-25 \text{ mM}$, mientras que la concentración extracelular es $[Cl^-] = 100 \text{ mM}$. El pK_a juega un papel importante, ya que los compuestos $[Ru(\eta^6\text{areno})(en)(H_2O)]^{2+}$ (en = etilendiamina) tienen un pK_a entre 7 y 8, por lo que a pH fisiológico el compuesto se encuentra preferentemente desprotonado, como lo muestra la figura 9 [23].

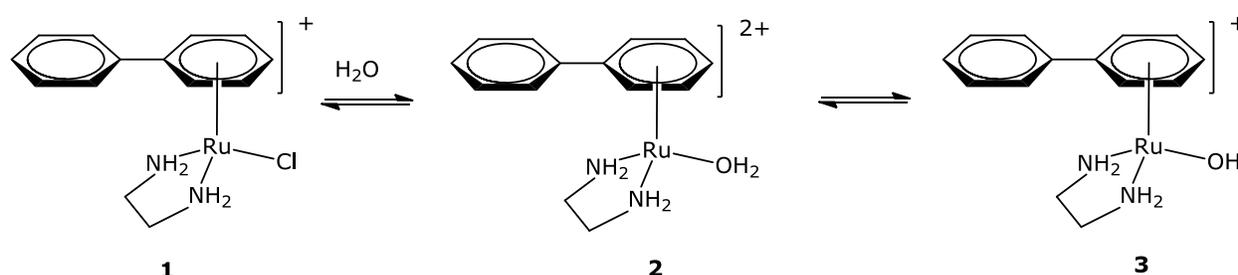


Figura 9. Mecanismo de hidrólisis de los compuestos de rutenio [23].

En el caso de los compuestos estudiados por Sadler se cree que el principal blanco es el ADN formando aductos con el N7 de la guanina, los compuestos de rutenio son estabilizados por ligantes bidentados nitrogenados como la etilendiamina [34].

Por otro lado los compuestos medio sándwich con el ligante RAPTA también sufren reacciones de hidrólisis. En algunos casos se ha visto la pérdida del areno y se observa un enlace fuerte entre Ru-PTA (PTA = 1,3,5-triaza-7-fosfatriciclo[3.3.1.1]decano). Estos compuestos tienen una baja actividad citotóxica. Sin embargo, presentaron actividad antimetastásica frente a cáncer de mama, inhibiendo la metástasis en pulmón, aunque también tiene efecto antimetastásico sobre las líneas celulares MDA-MB-231, MCF-7 y HBL-100. El mecanismo de acción de estos compuestos no es del todo claro, una hipótesis es que sufran hidrólisis en los enlaces cloro y este sea el detonante de su mecanismo de acción. Para confirmar esto se sustituyó los ligantes cloro por ligantes dicarboxilato para formar compuestos menos propensos a tener reacciones de hidrólisis, sin embargo la actividad fue similar en los compuestos con cloro y con dicarboxilatos [23].

El compuesto KP1019 estudiado por Keppler tiene actividad citotóxica con alrededor de 50 líneas celulares diferentes [23]. Desafortunadamente, su mecanismo de acción aún no es del todo claro. Se sabe que puede tener reacciones de hidrólisis, y que dentro de la célula tiene una activación por reducción, ya que sufre una reacción de oxidorreducción con agentes reductores como el ácido ascórbico o el glutatión, para pasar de Ru(III) a Ru(II). Uno de los blancos moleculares más importantes para estos tipos de compuestos son las proteínas, otro es el ADN, aunque este último no es el blanco molecular principal. Por ejemplo, en las líneas celulares de cáncer de colon SW480 y HT29 la principal vía de la apoptosis es por procesos mitocondriales en la generación de especies reactivas de oxígeno. Aunado a esto la formación de especies reactivas de oxígeno pueden dañar el ADN y llevar a la muerte celular programada. La baja toxicidad de este compuesto comparado con el *cis*-platino puede deberse a la alta afinidad hacia proteínas como la albumina o la transferrina, las cuales pueden transportar a este compuesto hasta el tumor sólido. Debido a la gran variedad de blancos moleculares y la diversidad de reacciones que puede sufrir este tipo de compuestos es difícil establecer el mecanismo de reacción. Un caso muy parecido es el compuesto NAMI-A, el cual es estructuralmente similar al KP1019, sin embargo mientras que este último tiene efecto sobre el tumor sólido, el NAMI-A actúa principalmente en la metástasis. Aún hoy en día el mecanismo de acción del NAMI-A es desconocido y aunque interactúa con el ADN no es la principal vía de acción, y al igual que el KP1019 se une a proteínas como la albumina y la transferrina. Los estudios sobre este compuesto han mostrado que puede tener múltiples mecanismos al tener efecto sobre la membrana celular y de forma intercelular [23][33][34][35].

Los compuestos estudiados por Gaiddon y Pfeffer son muy diferentes, al menos tienen un fragmento ciclometalado, además de ligantes nitrogenados como la bipyridina y la fenantrolina unidos fuertemente con enlaces rutenio-nitrógeno. Este tipo de compuestos llamados RDC (Ruthenium Derived Compounds) u ODC (Osmium Derived Compounds) tienen reactividad diferente a los casos anteriores, ya que se piensa no sufren reacciones de sustitución. En el caso de los compuestos ciclometalados la hidrólisis no es viable ya que los ligantes bidentados así como el fragmento ciclometalado son menos sensibles a este tipo de reacciones. Se ha visto que hay interacción con el ADN pero no es la principal vía para explicar la actividad citotóxica de estos compuestos [37][38].

Tratando de desvelar la incógnita que se cierne sobre el mecanismo de acción de los compuestos de rutenio, trabajamos de manera conjunta desde hace varios años con los grupos de trabajo del Dr. Christian Gaiddon y del Dr. Michel Pfeffer. Esto se debe a que nuestro grupo de investigación ha estudiado diversos complejos ciclometalados de rutenio y osmio particularmente en reacciones de oxidorreducción como en bioelectrocatalisis y polimerización viviente. Hemos puesto en evidencia que complejos de rutenio(II), rutenio(III), osmio(II) y osmio(III) son particularmente activos para intercambiar electrones con enzimas oxidorreductasas. Es decir, los complejos organometálicos actúan como acarreadores de electrones entre el sitio activo de una enzima y un electrodo [39][17][40]. Así, complejos de rutenio y osmio en estado de oxidación 2+ pueden reducir las formas oxidadas de la peroxidasa de rábano (HRP). Los mismos complejos en estado de oxidación 3+ pueden a su vez oxidar los sitios activos de otras enzimas. Algunas enzimas oxidadas estudiadas fueron la glucosa oxidasa de aspergillus niger (GO), la glucosa deshidrogenasa pirroloquinolona quinona (GDH-PQQ) y la alcohol deshidrogenasa (ADH) [39][40]. Se puso en evidencia que el fragmento ortometalado con un enlace σ metal-carbono es un elemento crucial para brindar rigidez al complejo y así favorecer el proceso reversible de regeneración del mediador. Además, el enlace σ metal-carbono reduce de manera importante los potenciales de oxidorreducción de los complejos organometálicos [40].

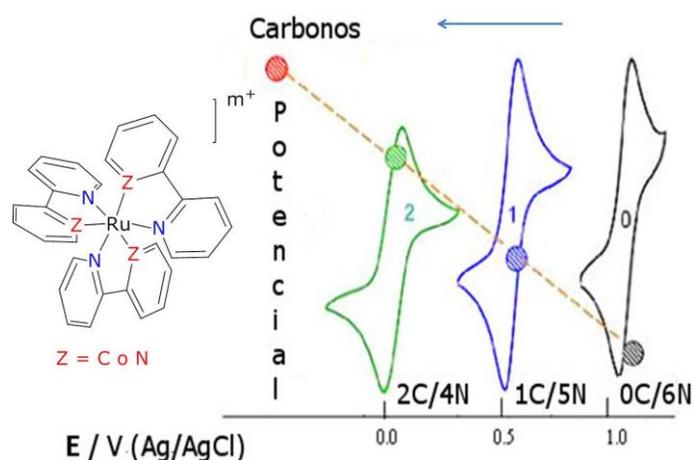


Figura 10. Disminución del potencial redox de los complejos de rutenio, en función del número de átomos de C y N enlazados a Ru [41].

Analizando en la literatura las investigaciones realizadas a los complejos ciclometalados de rutenio por un lado como mediadores en biosensores amperométricos y por otro su actividad anticancerígena, aparentaban ser dos temas completamente distintos. Sin embargo, pensamos que podría existir un puente entre ambas, debido a que en el organismo existen varias enzimas oxidorreductasas que pudieran reaccionar con los compuestos de rutenio y osmio y probablemente activar mecanismos que fueran los responsables de la citotoxicidad de los compuestos.

Dado este panorama tratamos de resolver dos cuestiones fundamentales ¿Qué compuestos podríamos utilizar para entender el papel que juega la estructura de los compuestos ciclometalados en su actividad citotóxica? y ¿qué enzimas podríamos utilizar que nos brindaran información para saber la influencia de los compuestos sobre la actividad catalítica de algunas enzimas oxidorreductasas relacionadas con procesos cancerígenos?

Para responder la primera pregunta elegimos una serie de compuestos con prácticamente la misma estructura, donde lo único que cambiara fuera sustituir un enlace M-N por un enlace sigma M-C, como se muestran en los compuestos 1-4 de la figura 11. Estos compuestos se utilizaron pensando en tratar de relacionar cómo influyen algunas características de los complejos como el estado de oxidación, el potencial de óxido reducción con su actividad anticancerosa, basándonos en el estudio de la interacción con enzimas oxidorreductasas.

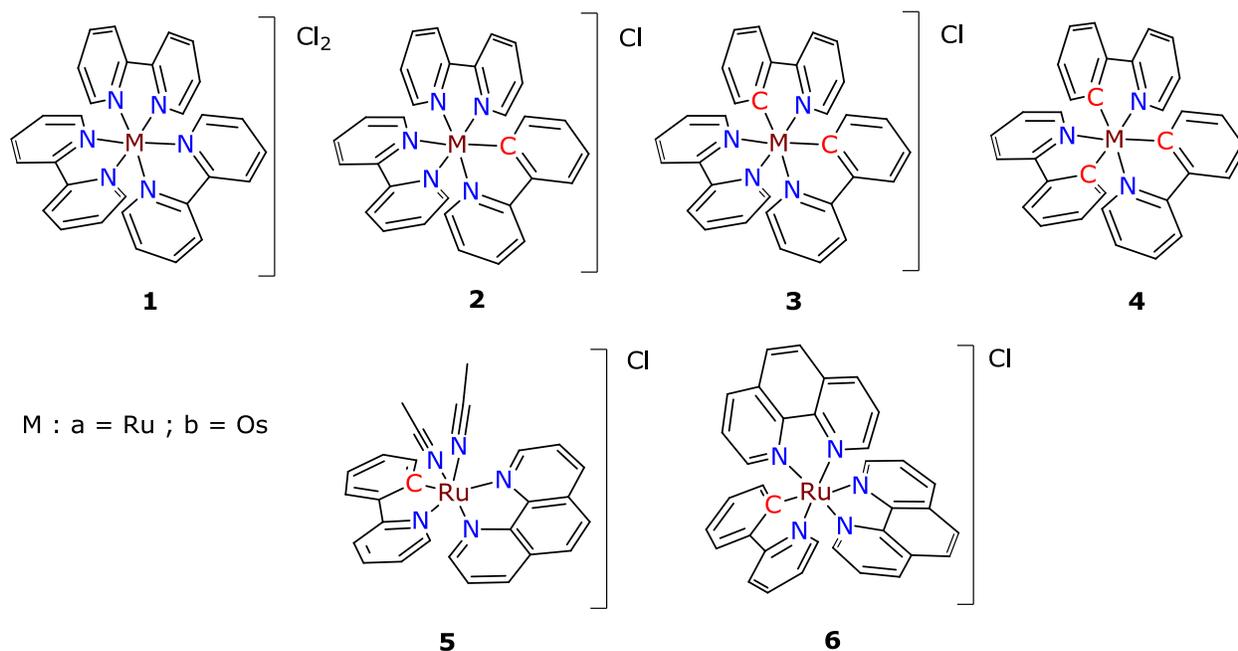


Figura 11. Compuestos de rutenio y osmio con similar estructura, cambiando el número de átomos de nitrógeno y carbono que se enlazan al metal, utilizados con diversas enzimas oxidorreductasas.

Los complejos **1** y **2**, **5** y **6** tienen un estado de oxidación 2+, mientras que los complejos **3** y **4** tienen un estado de oxidación 3+. El potencial redox M^{3+}/M^{2+} de los complejos varía desde 1.46 V en el complejo **1a**, hasta 0.220 V en el complejo **3a** y de 0.888 V en el complejo **1b** hasta -0.958 V en el complejo **4** utilizando acetonitrilo como disolvente, referidos al electrodo de Ag/AgCl, como se muestra en la figura 12.

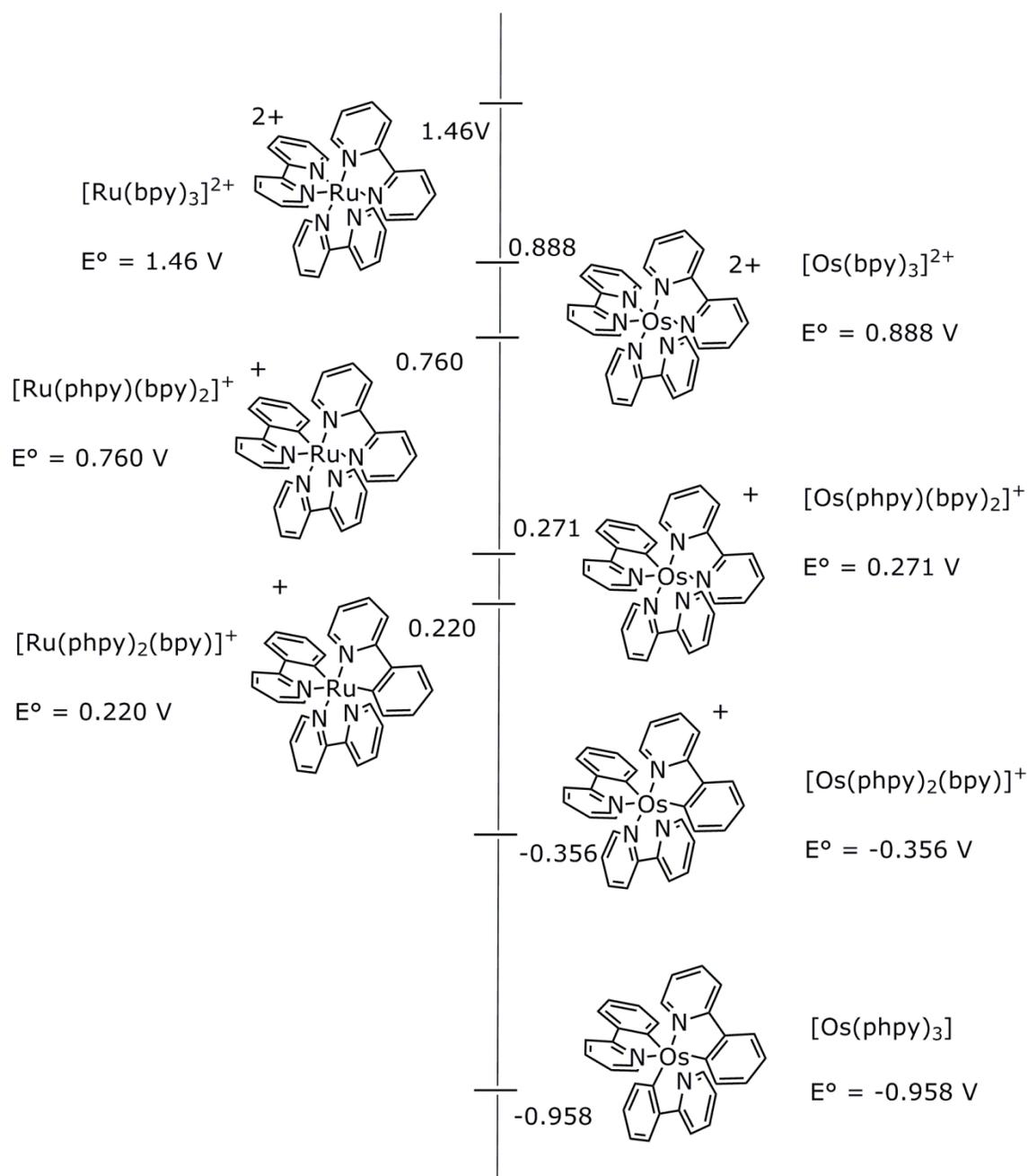


Figura 12. Potencial de oxidorreducción de los complejos de rutenio y osmio que contienen la estructura básica $[\text{M}(\text{C}\sim\text{N})_x(\text{N}\sim\text{N})_{3-x}]^{m+}$ ($\text{M} = \text{Ru}, \text{Os}$; $\text{C}\sim\text{N} = 2\text{-fenilpiridinato}$; $\text{N}\sim\text{N} = 2,2'\text{-bipiridina}$; $x = 0 - 3$). Se midieron los potenciales redox utilizando $1 \times 10^{-3} \text{M}$ de compuesto, 0.1M de $\text{N}(\text{Bu})_4\text{PF}_6$, a una velocidad de barrido de 100 mV/s en acetonitrilo como disolvente. Electrodo de referencia Ag/AgCl [40][41].

La segunda pregunta nos llevó a elegir enzimas que están directamente relacionadas con el cáncer. La glucosa oxidasa fue la primera enzima que elegimos porque es fácil de utilizar, no contiene cofactor y su estructura está

bien definida. En otros ensayos esta oxidorreductasa nos ha servido como modelo para estudiar nuestros sistemas de intercambio de electrones, por lo que pensamos que pudiera servir como guía, para comprender la relación entre las enzimas oxidorreductasas y los complejos organometálicos. También utilizamos la enzima lactato deshidrogenasa enzima que cataliza la conversión de piruvato a L-lactato con la conversión de NADH a NAD⁺, y que se le relaciona con el efecto Warburg, donde las células cancerosas obtienen energía de la conversión de piruvato a L-lactato en vez de que el piruvato entre al ciclo del ácido cítrico y obtener energía de la fosforilación oxidativa.

Se decidió utilizar la enzima PHD2 por controlar una gran cantidad de procesos, algunos fundamentales y a su vez contradictorios como la proliferación celular y la apoptosis. Además de que el sustrato natural de la enzima PHD2 es el Factor de Hipoxia Inducido (HIF-1 α), una proteína que regula la expresión de una gran variedad de genes, cuyos productos participan en procesos como la angiogénesis, el metabolismo energético, la eritropoyesis y la proliferación celular. Dada la gran cantidad de procesos que se pueden controlar por la enzima PHD2 y la proteína HIF-1 α pudieran ser la clave para entender el mecanismo de acción de los complejos organometálicos. Por último estudiamos la familia de las enzimas Proteína Disulfuro Isomerasas (PDI) encargadas de formar o romper enlaces disulfuro en la conformación tridimensional de las proteínas, proceso vital para casi todos los procesos celulares. En los recientes años con el descubrimiento de más enzimas PDI se ha demostrado la relación entre las enzimas PDI y diferentes tipos de cáncer.

A pesar de lo anteriormente descrito no hay suficiente información de la influencia de los complejos organometálicos con enzimas redox. Es por ello que se pretende estudiar por diferentes métodos las reacciones correspondientes con las enzimas lactato deshidrogenasa, prolil hidroxilasa y la familia de las proteínas disulfuro isomerasas. Este grupo de enzimas ha sido relacionado con diferentes procesos cancerígenos y la intención es observar el efecto de nuestros compuestos sobre la actividad catalítica de las enzimas.

2.4 CINÉTICA ENZIMÁTICA

Todos los compuestos que aceleran la velocidad de una reacción son llamados catalizadores. En particular los catalizadores en medios biológicos son llamados *enzimas* (proteínas que llevan a cabo reacciones específicas dentro de las células). La catálisis tiene lugar en una parte definida de la enzima y es lo que les permite tener una gran especificidad hacia sus sustratos, ya que sólo permite el paso de moléculas de tamaño adecuado en el sitio donde se lleva a cabo la reacción. A esta región se le conoce como sitio activo. En algunos casos para que la enzima lleve a cabo la catálisis es necesario de un compuesto adicional llamado cofactor, que puede ser un metal o pequeñas moléculas orgánicas llamadas coenzimas [42][43].

Para explicar la catálisis por enzimas generalmente se recurre al modelo de llave-cerradura, donde el centro activo de la enzima es complementario al sustrato sobre el que se llevará a cabo la reacción.

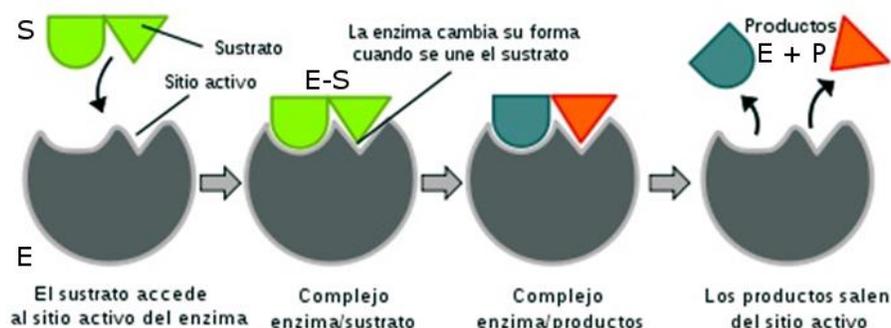


Figura 13. El modelo de llave-cerradura explica la formación del intermediario enzima-sustrato y la formación de productos.

En el modelo de llave-cerradura la enzima (E) se une al sustrato (S) con una constante de velocidad k_1 , formando el complejo ES. El complejo ES tiene dos opciones, regresar a los reactivos E y S con una constante de velocidad k_{-1} o llevar a la formación del producto (P) y la regeneración de la enzima libre [44].



Ecuación 1. Equilibrio para la reacción enzimática. E = enzima, S = sustrato y P = producto, k_x = constantes de velocidad.

Podemos monitorear la formación de producto o la desaparición de sustrato en tiempos cercanos a cero, es decir la velocidad inicial (V_0). En este caso la reacción no es reversible y el equilibrio está desplazado hacia la formación de producto. Durante este intervalo se considera que la concentración de sustrato no varía con el tiempo, por lo que podemos medir la dependencia de la V_0 con respecto a la concentración de sustrato. En estas condiciones la concentración de la enzima es mucho menor que la del sustrato y por lo tanto podemos escribir la ecuación de velocidad [45]:

$$V_0 = \frac{d[P]}{dt} = k_2[ES] \quad (i) \quad \frac{d[ES]}{dt} = k_1[E][S] - k_{-1}[ES] - k_2[ES] = 0 \quad (ii)$$

Si nombramos: $K_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$ $V_{max} = k_2[E]_0$

$$[E]_0 = [E] + [ES] \quad (iii)$$

Reacomodando (ii) y haciendo el balance de masas para [E] en términos de [ES] de acuerdo a (iii):

$$[ES] = \frac{([E]_0 - [ES])[S]}{K_m} \quad (iv)$$

Reordenando en términos de [ES]:

$$[ES] = \frac{[E]_0[S]}{K_m + [S]} \quad (v)$$

Sustituyendo (v) en (i) obtenemos la ecuación de Michaelis-Menten:

$$V_0 = \frac{d[P]}{dt} = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]}$$

Ecuación de Michaelis-Menten

Donde V_{\max} representa el número de sitios activos de la enzima y se define como la velocidad cuando toda la enzima se encuentra unida al sustrato. Por otra parte K_m es una medida de la afinidad de la enzima por el sustrato, su valor representa la concentración a la cual se alcanza la mitad del valor de la velocidad máxima [45].

Existen dos casos importantes en esta ecuación, cuando $[S] \gg K_m$ la velocidad se transforma en $V = k_2[E]_0$ de manera que la cinética es de orden cero respecto al sustrato. Por otra parte cuando $K_m \gg [S]$ la velocidad se transforma a $V = (V_{\max}[S])/K_m$, y la cinética es de primer orden respecto al sustrato [44].

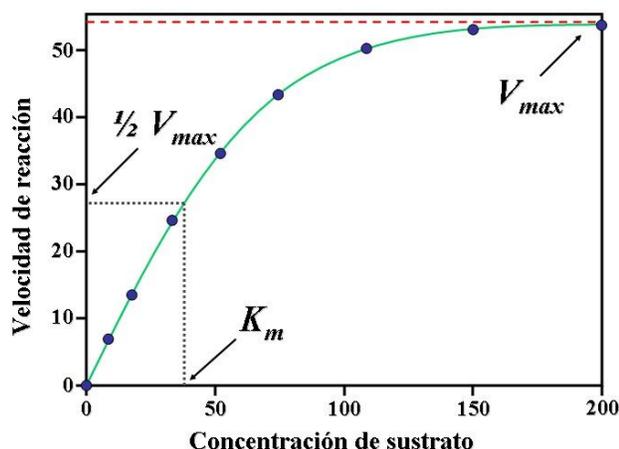


Figura 14. Representación gráfica de la ecuación de Michaelis-Menten.

La curva de la ecuación de Michaelis-Menten es asintótica y el valor de V_{\max} nunca se alcanza, sólo se aproxima. Por ello se transforma esta ecuación para obtener una función lineal, si se expresa en su forma recíproca obtenemos:

$$\frac{1}{V} = \left(\frac{K_m}{V_{\max} [S]} \right) + \frac{1}{V_{\max}}$$

Ecuación de dobles recíprocos.

Una representación gráfica de la ecuación de los dobles inversos o también conocida como gráfica de Lineweaver-Burk $1/V$ vs $1/[S]$ generará una línea recta cuya intersección con el eje y tendrá el valor de $1/V_{\max}$ y la intersección en el eje x será $-1/K_m$. En la pendiente tendremos el valor de K_m/V_{\max} .

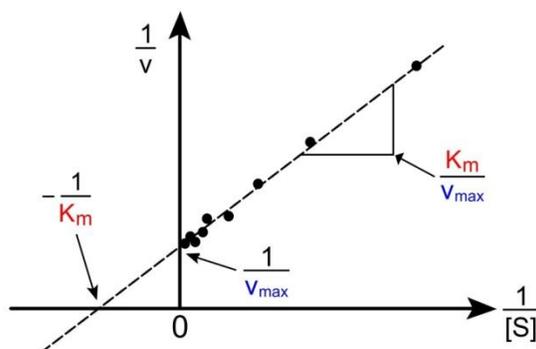
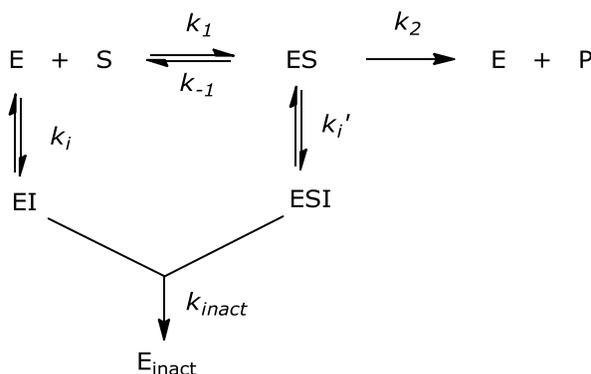


Figura 15. Representación gráfica de la ecuación de dobles inversos.

Existen moléculas que son capaces de modificar la velocidad de las reacciones catalizadas enzimáticamente, sin sufrir un cambio en su estructura. Si la actividad de la enzima se incrementa entonces estamos frente a un activador. Sin embargo, si la actividad de la enzima disminuye haciendo menos efectiva la catálisis se considera un inhibidor. Existen dos tipos de inhibidores: irreversibles y reversibles.

En la inhibición irreversible los compuestos se unen a la enzima o al complejo enzima-sustrato, modificando la estructura de la enzima y provocando la pérdida de la actividad enzimática. La disociación del complejo enzima-inhibidor o enzima-sustrato-inhibidor es muy lenta. Este tipo de inhibición es dependiente del tiempo y para su estudio se utiliza el parámetro $K_{obs}/[I]$ que se obtiene a través de gráficos de actividad en función del tiempo a diferentes valores de la concentración del inhibidor $[I]$ [46].

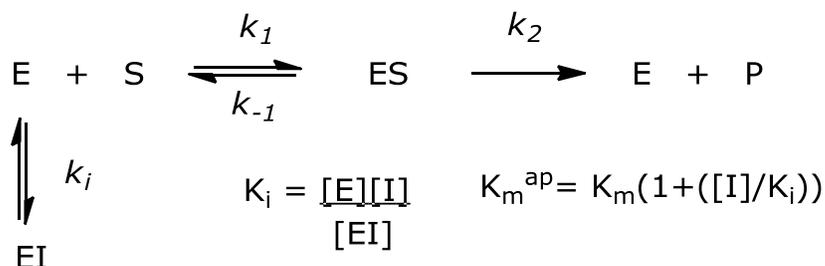


Ecuación 2. Reacción enzimática con un inhibidor irreversible. E = enzima, S = sustrato y P = producto, I = inhibidor, k_x = constantes de velocidad.

En la inhibición reversible, el inhibidor se une a través de interacciones débiles a la enzima o al complejo enzima-sustrato, permitiendo una disociación del complejo enzima-inhibidor o enzima-sustrato-inhibidor.

Principalmente existen tres tipos de inhibidores reversibles.

1) *Inhibidor Competitivo*: Interactúa en el centro activo de la enzima y compete con el sustrato por unirse a este sitio. De este modo reduce la proporción de moléculas de enzima unidas al sustrato. El efecto de un inhibidor competitivo consiste en aumentar el valor aparente de K_m . Es decir, para obtener el mismo valor de K_m se necesita una mayor cantidad de sustrato. De aquí que $K_m^{ap} = K_m(1 + ([I]/K_i))$. Mientras menor sea el valor de la constante de inhibición K_i , mayor será el efecto de inhibición competitiva. $K_i = [E][I]/[EI]$ [46].



Ecuación 3. Equilibrio para la reacción enzimática con un inhibidor competitivo. E = enzima, S = sustrato y P = producto, I = inhibidor, k_x = constante de velocidad. K_y = constante de equilibrio.

En presencia de un inhibidor competitivo la pendiente de la recta en una gráfica de Linewaver-Burk aumenta en un factor de $(1 + [I]/K_i)$. Si aumentáramos la concentración del inhibidor veríamos que V_{max} permanece constante y el valor de K_m varía a las diferentes concentraciones del inhibidor.

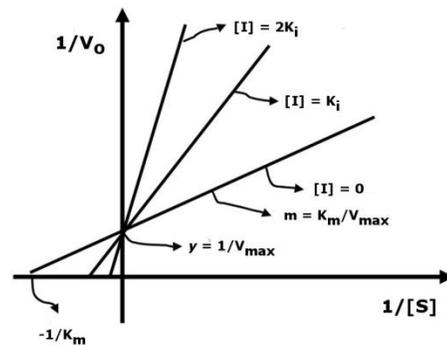
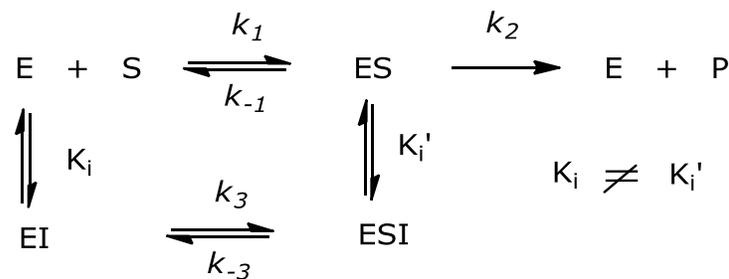


Figura 16. Gráfica de dobles inversos para diferentes concentraciones de un inhibidor competitivo.

2) *Inhibidor mixto*. La unión de un inhibidor mixto puede ser con la enzima libre o con el complejo enzima-sustrato. En este caso la unión con la enzima puede ser tanto en el sitio activo como en un sitio distante, por lo que modifica los parámetros de K_m y V_{max} [46].



Ecuación 4. Equilibrio para la reacción enzimática con un inhibidor mixto. E = enzima, S = sustrato y P = producto, I = inhibidor, k_x = constante de velocidad. K_y = constante de equilibrio.

Si aumentáramos la concentración del inhibidor e hiciéramos el gráfico de los dobles inversos, veríamos que V_{max} disminuye y el valor de K_m aumenta a las diferentes concentraciones del inhibidor. Las pendientes en este caso intersectan sobre el cuadrante, es decir, fuera de los ejes.

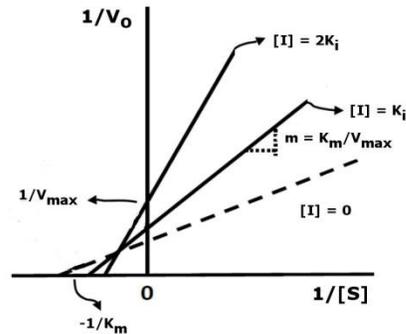
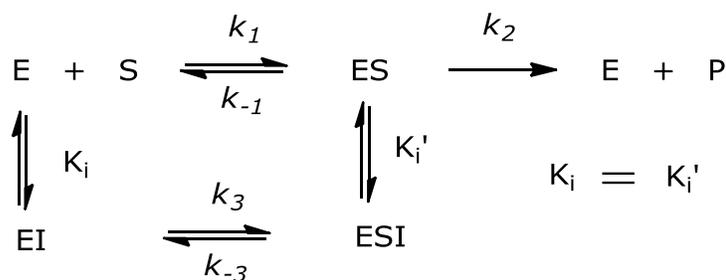


Figura 17. Gráfica de dobles inversos para diferentes concentraciones de un inhibidor mixto.

En este caso el cálculo de K_i podría ser confuso, por lo que se recurre a graficar la concentración inhibitoria 50 ($i_{0.5}$), que se obtiene de graficar la concentración del inhibidor contra la velocidad máxima. El valor de $i_{0.5}$ sería la concentración del inhibidor a la cual $V_{\max}' = \frac{1}{2} V_{\max}$ por lo tanto $i_{0.5} = V_{\max}^{\circ}/2\alpha$. Dado que $V_{\max} = V_{\max}^{\circ} - \alpha[I]$. Donde α es un valor adimensional y V_{\max}° es el valor de V_{\max}^{eff} obtenido por la gráfica de Michaelis-Menten.

3) *Inhibidor no competitivo*. La unión con la enzima libre o con el complejo enzima-sustrato es en un sitio diferente al catalítico. En este caso el valor de K_m permanece sin cambio. Mientras que, el valor de V_{\max} disminuye debido a que la enzima se encuentra menos disponible, dando la impresión de una dilución de la enzima [46].



Ecuación 5. Equilibrio para la reacción enzimática con un inhibidor no competitivo. E = enzima, S = sustrato y P = producto, I = inhibidor, k_x = constante de velocidad. K_y = constante de equilibrio.

Si aumentáramos la concentración del inhibidor e hiciéramos el gráfico de los dobles inversos, veríamos que V_{\max} disminuye mientras que el valor de K_m permanece constante a las diferentes concentraciones del inhibidor. Las pendientes en este caso intersectan sobre el eje de las x.

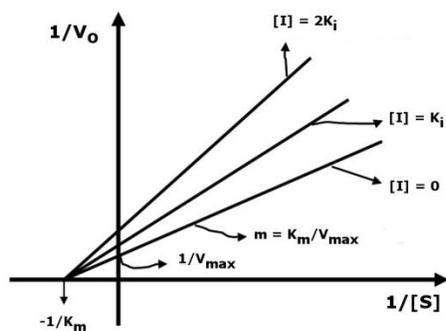


Figura 18. Gráfica de dobles inversos para diferentes concentraciones de un inhibidor no competitivo.

Para estudiar la interacción de los complejos organometálicos de rutenio y osmio con las diferentes enzimas redox utilizaremos los gráficos de Michaelis-Menten, por el método de la velocidad inicial.

2.5 ENZIMAS OXIDORREDUCTASAS

El organismo está conectado por diversas rutas metabólicas, donde una pequeña alteración en un lado puede generar cambios notables en otro. Siendo que las enzimas encargadas de promover numerosas reacciones del organismo, pueden ser activadas o desactivadas por diversos factores, como las concentraciones de los metabolitos o el pH. La alteración de los procesos normales dentro de la célula puede llevar a diferentes escenarios. Uno de ellos es el cáncer, enfermedad de la cual se desconoce aún varios procesos, y es que la complejidad del organismo sólo permite el estudio de esta enfermedad paso a paso.

Una de las principales rutas que se ve alterada por las células cancerígenas es la obtención de energía, la cual involucra diversas enzimas como la lactato deshidrogenasa cuando se obtiene L-lactato y 2 moléculas de ATP. Asimismo se piensa que la enzima PHD2 tiene un papel fundamental dentro de los procesos cancerígenos, es por ello que en este capítulo se describirán algunas características importantes de estas enzimas, detallando la razón de su elección para estudiarlas junto con los complejos organometálicos.

2.5.1 GLUCOSA OXIDASA

La glucosa oxidasa de *Aspergillus Niger* es una enzima con un peso molecular de 160 KDa, cuenta con dos subunidades idénticas, y cada subunidad tiene en su sitio activo un grupo prostético flavin adenin dinucleótido (FAD), cada uno de estos grupos se encuentra a 40 Å de distancia, en el sitio activo hay una cavidad con un diámetro de 10 Å.

Esta enzima cataliza la oxidación de glucosa (β -D-glucopiranososa) en δ -D-gluconolactona, utilizando oxígeno molecular (O_2) como oxidante, el cual se reduce a peróxido de hidrógeno, de acuerdo a la ecuación 6.



Ecuación 6. Reacción de oxidación de la β -D-glucopiranososa a δ -D-gluconolactona en presencia de glucosa oxidasa y oxígeno molecular.

Diversas reacciones de óxido reducción en presencia de enzimas oxidorreductasas, como la oxidación de glucosa a gluconolactona, han sido estudiadas por nuestro grupo de trabajo. En presencia de un electrodo puede servir como biosensor para cuantificar la concentración de glucosa en sangre. Usualmente se utiliza un compuesto llamado mediador para transportar electrones entre la enzima y el electrodo. Los complejos ciclometalados de rutenio y osmio que aquí se presentan son un ejemplo de mediadores, estos se encargan de trasladar los electrones provenientes de la oxidación de la glucosa, es decir los complejos interactúan con la enzima y llevan los electrones al electrodo.

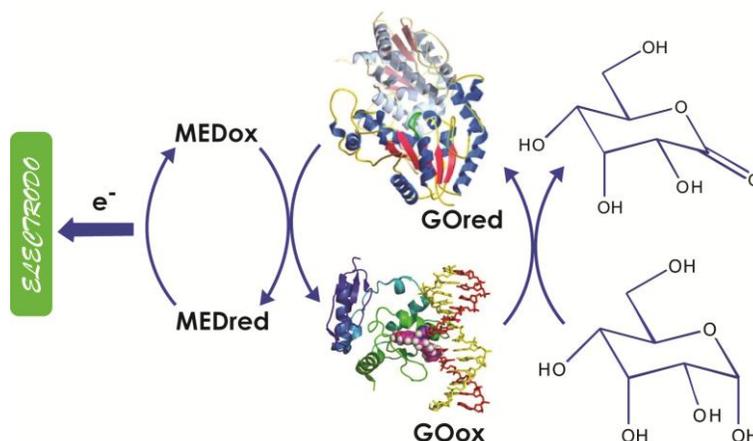


Figura 19. Esquema de un biosensor. Se oxida la glucosa por medio de la enzima GO, donde el mediador (MED) puede ser un complejo ciclometalado, el cual transporta electrones entre la enzima y el mediador.

El interés de esta reacción en procesos cancerígenos es debido a que varias de las alteraciones genéticas que causan el desarrollo de tumores afectan la vía metabólica de la glucólisis. Al menos en 24 diferentes tipos de cáncer se ha observado que hay una sobreexpresión de los genes de esta vía metabólica [47].

La alteración de la glucólisis modifica diversos factores, como algunos transportadores de glucosa como GLUT-1 y GLUT-4, o la hexoquinasa-2 y la 6-fosfofructocinasa-1. Sin embargo, uno de los mayores efectos es la disminución de la concentración de oxígeno, ya que para el crecimiento del tumor en condiciones de hipoxia se requiere un alto flujo glucolítico (el cual se observa en una gran cantidad de tumores). Esto a su vez provoca la alteración del factor de hipoxia inducido HIF-1 α , esta proteína controla una gran cantidad de enzimas glucolíticas, como la fructuosa bifosfato, enolasa-1, piruvato cinasa [47].

En el año 2013 nuestro grupo publicó un artículo en donde se estudiaba por primera vez la interacción de los complejos organometálicos de rutenio con la enzima glucosa oxidasa, monitoreando la velocidad de reacción en ausencia y presencia de los complejos ciclometalados [48]. Si bien el efecto sobre la velocidad de reacción no es muy grande, sí es un punto de partida para estudiar enzimas oxidorreductasas en presencia de los complejos organometálicos. Además se observan diferentes modos de interacción entre los complejos y la enzima. Por ejemplo, el complejo **1a** (ver figura 11) se comporta como un inhibidor competitivo, es decir, inhibe la velocidad de la reacción al interactuar en el sitio activo de la enzima. Por otro lado, el complejo **2a** se comporta como un inhibidor no competitivo, la interacción con la enzima es en un lado distinto al sitio activo. Esto se demostró utilizando la velocidad inicial de la reacción, en la que se realizan las gráficas de Michaelis-Menten y posteriormente la gráfica de los dobles inversos.

El complejo **3a** interactúa con la enzima de forma diferente a los dos casos anteriores, ya que primero activa la reacción y posteriormente la inhibe. En este caso el complejo está en un estado de oxidación +3, por lo que puede reducirse a +2 y regenerar la forma inactiva de la enzima (forma reducida), que se forma cuando la glucosa oxidasa reacciona con la glucosa.

Este proceso de oxidación de glucosa normalmente lo hace el oxígeno, pero la constante de velocidad de regeneración de la enzima es mayor con el complejo organometálico. Por ello primero se observa la activación de la reacción, hasta que el complejo organometálico se reduce totalmente, posteriormente como en los casos de los complejos **1a** y **2a** se observa la inhibición de la reacción [48].

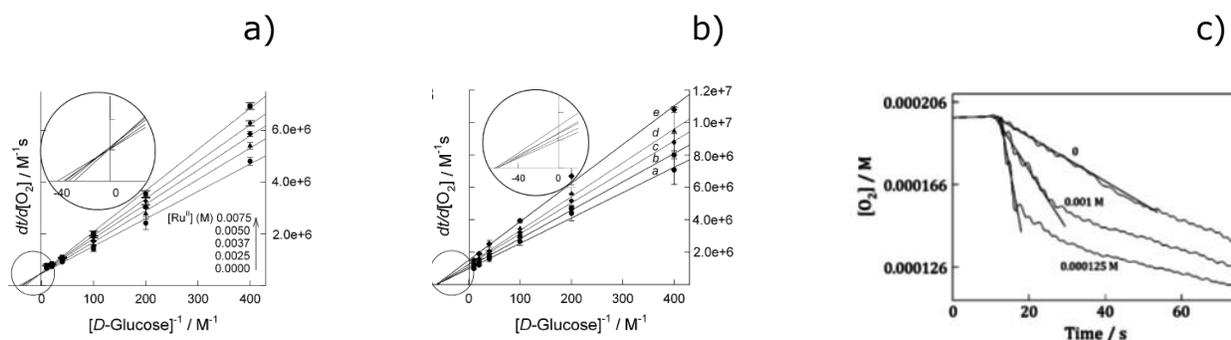


Figura 20. Gráficas de Lineweaver-Burk de la oxidación de la glucosa. a) Inhibición enzimática competitiva de GO del complejo **1a**; b) Inhibición no competitiva de GO por **2a**; c) activación de la GO por **3a** [48].

De manera complementaria se deseaba obtener los datos de la influencia que pudieran tener los complejos de osmio sobre la glucosa oxidasa y si era posible medirlos de la misma forma que los complejos de rutenio. Es por ello que en este trabajo se muestra el estudio de la interacción de los complejos de osmio con la glucosa oxidasa.

2.5.2 LACTATO DESHIDROGENASA

La enzima lactato deshidrogenasa (LDH) se expresa en una gran cantidad de mamíferos, en humanos tiene un peso aproximado de 140 KDa, con cinco diferentes isoformas, debido a que es un tetrámero compuesto de dos diferentes subunidades, LDH-A y LDH-B también conocidos como LDH-M y LDH-H respectivamente. Las isoformas que podemos encontrar son LDH(A₄), LDH(A₃B), LDH(A₂B₂), LDH(AB₃), LDH(B₄). Todas las isoformas tienen un rol diferente, por ejemplo LDH(A₄) se encuentra principalmente en el músculo esquelético y tiene una alta afinidad por reducir piruvato en L-lactato, mientras que LDH(B₄) se encuentra principalmente en el corazón y preferentemente oxida L-lactato en piruvato, las otras isoformas tienen características de ambas LDH(A₄) y LDH(B₄) [49].

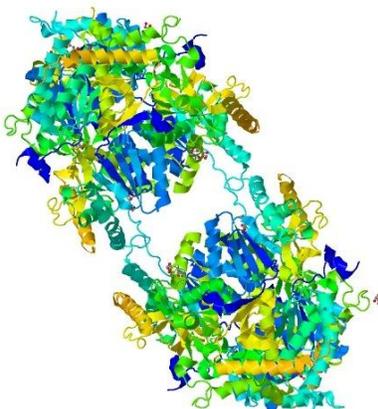
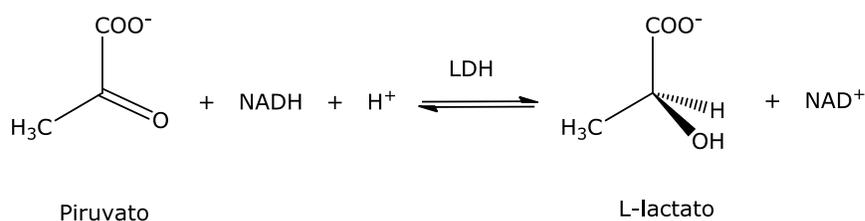


Figura 21. Imagen de la Lactato deshidrogenasa, donde se muestran los diferentes dominios de la enzima. Obtenida del Protein Data Bank.

La LDH cataliza de forma simultánea y estereoespecífica la reacción de reducción de piruvato a L-lactato, utilizando como cofactor NADH (nicotinamida adenina dinucleótido, en su forma reducida) que se oxida a NAD^+ (nicotinamida adenina dinucleótido, en su forma oxidada). También puede catalizar la reacción inversa, es decir, la oxidación de L-lactato a piruvato, pasando de NAD^+ a NADH. Esta reacción puede ser monitoreada por espectroscopía UV-Vis de forma continua a 340 nm, debido a que el NADH tiene una banda de absorción a esta longitud de onda. Esto permite monitorear la cinética de reacción en ausencia y presencia de los complejos organometálicos, y determinar la interacción de estos con la enzima.



Ecuación 7. Reacción estereoespecífica de conversión de piruvato a L-lactato, oxidando NADH a NAD^+ como cofactor. La reacción puede llevarse a cabo en el sentido inverso.

Esta oxidorreductasa ha sido relacionada con enfermedades como la malaria [50] y algunos tipos de cáncer [51]. Sin embargo, su relación con procesos cancerígenos es más estrecha de lo que se había pensado. En el año de 1956 se descubrió el efecto Warburg, el cual consiste en obtener energía por la rápida conversión de glucosa a L-lactato en condiciones aeróbicas [52]. En condiciones aeróbicas en una célula sana se obtienen 38 ATP de energía por

cada molécula de glucosa, siguiendo la vía de la fosforilación oxidativa, mientras que, en condiciones anaeróbicas sólo se obtienen 2 ATP de energía. Es decir las células cancerígenas prefieren obtener energía de la conversión de glucosa en L-lactato por la vía de la glucólisis, que obtener energía de la fosforilación oxidativa.

Se ha visto que la sobre expresión de LDH puede favorecer el desarrollo de ciertos tumores [53]. Por otro lado, la disminución de la expresión de LDH estimula la respiración mitocondrial y de esta forma la capacidad de reproducción de las células cancerígenas disminuye [54].

La conversión de glucosa en L-lactato tiene varias aristas, como la alteración de los niveles normales de LDH, que dirige a la formación de especies reactivas de oxígeno. El medio extracelular se acidifica porque la célula expulsa ácido láctico del interior de las células, esto promueve factores de respuesta a la inflamación, que atraen macrófagos (células que degradan material celular), los cuales secretan sustancias que promueven el desarrollo celular y la metástasis.

Algunos grupos de investigación han abordado el tema, tratando de encontrar inhibidores de la LDH para utilizarlos como agentes anticancerosos. Por ejemplo, el gossypol, un producto natural hallado en la semilla del algodón es un inhibidor que bloquea la unión de NADH al sitio activo, con una constante de inhibición de 1.9×10^{-6} M y de 1.4×10^{-6} M para LDH-A y LDH-B respectivamente. Un derivado de gossypol, el FX-11, se sintetizó para actuar como agente anticanceroso teniendo actividad antitumoral con una constante de inhibición para LDH de 0.05×10^{-6} M y 20×10^{-6} M para LDH-A y LDH-B respectivamente, siendo mucho mayor la actividad antitumoral para LDH-A. Otros ejemplos como el galloflavin, el cual presenta actividad citotóxica induciendo la apoptosis en carcinoma hepatocelular, el N-hidroxiindol presenta actividad anticancerígena en diferentes tipos de cáncer como el de ovario, colorrectal, pancreático y ambos inhiben de manera considerable la LDH, como se muestra en la tabla 2 [55].

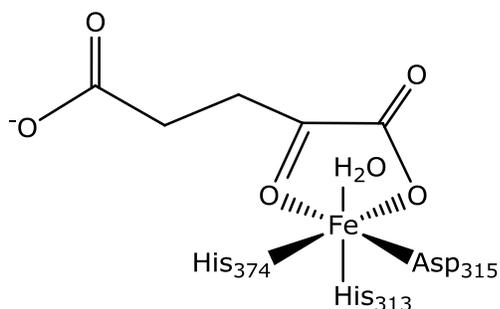
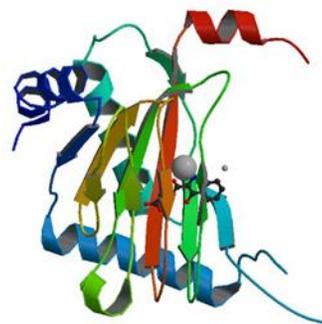
Tabla 2. Inhibidores de la LDH [55].

Compuesto	Enzima	Constante de inhibición (μM)
Gossypol	LDH-A	1.9
	LDH-B	1.4
FX-11	LDH-A	0.05
	LDH-B	20
Galloflavin	LDH-A	5.4
	LDH-B	15.6
N-hidroxiindol	LDH-A	5-10

La obtención de parámetros cinéticos, como la constante de inhibición, podrían sugerirnos si la actividad anticancerígena está directamente relacionada con la LDH y así poder entender el papel de los complejos ciclometalados dentro de las células cancerígenas.

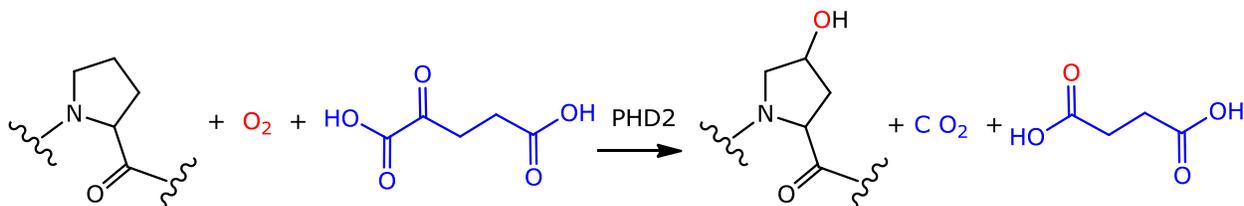
2.5.3 PROLIL HIDROXILASA 2 (PHD2)

La enzima prolil hidroxilasa 2 es una enzima de un peso de 40 KDa, con 426 aminoácidos. El sitio activo se localiza entre dos hojas β , y consta de un átomo de Fe(II), coordinado de forma octaédrica por His-313, His-374, Asp-315, 2-oxoglutarato (2-OG) y una molécula de agua [56].

**Figura 22.** Sitio activo de la PHD2.**Figura 23.** Estructura cristalina de PHD2 humana, obtenida del Protein Data Bank.

En humanos son conocidas tres enzimas prolil hidroxilasas (PHD's), PHD1/EGLN2/HPH3, PHD2/EGLN1/HPH2 y PHD3/EGLN3/HPH1. Estas enzimas regulan los niveles de la subunidad α del factor de hipoxia inducido (HIF-1 α),

ya que catalizan la reacción de hidroxilación de los residuos de prolina de HIF-1 α . Para llevar a cabo esta reacción se necesita O₂ y 2-oxoglutarato como cosustratos [56].



Ecuación 8. Reacción de hidroxilación de la proteína HIF-1 α por la enzima PHD2, utilizando oxígeno molecular y 2-oxoglutarato [56].

En la hidroxilación de los residuos de prolina del HIF-1 α se tienen diferentes estados de oxidación del hierro. En la primera parte del mecanismo se propone la coordinación del oxígeno al hierro, pasando de Fe(II) a Fe(III), posteriormente pasa a un estado de oxidación Fe(IV) formando un enlace C-O. En un siguiente paso, se pierde CO₂ y se rompe el enlace O-O y se reduce el Fe(IV) a Fe(III). En un último paso la prolina es hidroxilada, reduciendo el Fe(III) a Fe(II), regenerándose así el sitio activo de la enzima, como se muestra en la figura 24 [57].

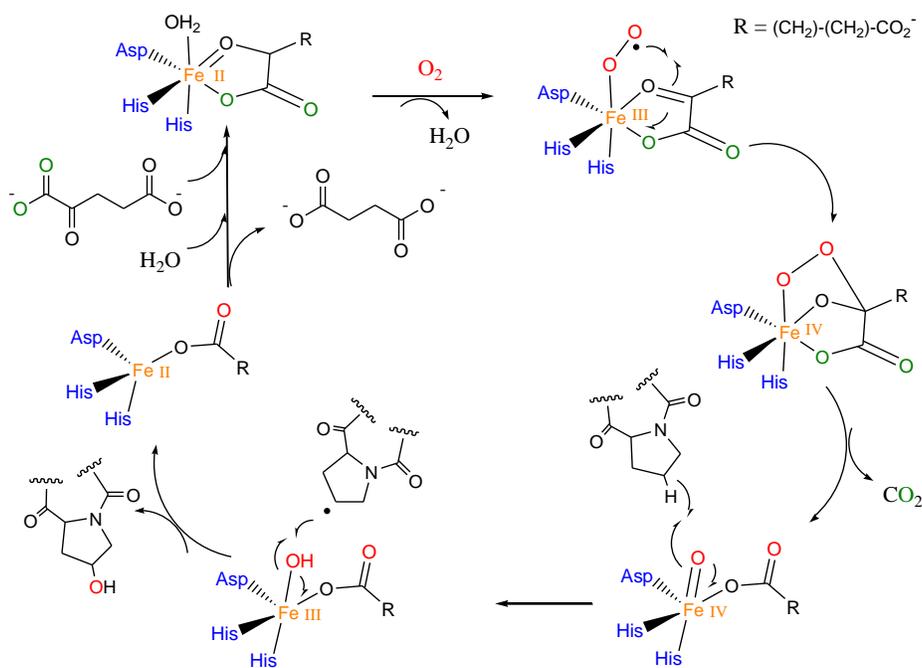


Figura 24. Mecanismo de reacción propuesto para la hidrólisis de residuos de prolina por la enzima PHD2 [57].

El HIF-1 es una heteroproteína compuesta de dos subunidades, la subunidad β (HIF-1 β) y la subunidad α (HIF-1 α , HIF-2 α e HIF-3 α). El factor de hipoxia inducido tiene diferentes dominios cada uno encargado de llevar a cabo diferentes funciones. Por ejemplo, un dominio encargado de dimerizar las subunidades α y β , para facilitar la unión hacia ADN cuando el HIF-1 α no es degradado y entra al núcleo. Tiene un dominio que sirve como sensor de señal, en este caso hacia el oxígeno. Además HIF-1 α e HIF-2 α contienen el dominio ODD que es donde se hidroxila la prolina para regular la concentración de oxígeno en las células. Tiene dominios encargados de la regulación de diversos genes [58]. Así como un dominio encargado de unirse a la maquinaria celular que lleva a cabo la degradación de proteínas.

En normoxia (condiciones normales de O₂) el HIF-1 α tiene una vida media de aproximadamente 5 minutos [59] debido a que rápidamente es hidroxilado en las prolinas 402 y 564 en el dominio dependiente de oxígeno por la PHD2. Posteriormente el HIF-1 α hidroxilado es reconocido por el sistema de degradación de proteínas, el cual degrada el HIF-1 α hidroxilado para evitar su acumulación dentro de la célula.

Sin embargo, en condiciones de hipoxia (baja concentración de O₂) se retarda la degradación de HIF-1 α , acumulándose para formar un heterodímero en el núcleo con HIF-1 β , uniéndose a los elementos de respuesta de la hipoxia, afectando la transcripción de una gran cantidad de genes (figura 25) [60].

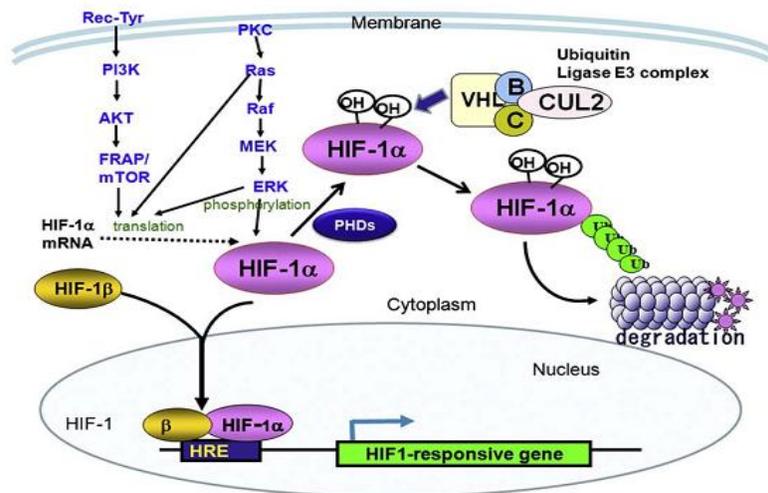


Figura 25. Esquema de las posibles vías metabólicas del factor de hipoxia inducido, HRE (elementos de respuesta de la hipoxia), VHL (proteína von Hippel-Lindau) [60].

El factor de hipoxia inducido tiene un papel fundamental en la respuesta a la baja concentración de O_2 , ya que regula la expresión de una gran variedad de genes, cuyos productos participan en procesos como la angiogénesis, el metabolismo energético, la eritropoyesis y la proliferación celular [61]. Diversos estudios indican que existe una relación estrecha entre el cáncer y el HIF-1 α , debido a que los mecanismos que regulan su expresión se encuentran alterados en las células tumorales [60][61][62].

La baja concentración de O_2 altera la homeostasis de la célula, lo que conduce a la activación HIF-1 α . En la mayoría de los tumores primarios de cerebro, páncreas, mama, colon, ovario, pulmón y próstata, y sus metástasis, se detectan altos niveles de HIF-1 α comparados con los tejidos normales o tumores benignos [62].

Hay diversos genes que pueden ser activados por el factor de hipoxia inducido, y que participan en diversos procesos, siendo más de 150 genes que pueden ser activados por HIF-1 α .

La proteína HIF-1 α controla el metabolismo de la glucólisis, también de la enzima LDH, por lo que el estudio de la enzima PHD2 y la proteína HIF-1 α , podría ser la clave para entender y complementar el estudio de estas enzimas oxidorreductasas en la búsqueda del mecanismo de acción de los complejos ciclometalados. Además por la gran cantidad de genes que pueden ser modificados por PHD2 e HIF-1 α se especula que los complejos organometálicos pudieran afectar de forma directa en la actividad de la

enzima y así de forma indirecta modificar una gran cantidad de procesos, algunos de los cuales están relacionados con el cáncer y que son de vital importancia en la célula como la apoptosis, la proliferación celular, supervivencia celular.

Las vías metabólicas están relacionadas en una compleja red de enzimas y metabolitos, por lo que un pequeño cambio en una ruta metabólica podría significar un gran efecto en otra ruta distante. Por ello se desea obtener los parámetros cinéticos V_{\max} y K_M , para poder relacionar de qué forma pueden afectar los complejos organometálicos de rutenio y osmio a las reacciones de oxidorreducción que llevan a cabo las enzimas oxidorreductasas dentro de la célula.

2.5.4 PROTEÍNAS DISULFURO ISOMERASAS (PDI)

La familia de enzimas conocidas como proteínas disulfuro isomerasas (PDI) comprende alrededor de 21 enzimas, que varían en expresión, localización y función. Estas 21 enzimas pertenecen a una superfamilia llamada tiorredoxinas la cual incluye a las enzimas glutarredoxinas, TRXs, ferroredoxinas y peroxirredoxinas. La característica que une a la familia de las enzimas PDI es la presencia del dominio tiorredoxina [63]. Estas enzimas tienen un dominio catalítico a y un dominio inactivo b [64][65].

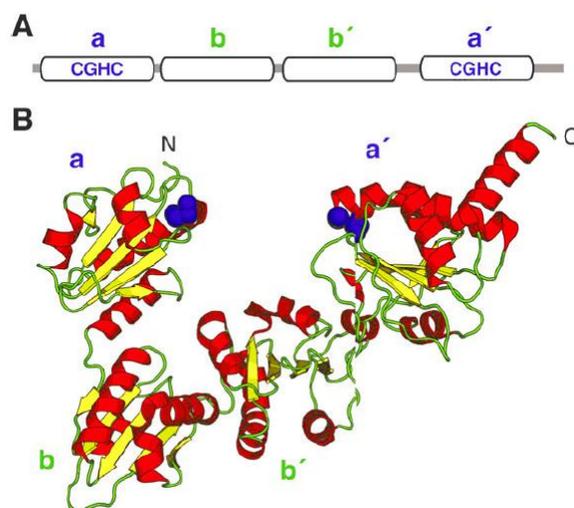


Figura 26. La estructura tridimensional de la enzima P4HB (PDI). En rojo se muestran las α helices, en amarillo las hebras β y en verde los bucles. Los sitios activos de los dominios a y a' se muestran como esferas en color azul [65].

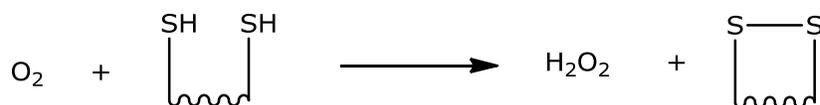
Tabla 3. Listado de enzimas PDI.

Enzima	Otros nombres	Sitio activo	AA
AGR2	XAG-2, HAG-2, AG2, PDIA17	CPHS	175
AGR3	HAG3, hAG-3, BCMP11, PDIA18	CQYS	166
CASQ1	PDIB1	na	396
CASQ2	PDIB2	na	399
ERdj5	MTHr, DNAJC10	CSHC, CPPC, CHPC, CGPC	793
ERP27	FLJ32115, ERp27, PDIA8	na	273
ERP29	ERp28, ERp31, ERp29, PDI-DB, PDIA9	na	261
ERP44	KIAA0573, PDIA10	CRFS	406
PDI	P4HB, DIA1, PROHB, DSI, GIT, PO4HB, P4Hb	CGHC, CGHC	508
PDIA2	PDA2, PDIP	CGHC, CTHC	525
PDIA3	P58, ERp61, ERp57, ERp60, GRP57, PI-PLC, HsT17083	CGHC, CGHC	505
PDIA4	ERP70, ERP72	CGHC, CGHC, CGHC,	645
PDIA5	PDIR, FLJ30401	CSCM, CGHC, CPHC	519
PDIA6	P5, ERp5	CGHC, CGHC	440
PDILT	PDIA7, ERp65	SKQS, SKKC	584
TMX1	TMX, PDIA11	CPAC	280
TMX2	PDIA12	SNDC	296
TMX3	FLJ20793, KIAA1830, PDIA13	CGHC	454
TMX4	DJ971N18.2, KIAA1162, PDIA14	CPSC	349
TXNDC5	MGC3178, FLJ21353, FLJ90810, EndoPDI, Hcc-2, ERp46, PDIA15	CGHC, CGHC, CGHC	432
TXNDC12	TLP19, ERP18, ERP19, hAG-1, AGR1, PDIA16	CGHC	172

AA = aminoácidos; n.a. = no aplica [63][65].

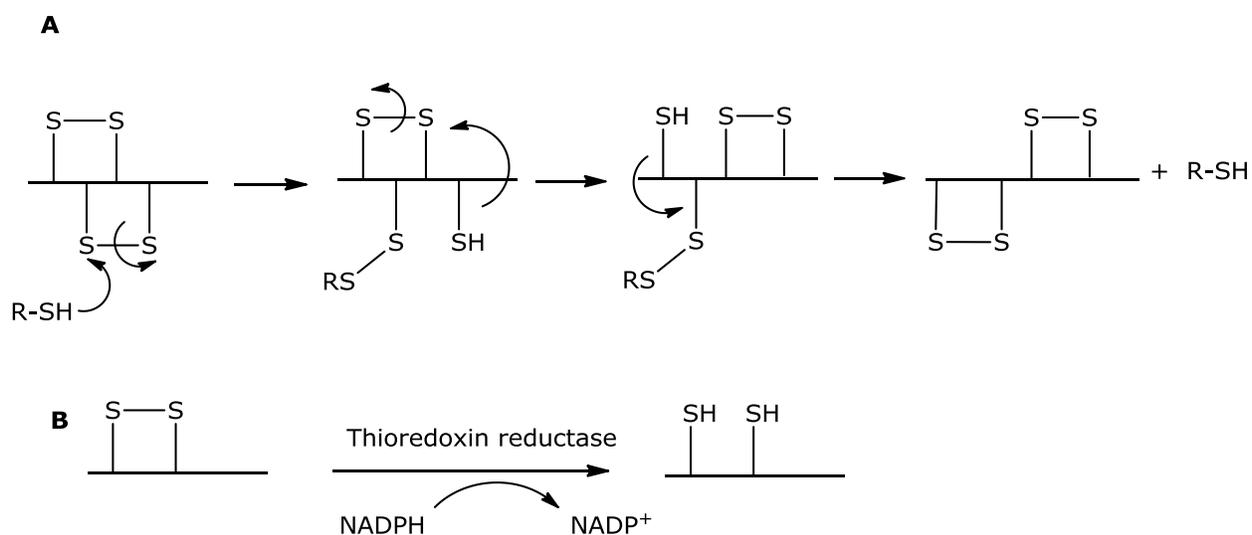
Las PDI son una familia de enzimas oxidoreductasas con múltiples funciones en el cuerpo humano, entre las que se encuentran la formación y ruptura de enlaces disulfuro, la isomerización de enlaces disulfuro y tienen la capacidad de plegar proteínas como una chaperona. Es una familia de enzimas muy

versátil que se encuentran en el retículo endoplásmico [64]. Una de las funciones primordiales de las enzimas PDI es la formación de enlaces disulfuro (S-S), estos enlaces se forman entre dos grupos tiol (-SH) de dos residuos de cisteína en las proteínas recién formadas [64]. Este proceso es vital para el adecuado plegamiento de las proteínas.



Ecuación 9. Reacción de la formación de un enlace disulfuro entre los grupos tiolato de dos cisteínas [65].

Para la corrección de enlaces S-S, puede darse de dos formas. Una es como isomerasa, donde existe un reacomodo en los enlaces S-S por medio de un ataque nucleofílico de un tiol a un enlace disulfuro. La segunda opción es por medio de un proceso redox utilizando un donador de electrones. Cabe mencionar que la familia de las PDI tiene una gran semejanza con la enzima tiorredoxina tanto en la secuencia como en la estructura, ambos grupos de enzimas tienen dominios tiorredoxina involucrados en reacciones de intercambio de enlaces disulfuro.



Ecuación 10. A) Isomerización del enlace S-S. **B)** Reducción del enlace azufre utilizando un donador de electrones [66].

Una de las causas de varias enfermedades es el incorrecto plegamiento de proteínas, lo cual dirige a enfermedades como la diabetes, el síndrome de Alzheimer, el mal de Parkinson y enfermedades en el hígado [63]. De forma más reciente se ha relacionado a esta familia de enzimas con el cáncer [67][68][69][70]. Por ejemplo se sabe que PDIA6 promueve la separación de tumores asociados a proteínas por la reducción de enlaces disulfuro en la superficie del tumor [70]. Kullman y colaboradores estudiaron el efecto de PDIA1 y PDIA3 sobre la resistencia del *cis*-platino en cáncer de ovario, aunque es un estudio preliminar, PDIA1 surge como un nuevo blanco molecular en quimioterapia [68]. Se estudió la expresión genética de PDI en diferentes tipos de cáncer, comparando con los tejidos sanos. Se observó que hay una sobreexpresión en cáncer de cerebro, linfoma, riñón, ovario, próstata, pulmón. La relación de la enzima en el cáncer fue confirmada por expresión proteica, encontrando la sobreexpresión de proteína en adenocarcinoma de próstata, carcinoma de pecho en mujer y hombre, en metástasis de cáncer gástrico y de pecho [69].

Es por ello que surge el interés de estudiar el efecto de esta familia de enzimas con algunos complejos organometálicos dentro del retículo endoplásmico que es el orgánulo alberga la familia de enzimas PDI [71]. En este caso es de particular interés relacionar el potencial de óxido reducción de las enzimas PDI con el potencial redox de los complejos organometálicos. Por ejemplo el potencial de oxidorreducción de la enzima PDI es de -180 mV [72], mucho más alto que los péptidos o proteínas sin plegar sobre los cuales lleva a cabo las reacciones de óxido reducción.

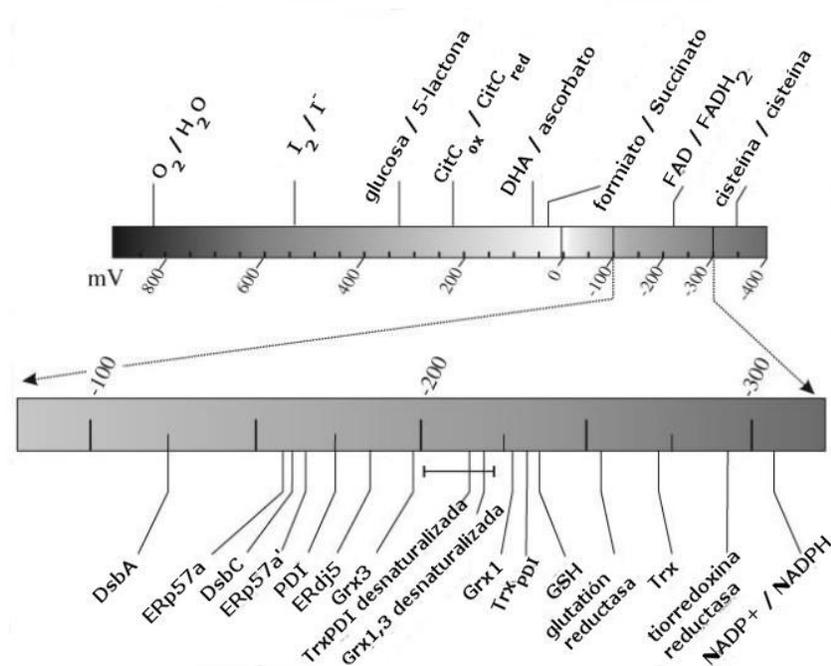


Figura 27. Tabla de potenciales de óxido reducción de diferentes enzimas y cofactores.

Una de las principales funciones del retículo endoplásmico, orgánulo donde se encuentran las enzimas PDI, es la síntesis de proteínas. Sin embargo, en ocasiones surgen algunos problemas con este proceso y se activan mecanismos de degradación de proteínas. Se ha descrito que cuando la capacidad de los mecanismos de degradación de proteínas se ve superada existe la posibilidad de formar cuerpos de inclusión en agregados de proteínas llamados agresomas [73]. Estos pueden generarse por diferentes situaciones. Una de ellas es el estrés celular, asociado a la formación de especies reactivas de oxígeno. La formación y acumulación de agresomas puede dirigir a la muerte celular, lo cual podría ser una de las vías de acción de los complejos organometálicos al ser generadores de especies reactivas de oxígeno. Los agresomas pueden moverse a través de microtúbulos para formar conglomerados más grandes, es decir, agregados de agregados de proteínas.

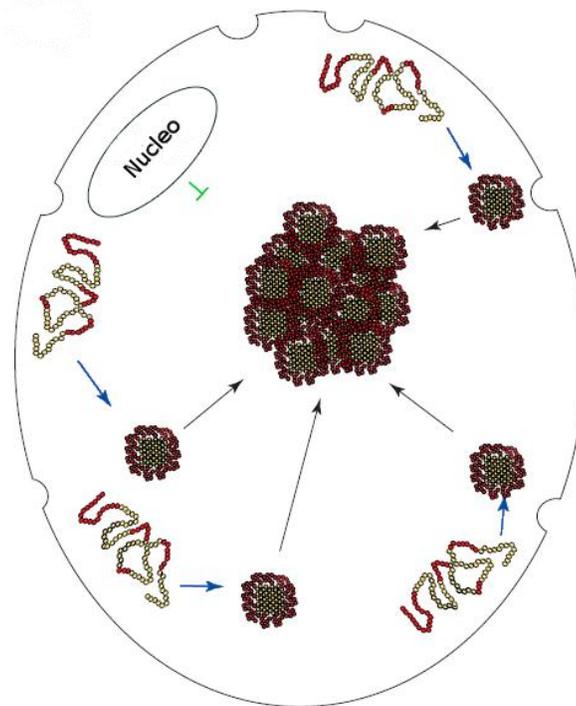


Figura 28. Se muestra la formación de un agregado de proteína en el retículo endoplásmico, causado por fallas en la formación de proteínas y como éste puede formar un agregado de agregados de proteína.

Debido a que por diversas investigaciones se ha demostrado el impacto que tienen las enzimas dentro de los procesos cancerígenos, es deseable estudiar el efecto de los complejos organometálicos frente a enzimas redox. El análisis cinético de las diversas enzimas permitiría conocer el grado de interacción que hay entre los complejos y las oxidoreductasas, para así determinar la importancia que tiene determinada enzima en la actividad anticancerosa de los complejos ciclometalados polipiridínicos de rutenio y osmio.

3.0 HIPÓTESIS

3.0 HIPÓTESIS

Dada la alta capacidad de los complejos ciclometalados de rutenio y osmio en intercambiar electrones con varias enzimas redox, se puede esperar que estos compuestos interactúen con oxidorreductasas involucradas en procesos cancerígenos. El estudio de estas interacciones permitirá obtener datos importantes sobre la actividad de los complejos de rutenio y osmio en sistemas biológicos.

4.0 OBJETIVOS

4.0 OBJETIVOS

El objetivo general del presente proyecto es evaluar de qué manera los derivados de rutenio y osmio pueden interactuar y regular la actividad de enzimas así como, determinar cuáles son los factores fisicoquímicos que controlan la actividad biológica de los complejos ciclometalados.

Los objetivos particulares son:

- *Estudiar por diferentes métodos (espectroscópicos, electroquímicos) la interacción de complejos ciclometalados de rutenio y osmio con enzimas redox.*
- *Evaluar una relación estructura/reactividad entre las propiedades fisicoquímicas de los complejos (por ejemplo el potencial redox) y su actividad biológica.*

5.0 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.0 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En esta sección se analizarán los resultados obtenidos al estudiar el impacto de los complejos organometálicos de rutenio y osmio sobre las enzimas oxidorreductasas GO, LDH, PHD2 y la familia de las enzimas PDI. Para ello primero se analizó la estabilidad de los complejos organometálicos en diferentes disolventes, utilizando un espectrofotómetro de UV-Vis. También se realizaron ensayos sobre la línea celular HCT116 utilizando diferentes compuestos organometálicos de rutenio y osmio.

Se decidió analizar el estudio de cada enzima por separado, empezando por la glucosa oxidasa, posteriormente la lactato deshidrogenasa, la prolil hidroxilasa y al último el análisis de las enzimas proteínas disulfuro isomerasas. Cabe mencionar que los ensayos en células cancerígenas se realizaron como parte de una estancia de investigación en la Universidad de Estrasburgo en Francia, bajo la tutela del Dr. Christian Gaidon y su grupo de trabajo dedicado a estudiar mecanismos de respuesta molecular hacia el estrés celular.

5.1 ESTABILIDAD COMPLEJOS ORGANOMETÁLICOS

En la figura 29 se muestran los compuestos de rutenio y osmio con los que se trabajó en este proyecto. Los compuestos **1a**, **2a** y **3a** se prepararon con rutenio y los compuestos **1b**, **2b** y **3b**, se prepararon con osmio, los compuestos **4**, **5** y **6** sólo se prepararon con osmio y los compuestos **Ru-29**, **Ru-34** y **Ru-43** sólo se prepararon con rutenio.

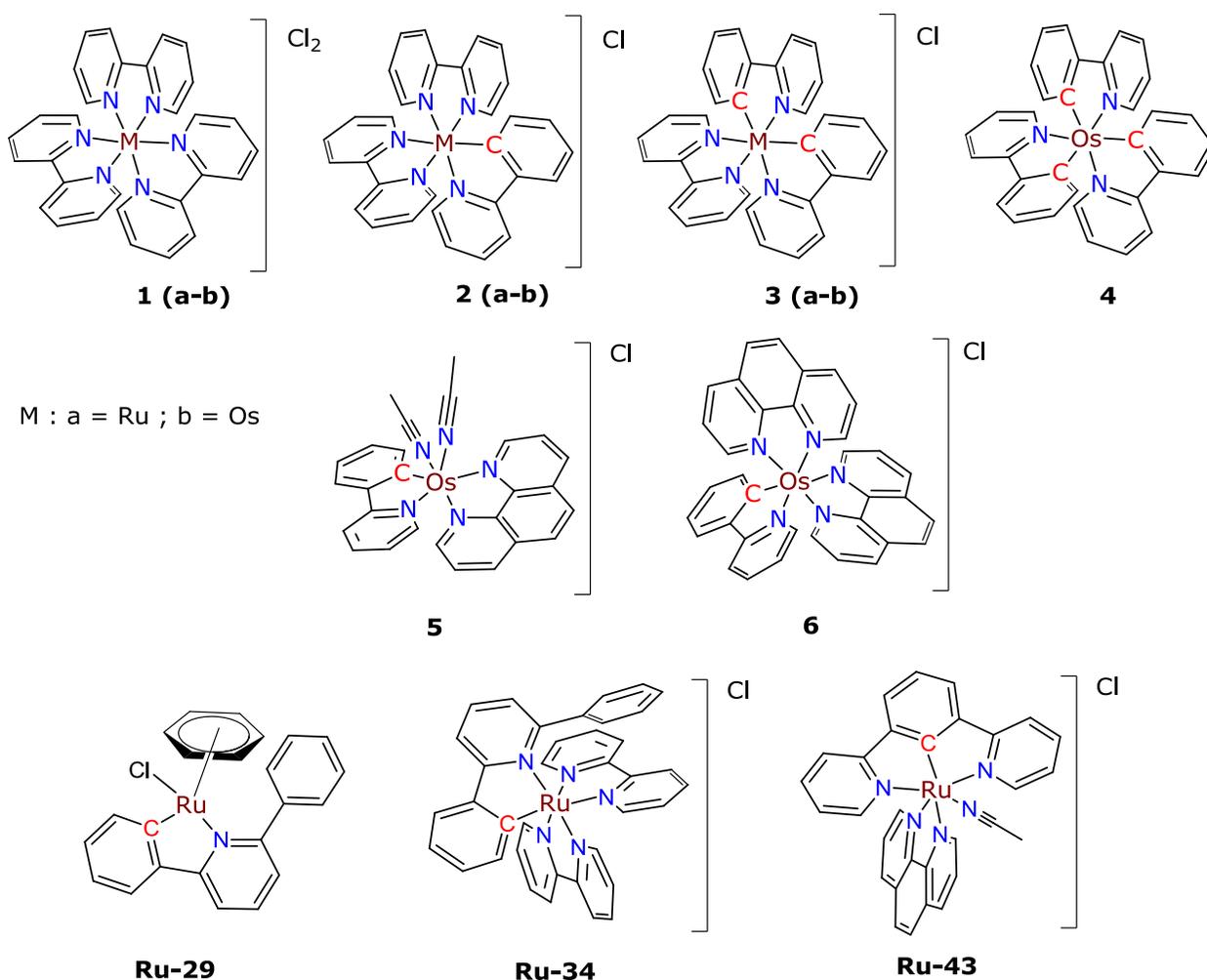


Figura 29. Estructuras de rutenio y osmio utilizadas en este proyecto.

Se estudió la estabilidad de los complejos organometálicos de rutenio y osmio **1a**, **2a**, **3a**, **1b**, **2b**, **3b**, **4**, **5** y **6** en H₂O y DMSO durante 48 horas utilizando 1×10^{-4} M de los compuestos.

Los complejos presentan estabilidad al menos hasta las 48 horas como se muestra en la figura 30, debido a que los espectros de UV-Vis son prácticamente los mismo, indicativo de que el compuesto no reacciona. Excepto el complejo **3a**, el cual presenta descomposición en ambos disolventes antes de las 48 horas, debido a que los espectros de UV-Vis cambian con el tiempo, como se muestra en la figura 31. Debido a esto se monitoreó hasta las 72 horas para obtener el orden de reacción de la descomposición, así como el tiempo de vida media del compuesto. Para ello se utilizó el método de la integral, obteniéndose que para ambos disolventes la ecuación de segundo orden ($[A]^{-1} - [A_0]^{-1} = kt$) [45] es la que más se ajusta a la descomposición del compuesto. Cuando se utiliza H₂O el tiempo de vida media es 6.6×10^5 s y cuando se utiliza DMSO el tiempo de vida media es 5.3×10^5 s.

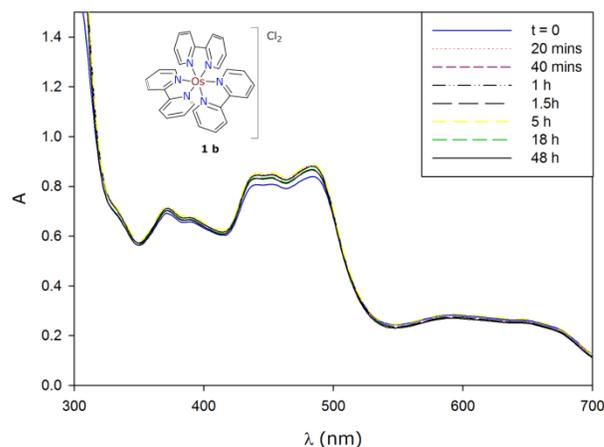


Figura 30. Espectro de UV-Vis donde se muestra la estabilidad del complejo $[\text{Os}(\text{bpy})_3]\text{Cl}_2$ **1b** en DMSO durante 48 horas.

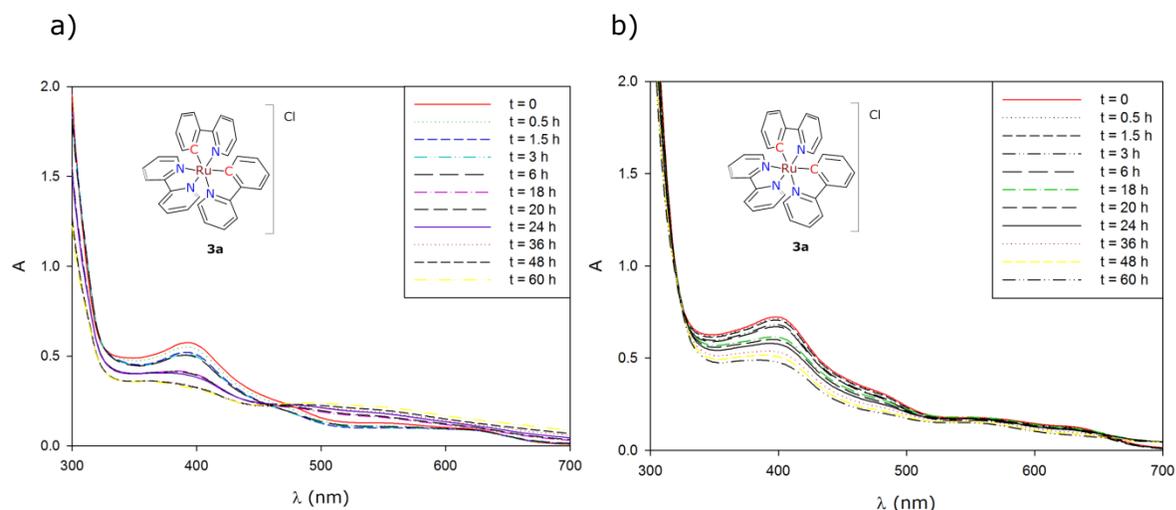


Figura 31. Espectro de UV-Vis donde se muestra la estabilidad del complejo $[\text{Ru}(\text{phpy})_2(\text{bpy})]\text{Cl}$ **3a** en a) agua; b) DMSO.

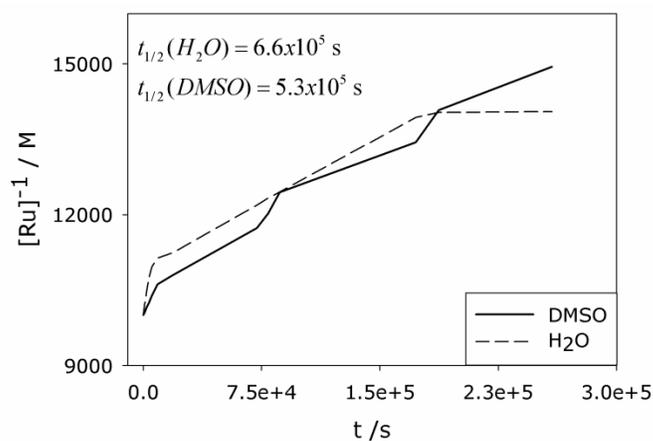


Figura 32. Gráfica para obtener el tiempo de vida media del complejo **3a** para una cinética de segundo orden por el método de la integral, utilizando los disolventes H_2O y en DMSO.

En la tabla 4 se resume el estudio de la estabilidad de los compuestos en H_2O y en DMSO, así como la longitud de onda para cada máximo de absorción (ϵ) para los diferentes compuestos. En el caso del compuesto **3a** se obtuvo la constante de velocidad de descomposición para H_2O $k = 0.016 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ y DMSO $k = 0.019 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, para una cinética de segundo orden.

Debido a la baja solubilidad de los compuestos de rutenio y osmio en agua, se disuelven primero en 10% de metanol, para posteriormente agregar agua para completar el volumen deseado. Para el compuesto **4** se agregó DMSO (10%) para solubilizar el complejo. Sin embargo, no se pudo medir la

estabilidad en H₂O debido a la poca solubilidad del compuesto en este disolvente, disminuyendo la absorbancia del compuesto por la precipitación en la celda de trabajo. A pesar de esto, en DMSO es soluble y es estable a las 48 horas.

El único compuesto que presenta descomposición en disolución es el **3a**, aunque en sólido es estable al aire. Debido a que la estructura del complejo es con ligantes bidentados no es muy factible una reacción de sustitución de ligante. Este es un compuesto de rutenio(III) a 17 electrones, por lo que pudiera reaccionar consigo mismo en una reacción de óxido reducción de forma $2Ru \rightarrow P$, acorde con lo obtenido para una reacción de segundo orden.

Tabla 4. Estabilidad de los complejos de rutenio y osmio en agua y DMSO.

Complejo	Estabilidad	
	H ₂ O	DMSO
1a	< 48 h	< 48 h
2a	< 48 h	< 48 h
3a ^ξ	$k = 0.016 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$	$k = 0.019 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$
1b	< 48 h	< 48 h
2b	< 48 h	< 48 h
3b	< 48 h	< 48 h
4	*	< 48 h
5	< 48 h	< 48 h
6	< 48 h	< 48 h

ξ = Constante de velocidad de descomposición de segundo orden.

*Problemas de solubilidad (precipita).

5.2 ACTIVIDAD CITOTÓXICA

Se midió la actividad citotóxica de los compuestos de rutenio y osmio en diferentes líneas de células cancerígenas, HCT116 cáncer de colon y adenocarcinoma humano AGS, obteniendo la concentración a la cual un compuesto puede inhibir la proliferación celular en un 50%, usualmente llamada IC_{50} .

En la figura 33 se muestra una imagen tomada en el microscopio de las células HCT116 a diferentes grados de confluencia (espacio entre células).

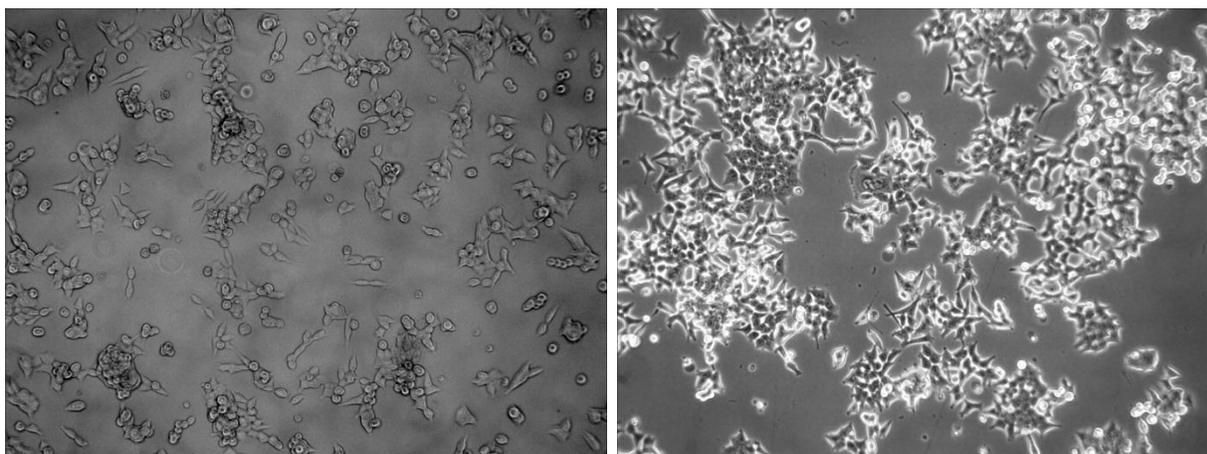


Figura 33. Imágenes obtenidas en el microscopio de las células HCT116.

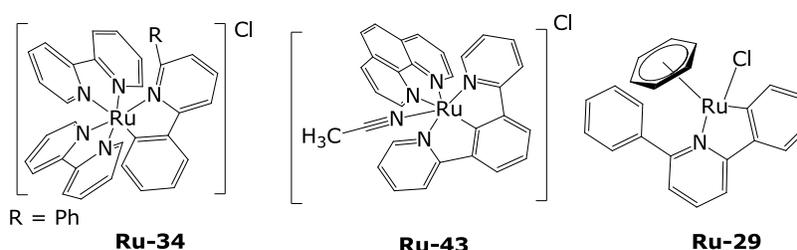


Figura 34. Complejos ciclometalados de rutenio utilizados con la línea celular HCT116 cáncer de colon y adenocarcinoma humano AGS [74].

Se utilizaron de forma adicional los compuestos **Ru-34**, **Ru-43** y **Ru-29** debido a que contienen un enlace ciclometalado pero con una modificación en su estructura comparado con los anteriormente mencionados.

Podemos observar las similitudes y diferencias en su actividad citotóxica, mientras que los compuestos que tienen ligantes polipiridínicos **Ru-34** y **Ru-43** tienen una actividad anticancerosa similar a los compuestos **1-6**, el compuesto tipo piano stool **Ru-29** con ligantes lábiles tiene una actividad citotóxica mucho menor a los demás.

Los compuestos **Ru-34** y **Ru-43** son estables hasta las 48 horas, el compuesto **Ru-29** se descompone antes de las 12 horas en DMSO y H₂O, probablemente por los ligantes lábiles, en donde puede sufrir reacciones de sustitución de ligante. En el caso de los complejos **Ru-29** y **Ru-34** podemos observar que tienen coordinado el ligante 2,6-difenilpiridinato, la reactividad es muy diferente a pesar de tener coordinado el mismo ligante. Esto nos demuestra la importancia de toda la esfera de coordinación, la cual le proporciona un diferente mecanismo de acción de citotoxicidad al compuesto, lo cual se pone en evidencia ya que **Ru-34** es casi 30 veces más citotóxico que **Ru-29**.

Los potenciales redox cambian significativamente, mientras que para **Ru-29** es 830 mV vs Ag/AgCl, para **Ru-34** es 520 mV vs Ag/AgCl [74], utilizando acetonitrilo como disolvente. Entre los complejos **Ru-34** y **Ru-43** también hay modificaciones estructurales, pero a pesar de esto no tienen un gran impacto sobre la citotoxicidad ya que sus valores son muy cercanos. Ambos son estables en H₂O y DMSO, y sus valores del potencial redox son relativamente cercanos **Ru-34** 520 mV y **Ru-43** 570 mV vs Ag/AgCl respectivamente, utilizando acetonitrilo como disolvente. En este caso la modificación de los ligantes no es tan significativa, ambos con ligantes bidentados polipiridínicos y en el caso de **Ru-43** con un ligante nitrogenado monodentado. El fragmento ciclometalado también cambia pero no afecta a la citotoxicidad.

Por otro lado, los compuestos tipo piano stool, han sido estudiados por Dyson y Sadler en diferentes líneas celulares, algunos de estos compuestos tienen un IC₅₀ cercano a los valores para *cis*-platino [75]. Recientemente Gaiddon y colaboradores han trabajado en este tipo de compuestos de rutenio llamados RAS [76][77]. El compuesto **RAS 1** (figura 35) es un análogo estructural de **Ru-29**, con ligantes nitrogenados bidentados, además de cloro y un areno coordinado η^6 , donde el centro metálico se encuentra en un estado de oxidación 2-. En el caso de **Ru-29** es un complejo neutro a 18 electrones mientras que **RAS 1** es catiónico. Una de las diferencias es que el

ciclo que se forma con el ligante bidentado no es ciclometalado. Cuando comparamos su actividad anticancerosa observamos que **Ru-29** tiene un IC_{50} de 108 μM mientras que para **RAS 1** es de 288 μM , el compuesto **Ru-29** es 3 veces más citotóxico que **RAS 1**. Cuando a este último compuesto se le modifica el areno, introduciendo grupos alquilo como el *p*-cimeno, hexametilbenceno etc, mejora sensiblemente la citotoxicidad. Cuando hay modificaciones sobre el ligante bidentado también mejorar la actividad anticancerosa, así como estabilizar el compuesto frente a reacciones de intercambio de ligante. Es así que para el compuesto **Ru-29** se puede variar tanto el areno como el ligante bidentado, tratando de mejorar su citotóxicidad.

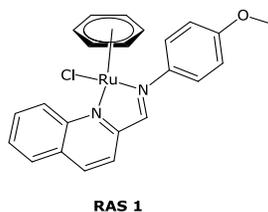


Figura 35. Estructura del compuesto de rutenio **RAS1** [77].

El IC_{50} se obtuvo utilizando el ensayo de metil tiazol tetrazolio o MTT, el cual es de color amarillo y se reduce por la acción de la enzima succinato deshidrogenasa en células vivas a formazan de color morado. La viabilidad celular se mide por la absorbancia del formazan siendo este una medida de las células vivas, usualmente cuantificado entre 500-600 nm. Para estos ensayos se utilizaron cajas con 96 pozos y conteniendo 1×10^5 células/mL.

En la figura 36 se muestran la viabilidad celular obtenida utilizando las líneas celulares HCT116 y AGS en tratamiento con el compuesto **Ru-43**, midiendo la absorbancia de formazan a diferentes concentraciones del compuesto organometálico.

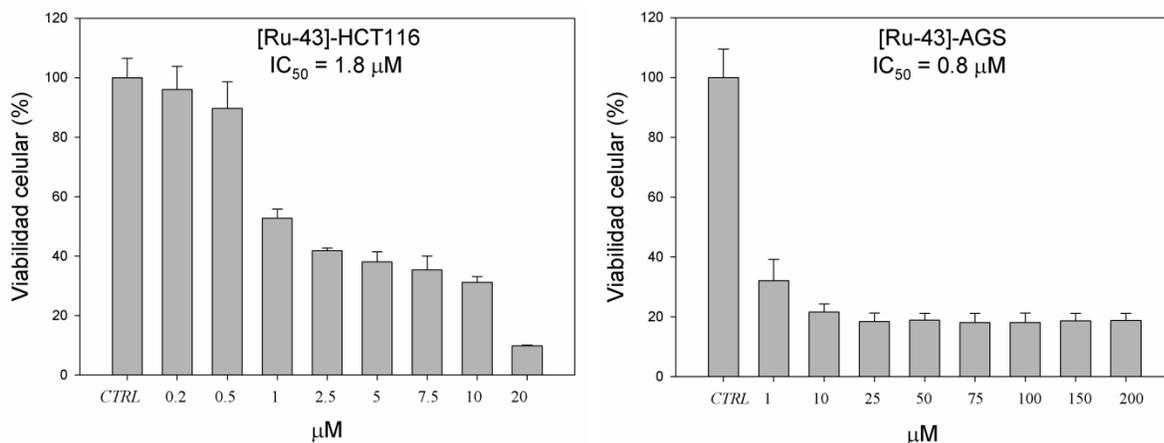


Figura 36. Viabilidad celular para el complejo **Ru-43** utilizando HCT116 cáncer de colon y adenocarcinoma gástrico humano AGS.

En la tabla 5 se compara la actividad anticancerosa de los compuestos **1a**, **2a**, **2b**, **Ru-34**, **Ru-43** y **Ru-29** utilizando las líneas celulares HCT116 cáncer de colon, adenocarcinoma humano AGS, utilizadas en su forma silvestre y adenocarcinoma gástrico KATOIII y cáncer de colon SW480, utilizadas con una modificación en la proteína p53 para inhibir su expresión.

De esta tabla se pueden observar que los compuestos que tienen ligantes polipiridínicos con un fragmento ciclometalado tienen una concentración de IC₅₀ cercano a 1 μM, contrario al compuesto **1a**, el cual no tiene un enlace ciclometalado a pesar de tener enlaces polipiridínicos. Por otro lado, la geometría también juega un papel importante. En el caso del compuesto **Ru-29** donde tiene una geometría diferente a los demás, con sólo tres ligantes, dos de ellos lábiles, tiene un IC₅₀ con la línea celular de HCT116 cáncer de colon muy diferente y casi 100 veces más grande que los ya mencionados. Comparando el complejo **Ru-29** con el complejo **1a**, observamos que el fragmento ciclometalado mejora la actividad citotóxica del compuesto.

Tabla 5. IC₅₀ para diferentes líneas celulares utilizando complejos ciclometalados de rutenio y osmio.

Compuesto	IC₅₀ [μM]			
	AGS	KATOIII	HCT116	SW480
1a	> 200	> 200	> 200	> 200
2a	1.4 ± 0.06	0.7 ± 0.04	0.3 ± 0.61	1.3 ± 0.42
2b			0.5 ± 0.03	
Ru-34	0.2 ± 0.03		3.2 ± 0.1	
Ru-43	0.8 ± 0.04		1.8 ± 0.1	
Ru-29			108.2 ± 0.6	

Los valores de citotoxicidad fueron similares en las líneas celulares silvestres HCT116 y AGS, que en las líneas celulares mutadas KATOIII y SW480. La supresión de la expresión de p53, una proteína capaz de causar la interrupción de la proliferación celular cuando hay un daño en el ADN. Promoviendo la muerte celular por apoptosis y que en diferentes tipos de cáncer se encuentra con mutaciones, siendo una de las principales causas de resistencia a la quimioterapia.

Este resultado de forma preliminar podría indicarnos que los compuestos probados con estas líneas cancerígenas pudieran tener otra vía alternativa a la expresión de p53, es decir, detener la proliferación celular por otro tipo de muerte celular. Sin embargo, para confirmar esta hipótesis se necesitan realizar experimentos adicionales que puedan confirmarlo, uno de ellos sería, mediante un inmunoensayo observar la relación que hay en la expresión de la proteína p53 en las líneas celulares HCT116 y AGS. Algunos compuestos de rutenio tienen mecanismos de muerte celular independiente de la proteína p53 [77][71], lo cual en parte podría explicar la disminución del fenómeno de resistencia en compuestos de rutenio, comparándolo con el *cis*-platino.

5.3 GLUCOSA OXIDASA

Se midió la variación en la concentración de oxígeno utilizando un sensor de oxígeno DO166MT pO₂ probe Shelfscientific, para monitorear la reacción de glucosa con la GO, agregando a la celda de reacción diferentes concentraciones de los compuestos de osmio **1b**, **2b**, **3b**, **4**, **5** y **6**.

La reacción se mide de 0 a 480 segundos, tomando la parte lineal de la gráfica, de acuerdo al método de las velocidades iniciales. En la ecuación 11 podemos ver que la disminución en la concentración de oxígeno nos indica que la reacción se está llevando a cabo.



Ecuación 11. Reacción de oxidación de la glucosa.

Se puede observar un efecto inhibitorio de la reacción por parte de los compuestos ciclometalados de osmio. Conforme la concentración de osmio aumenta dentro de la celda, la velocidad decrece de forma monotónica. Los gráficos de Michaelis-Menten y de Lineweaver-Burk nos indican el tipo de inhibición que existe en la reacción por parte de los diferentes complejos de osmio.

Podemos observar para el complejo **1b** hay una inhibición mixta, debido a que las pendientes del gráfico de los dobles inversos se cruzan fuera de los ejes, pero muy cercano al eje de las abscisas, indicativo de una inhibición no competitiva. La dependencia de V_{\max} sobre la concentración de **1b** es aproximadamente

$$V_{\max} = V_{\max}^{\circ} - \alpha[\mathbf{1b}]$$

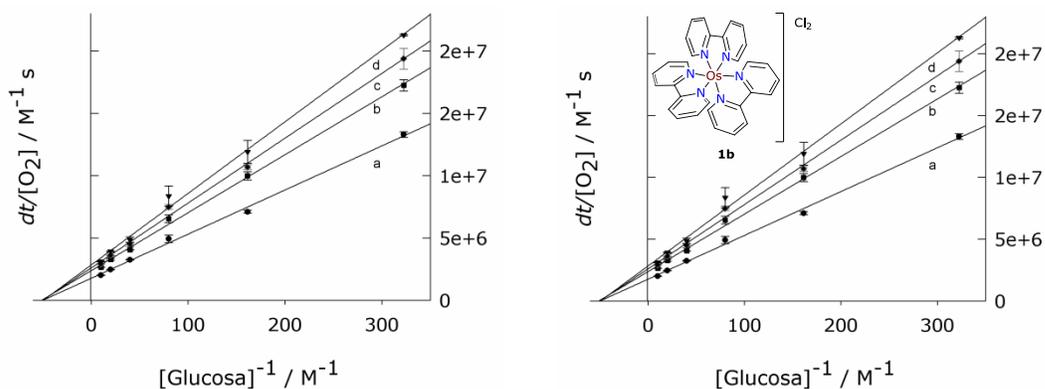


Figura 37. Gráficas de Michaelis-Menten y Lineweaver-Burk obtenidos por el método del estado estacionario. La reacción de oxidación de la glucosa se realizó en presencia de $[1 \times 10^{-8}]$ M de GO, $(0.31 - 10) \times 10^{-2}$ M de glucosa, $(0, 2.5, 5, 10) \times 10^{-3}$ M, de **1b** (a-d respectivamente), utilizando un buffer de acetatos 0.1 M a pH = 5 a 25°C.

La interacción del complejo **2b** es diferente a la del complejo **1b**, debido a que se observa que la intersección de las pendientes en la gráfica de Lineweaver-Burk es sobre el eje de las abscisas, indicativo de una inhibición no competitiva, es decir, el complejo no interactúa directamente en el sitio activo de la enzima glucosa oxidasa.

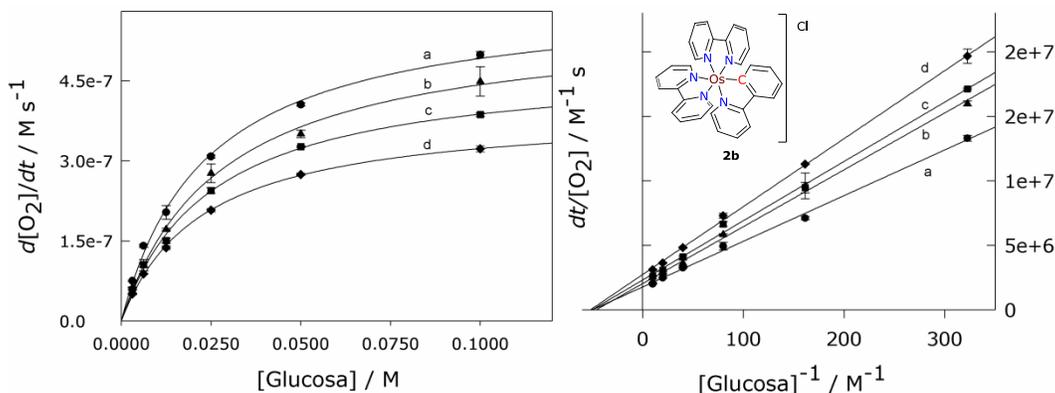


Figura 38. Gráficas de Michaelis-Menten y Lineweaver-Burk obtenidos por el método del estado estacionario. La reacción de oxidación de la glucosa se realizó en presencia de $[1 \times 10^{-8}]$ M de GO, $(0.31 - 10) \times 10^{-2}$ M de glucosa, $(0, 2.5, 5, 10) \times 10^{-3}$ M de **2b** (a-d respectivamente), utilizando un buffer de acetatos 0.1 M a pH = 5 a 25°C.

La inhibición del complejo **3b** sobre la reacción de oxidación de la glucosa es similar a la del complejo **2b**, las pendientes del gráfico de los dobles inversos muestra que las pendientes se cruzan sobre el eje de las abscisas, indicativo de la inhibición no competitiva.

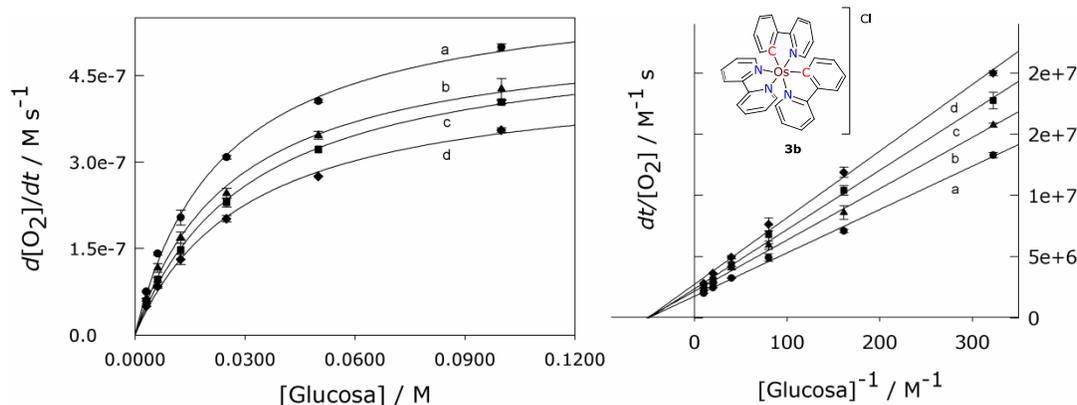


Figura 39. Gráficas de Michaelis-Menten y Lineweaver-Burk obtenidos por el método del estado estacionario. La reacción de oxidación de la glucosa se realizó en presencia de $[1 \times 10^{-8}]$ M de GO, $(0.31 - 10) \times 10^{-2}$ M de glucosa, $(0, 2.5, 5, 10) \times 10^{-3}$ M de **3b** (a-d respectivamente), utilizando un buffer de acetatos 0.1 M a pH = 5 a 25°C.

La interacción del complejo **5** con la enzima glucosa oxidasa, en la reacción de oxidación de la glucosa es claramente una inhibición mixta. La estructura del complejo **5** tiene dos ligantes acetonitrilo, ligantes monodentados que no hay en los demás complejos, por lo que la forma de interaccionar con la enzima también es diferente, mientras que los complejos ciclometalados **2b** y **3b** inhiben de forma no competitiva, el complejo ciclometalado **5** inhibe de forma mixta, de forma similar al complejo de coordinación **1b**.

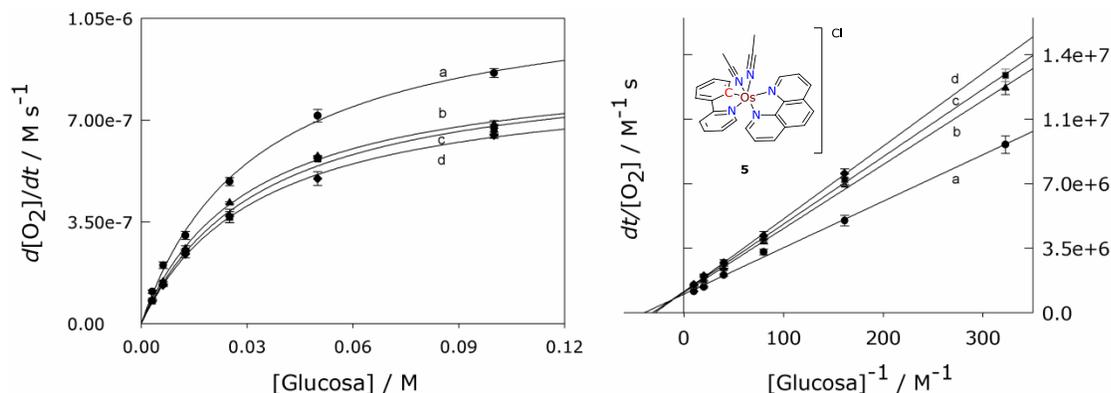


Figura 40. Gráficas de Michaelis-Menten y Lineweaver-Burk obtenidos por el método del estado estacionario. La reacción de oxidación de la glucosa se realizó en presencia de $[1 \times 10^{-8}]$ M de GO, $(0.31 - 10) \times 10^{-2}$ M de glucosa, $(0, 2.5, 5, 10) \times 10^{-3}$ M de **5** (a-d respectivamente), utilizando un buffer de acetatos 0.1 M a pH = 5 a 25°C.

La inhibición del complejo **6** es muy similar a la que presenta el complejo **5**, ambos coinciden en tener un fragmento ciclometalado con la fenilpiridina y un ligante fenantrolina. En el caso del complejo **6** es muy similar al complejo

2b, con un fragmento ciclometalado y dos ligandos polipiridínicos. Sin embargo, la inhibición de los complejos con ligandos fenantrolina es mixta. En este caso podemos observar la importancia de la estructura del complejo, ya que además del fragmento ciclometalado, el tipo de ligante polipiridínico influye en la interacción con la enzima.

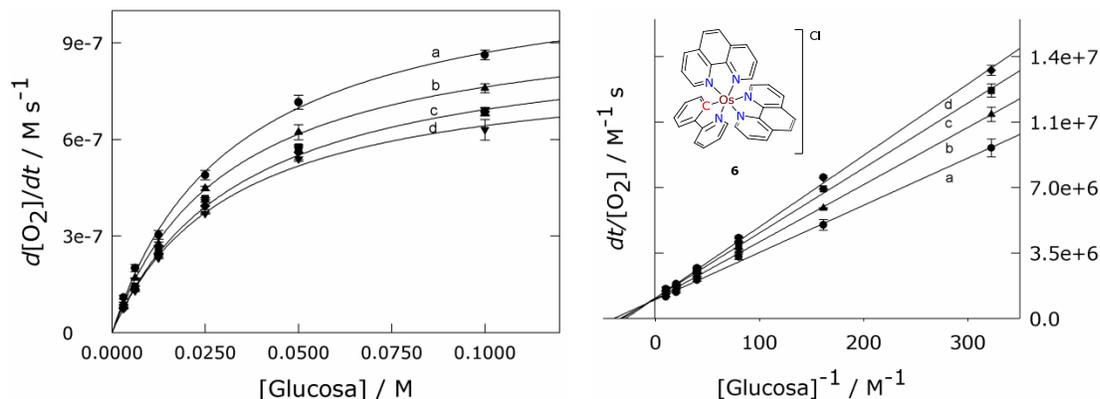


Figura 41. Gráficas de Michaelis-Menten y Lineweaver-Burk obtenidos por el método del estado estacionario. La reacción de oxidación de la glucosa se realizó en presencia de $[1 \times 10^{-8}]$ M de GO, $(0.31 - 10) \times 10^{-2}$ M de glucosa, $(0, 2.5, 5, 10) \times 10^{-3}$ M de **6** (a-d respectivamente) utilizando un buffer de acetatos 0.1 M a pH = 5 a 25°C.

En el análisis del estudio cinético con el complejo **4** se observa una inhibición mixta como en los casos anteriores, sin embargo después de un tiempo la concentración de oxígeno comienza a incrementarse, este fenómeno sólo se presenta con el complejo **4**. Ninguno de los complejos anteriores presenta este comportamiento, el cual se analiza en la página siguiente.

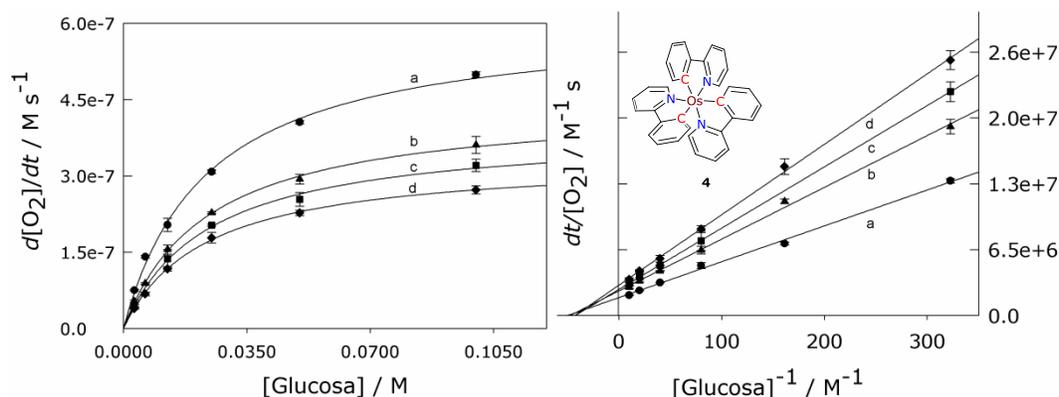


Figura 42. Gráficas de Michaelis-Menten y Lineweaver-Burk obtenidos por el método del estado estacionario. La reacción de oxidación de la glucosa se realizó en presencia de $[1 \times 10^{-8}]$ M de GO, $(0.31 - 10) \times 10^{-2}$ M de glucosa, $(0, 2.5, 5, 10) \times 10^{-3}$ M de **4** (a-d respectivamente) utilizando un buffer de acetatos 0.1 M a pH = 5 a 25°C.

Las valores de K_m y V_{max} obtenidos sin adicionar ningún complejo de osmio son acordes con lo reportado en la literatura en similares condiciones [48]. Cuando se tiene una inhibición mixta los valores de K_m y V_{max} cambian para las diferentes concentraciones de los compuestos de osmio. El compuesto **1b**, es decir $[Os(bpy)_3]Cl_2$, genera una inhibición mixta, pero los valores de K_m se mantienen casi constantes. Esto probablemente debido a que el cruce de las pendientes de las diferentes concentraciones de osmio, es muy cercano al eje de las abscisas, dando la impresión de una inhibición no competitiva, la V_{max} para este compuesto disminuye de 5.6×10^{-7} hasta 3.4×10^{-7} ($M s^{-1}$). Para los compuestos **2b** y **3b** la V_{max} disminuye prácticamente de la misma forma, es decir el efecto de inhibición es muy similar en ambos compuestos, mientras que la K_m permanece constante, debido a que es una inhibición no competitiva.

Tabla 6. Velocidad máxima V_{max} ($M s^{-1}$) de la reacción de oxidación de glucosa.

Compuesto	1b	2b	3b	4	5	6
[Os]			$10^7 \times V_{max}$ ($M s^{-1}$)			
0	5.6±0.1	5.6±0.1	5.6±0.1	5.6±0.1	9.9±0.3	9.9±0.3
2.5	4.2±0.09	4.8±0.2	4.6±0.2	4.1±0.09	9.0±0.1	9.6±0.1
5	3.8±0.1	4.3±0.09	4.2±0.1	3.8±0.1	8.6±0.2	9.0±0.1
10	3.4±0.1	3.6±0.04	3.6±0.1	3.3±0.06	8.7±0.2	9.2±0.2

Tabla 7. Constante de Michaelis-Menten K_m (M) de la reacción de oxidación de glucosa.

Compuesto	1b	2b	3b	4	5	6
[Os]			$10^2 \times K_m$ (M)			
0	2.0±0.2	2.0±0.2	2.0±0.2	2.0±0.2	2.5±0.3	2.5±0.3
2.5	1.9±0.1	2.0±0.1	1.9±0.1	2.1±0.1	3.1±0.2	2.9±0.1
5	1.9±0.1	1.9±0.1	2.0±0.2	2.3±0.2	3.1±0.2	3.1±0.2
10	2.0±0.2	1.9±0.08	1.9±0.1	2.3±0.2	3.4±0.2	3.5±0.2

En las cinéticas realizadas con el compuesto **4** se observó algo diferente, en la figura 43a se muestra primero la disminución de la concentración de oxígeno, siendo normal debido a que se necesita oxígeno molecular para oxidar la glucosa en presencia de glucosa oxidasa. Sin embargo, después de un tiempo de equilibrio en el que la concentración de oxígeno no varía con respecto al tiempo, la concentración de oxígeno incrementa hasta llegar a su punto inicial. Normalmente para medir la interacción de los demás complejos con la enzima se hacía en un intervalo de 0 a 480 segundos, en el estudio con el complejo **4** se incrementó el tiempo de reacción hasta los 3600

segundos. Lo que se puede observar en la figura 43b es que cuando no hay complejo la concentración de oxígeno disminuye conforme la glucosa se oxida, y después de un tiempo de estabilización, aproximadamente 1500 segundos incrementa ligeramente la concentración de oxígeno. Cuando se añade a la celda de reacción el complejo **4**, la concentración de oxígeno disminuye, pero a un tiempo alrededor de los 200 segundos comienza a incrementarse, hasta regresar casi a la concentración inicial de oxígeno, manteniéndose en esta concentración después de los 1500 segundos. La diferencia cuando se añade el complejo y cuando está ausente es considerable. En un ensayo adicional se agregó más enzima alrededor de los 200 segundos pero el efecto es el mismo, un incremento de la concentración de oxígeno hasta llegar a un punto de equilibrio cuando se alcanza la concentración inicial. Se pudieron obtener los valores de V_{max} y K_m para este compuesto debido a que se considera sólo la parte lineal de la pendiente de la gráfica.

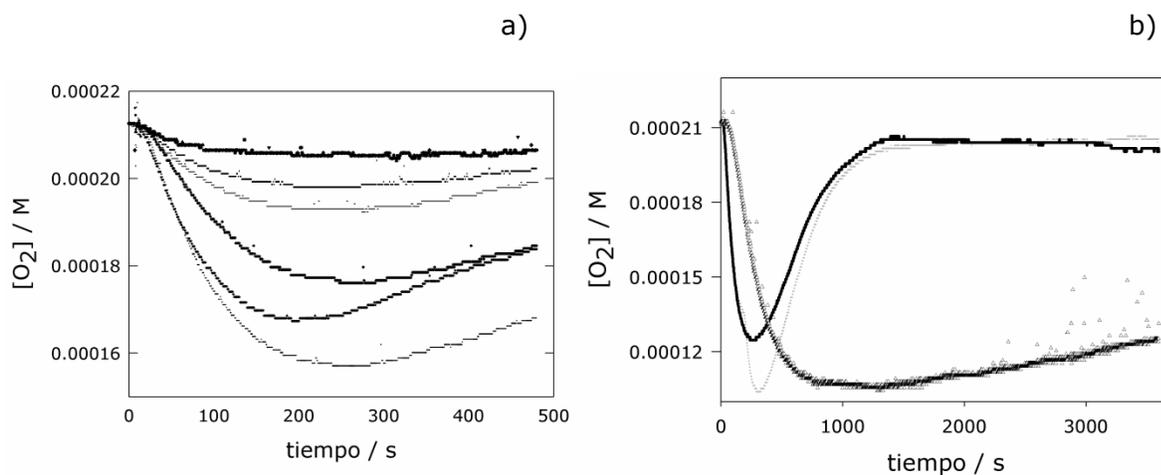
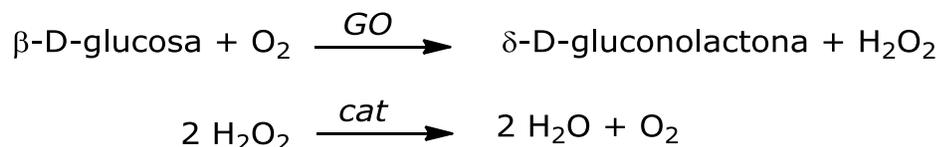


Figura 43. Gráfica de la concentración de oxígeno con respecto al tiempo. a) $(0.31 - 10) \times 10^{-2}$ M de glucosa, $[1 \times 10^{-8}]$ M de GO, 5×10^{-3} M de **4**, pH = 5 a 25°C, durante 480 segundos. b) Se muestran tres diferentes ensayos, símbolo (Δ) 10×10^{-2} M de glucosa, $[1 \times 10^{-8}]$ M de GO sin complejo de osmio. Línea continua en color negro 10×10^{-2} M de glucosa, $[1 \times 10^{-8}]$ M de GO, 5×10^{-3} M de **4**, pH = 5 a 25°C, durante 3600 segundos. Línea punteada en color gris: mismas condiciones que línea continua, se agregó $[1 \times 10^{-8}]$ M de GO a los 180 segundos.

En la oxidación de la glucosa se reduce oxígeno molecular para generar peróxido de hidrógeno, posteriormente esta especie puede reoxidarse y generar de nuevo oxígeno y agua debido a que el H_2O_2 es muy inestable termodinámicamente, con un $\Delta G^\circ = -119.2 \text{ kJmol}^{-1}$. No obstante, su

descomposición es muy lenta, por lo que se requiere de un catalizador para que la reacción se lleve a cabo [78].



Ecuación 12. Reacción de oxidación de glucosa para formar peróxido de hidrógeno y la regeneración de oxígeno al oxidar el peróxido de hidrógeno.

Es un poco desconcertante este fenómeno, porque con los análogos en estado de oxidación 3+ sólo se observa la disminución de la concentración de oxígeno. Si bien son inhibiciones diferentes debido a que en el caso del compuesto de rutenio **3a** [Ru(phpy)₂(bpy)]Cl, primero se observa una activación de la reacción y posteriormente se observa inhibición de la misma [48], no así para sus análogos de osmio en estado de oxidación 3+. En el caso del compuesto de osmio **3b** sólo se observa una inhibición no competitiva, en el caso del compuesto **4** se observa una inhibición mixta y con una segundo mecanismo al tener un incremento en la concentración de oxígeno.

Para el caso del compuesto **4**, es el único compuesto sin contraión al ser neutro. También es el único que se disuelve en 10% de DMSO, por lo que se realizaron pruebas para ver el efecto del DMSO en la reacción de oxidación de la glucosa. Se añadió 10% de DMSO a una reacción sin complejo, pero no se observó el fenómeno antes descrito del incremento de la concentración de oxígeno, es decir, el DMSO no es el responsable directo del incremento en la concentración de oxígeno.

Una de las hipótesis es que el complejo **4** [Os(phpy)₃] reduzca peróxido de hidrógeno, el cual se produce en la reacción de la oxidación de la glucosa, por ello se realizó un ensayo adicionando a una celda de reacción, el complejo **4**, peróxido de hidrógeno, utilizando un buffer de acetatos 0.1 M a pH = 5 a 25°C, es decir, en las mismas condiciones de reacción. Sin embargo, no se observa una variación en la concentración de oxígeno. La reacción no se lleva a cabo, por lo que se piensa que debe generarse un intermediario del complejo **4** que active el peróxido de hidrógeno para reducirlo.

Si partimos del hecho de que los compuestos interactúan con la enzima intercambiando electrones por el mecanismo de esfera externa, como en el caso del mediador en el biosensor, en el que sólo hay intercambio de electrones pero que no entran en contacto mutuo entre las moléculas, pudiera el complejo **4** ganar un electrón, para formar una especie reactiva a 19 electrones con el osmio en estado de oxidación 2+, de esta forma podría reducir el peróxido de hidrógeno al oxidarse el complejo y regenerarse a 18 electrones con el osmio en un estado de oxidación 3+.

En la tabla 8 se muestra un comparativo de la constante de inhibición K_i o la concentración inhibitoria para el 50% de inhibición ($i_{0.5}$) y potencial de óxido reducción, entre los diferentes complejos de rutenio y osmio. La $i_{0.5}$ se calcula cuando hay una inhibición mixta y es igual a la K_i calculada cuando la inhibición no es mixta. Para este particular caso de inhibición mixta la $i_{0.5}$ es calculada de los valores de V_{\max} obtenidos para cada caso. De esta forma el valor de $i_{0.5}$ es la concentración del complejo a la cual $V_{\max} = \frac{1}{2}V_{\max}^{\circ}$. Por lo tanto, $i_{0.5} = V_{\max}^{\circ}/2\alpha$.

Tabla 8. Valores de K_i e $i_{0.5}$ (M) $\times 10^2$ medidos a pH = 5.5, a 25°C.

Inhibidor	Compuesto $\times 10^2$	E° (V) Ag/AgCl
1b	1.9 ± 0.1^{mi}	0.888
2b	1.8 ± 0.1^{nc}	0.271
3b	1.9 ± 0.1^{nc}	-0.356
4b	1.2 ± 0.2^{mi}	-0.958
5b	1.6 ± 0.1^{mi}	0.299
6b	3.0 ± 0.2^{mi}	0.282
1a[§]	1.8 ± 0.6^c	1.396
2a[§]	3.6 ± 0.5^{nc}	0.578
6a[§]	1.7 ± 0.2^{nc}	0.584

^{c)} inhibición competitiva; ^{mi)} inhibición mixta, $i_{0.5}$; ^{nc)} inhibición no competitiva.

§ Publicado por Saavedra-Díaz [48]. a = rutenio; b = osmio.

A pesar de que el valor de los potenciales redox cambia de manera considerable desde 1.39 V en el complejo $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]\text{Cl}_2$, hasta -0.12 V en $[\text{Os}(\text{phpy})_3]$, el valor de las constantes de inhibición es muy similar, por lo que en este primer ensayo observamos que el potencial redox no afecta de manera significativa a las constantes de inhibición. Por otro lado, el valor de la inhibición no es muy grande. A pesar de esto se observó una diferencia en cuanto a la forma de interacción complejo-enzima debido a que el

mecanismo de inhibición es diferente entre los complejos estudiados. Estos resultados muestran que la interacción con la glucosa oxidasa, y los complejos de rutenio y osmio es a través de una inhibición de la actividad catalítica de la enzima.

5.4 LACTATO DESHIDROGENASA

Estudiamos la interacción de los complejos de rutenio y osmio con la enzima lactato deshidrogenasa LDH_{mc} cuando esta enzima cataliza la reducción de piruvato a L-lactato y la oxidación de L-lactato a piruvato, con la concomitante conversión de NADH en NAD⁺. Se estudió la cinética de reacción midiendo el máximo de absorción del NADH a 340 nm con un equipo de UV-Vis. En experimentos independientes se modificaron las concentraciones de piruvato, L-lactato, NADH y NAD⁺.

Este análisis se llevó a cabo por el método de las velocidades iniciales, es decir, se tomó en cuenta la parte lineal de las curvas de [NADH] vs tiempo. De esta forma se construyeron las gráficas de Michaelis-Menten y Lineweaver-Burk, para de igual manera que en el estudio con glucosa oxidasa obtener los parámetros V_{\max} y K_m . Se observan distintas formas de inhibición de los complejos con la enzima, es decir, inhibición mixta, no competitiva y competitiva. Para saber el tipo de inhibición se realizó el gráfico de Lineweaver-Burk. Por ello se muestran los datos de los complejos **1a** y **2a** cambiando las concentraciones de todos los sustratos.

En el proceso reductivo cuando se utiliza NADH y piruvato a una concentración variable, añadiendo al medio el compuesto **1a** se observa de la gráfica de Lineweaver-Burk que hay una inhibición mixta, debido a que las pendientes cruzan sobre el cuadrante. Del mismo modo que con la glucosa la dependencia de V_{\max} sobre la concentración de los complejos es aproximadamente:

$$V_{\max} = V_{\max}^{\circ} - \alpha[\mathbf{1a}]$$

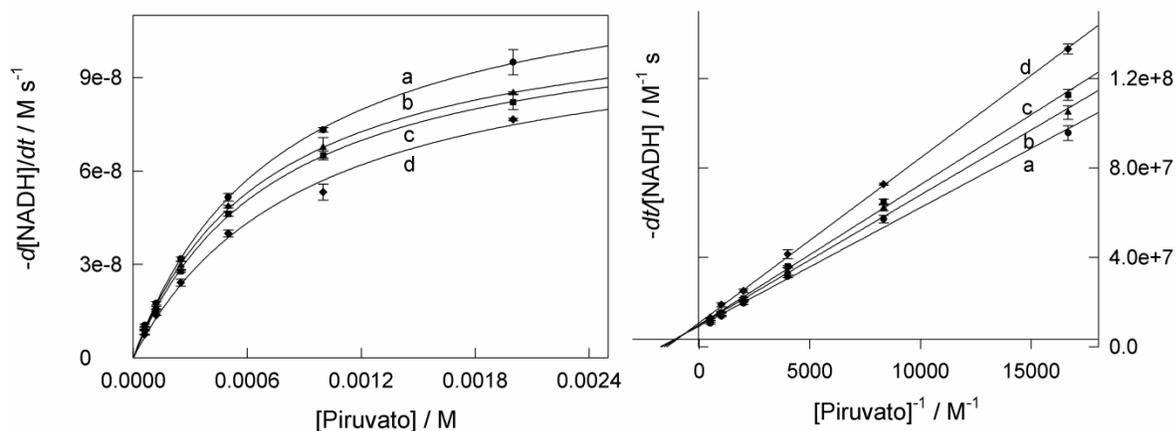


Figura 44. Gráficas de Michaelis-Menten y Lineweaver-Burk para obtener los datos cinéticos de V_{\max} y K_m por el método del estado estacionario. La reacción de reducción de piruvato a L-lactato utilizando como cofactor NADH, se realizó en presencia de $[1 \times 10^{-10}]$ M de LDH_{mcr} , $(0.03 - 2.0) \times 10^{-3}$ M de piruvato, $(0.0, 0.5, 1.0 \text{ y } 2.0) \times 10^{-4}$ M de **1a** (a-d, respectivamente), 1.2×10^{-4} M de $[\text{NADH}]$ a pH = 7.5 y 37 °C.

La diferencia de interacción con la enzima entre el complejo **1a** y el complejo **2a** cuando se utiliza NADH y piruvato a concentraciones variables es notable. Mientras que en el primer caso es mixta, en el segundo es no competitiva, debido a que las líneas cruzan sobre el eje de las abscisas. En este caso como en los anteriores se observa un decremento en la velocidad de la reacción cuando se incrementa la cantidad del complejo **2a**.

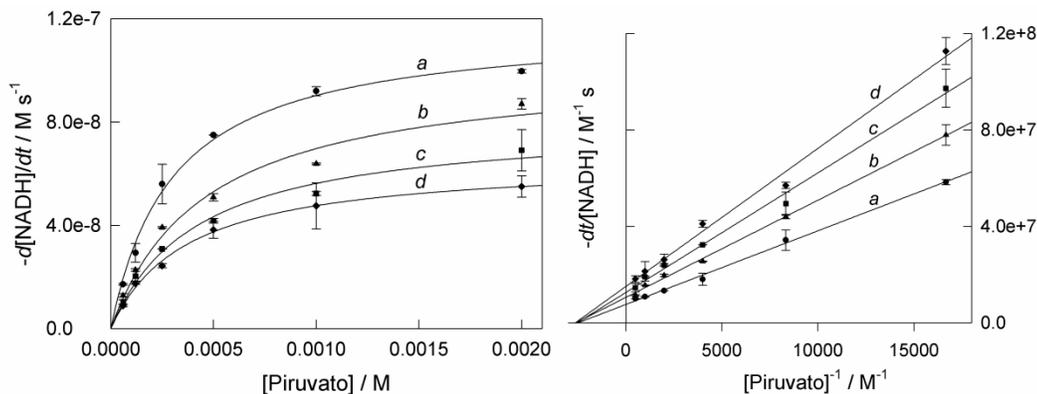


Figura 45. Gráficas de Michaelis-Menten y Lineweaver-Burk para obtener los datos cinéticos de V_{\max} y K_m por el método del estado estacionario. La reacción de reducción de piruvato a L-lactato utilizando como cofactor NADH, se realizó en presencia de $[1 \times 10^{-10}]$ M de LDH_{mcr} , $(0.03 - 2.0) \times 10^{-3}$ M de piruvato, $(0.0, 0.5, 1.0 \text{ y } 2.0) \times 10^{-4}$ M de **2a** (a-d, respectivamente), 1.2×10^{-4} M de $[\text{NADH}]$ a pH = 7.5 y 37 °C.

Cuando se reduce el piruvato utilizando diferentes concentraciones de NADH, observamos que al añadir el complejo de coordinación **1a** genera una inhibición competitiva en la actividad catalítica de la enzima LDH_{mc}, debido a que en la gráfica de los dobles inversos las pendientes se cruzan sobre el eje de las ordenadas. Es decir el complejo interactúa en el sitio activo de la enzima.

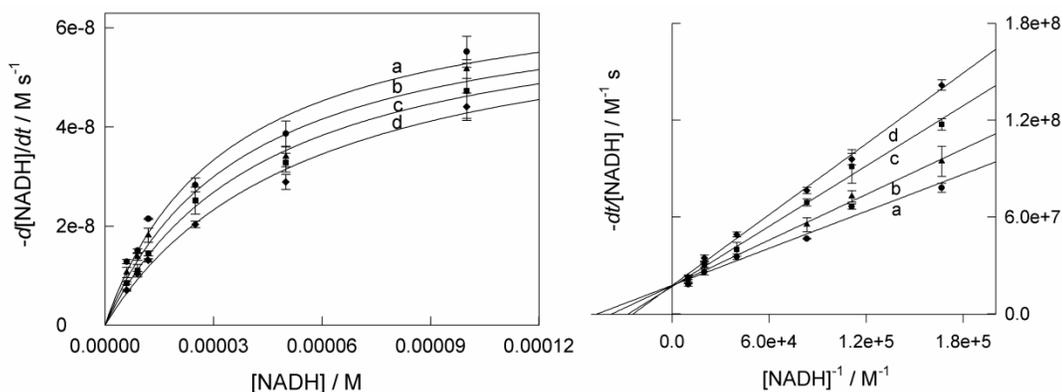


Figura 46. Gráficas de Michaelis-Menten y Lineweaver-Burk para obtener los datos cinéticos de V_{\max} y K_m por el método del estado estacionario. La reacción de reducción de piruvato a L-lactato utilizando como cofactor NADH, se realizó en presencia de $[1 \times 10^{-10}]$ M de LDH_{mc}, $(0.03-2.0) \times 10^{-4}$ M de NADH, $(0.0, 0.5, 1.0 \text{ y } 2.0) \times 10^{-4}$ M de **1a** (a-d, respectivamente), 1.2×10^{-3} M de piruvato a pH = 7.5 y 37 °C.

Cuando se utiliza el complejo **2a** empleando una concentración de NADH variable, el comportamiento es el mismo que utilizando piruvato variable. En este caso la interacción con la enzima es en un sitio diferente a donde se da la catálisis de reducción de piruvato.

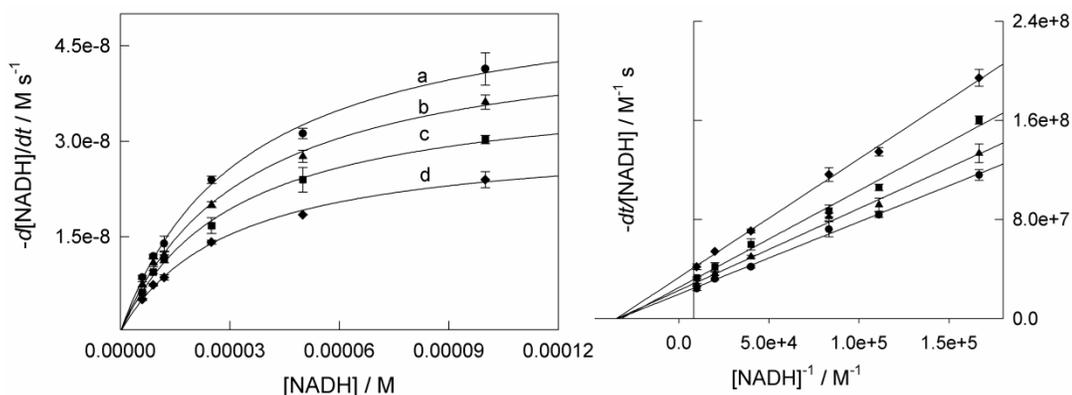


Figura 47. Gráficas de Michaelis-Menten y Lineweaver-Burk para obtener los datos cinéticos de V_{\max} y K_m por el método del estado estacionario. La reacción de reducción de piruvato a L-lactato utilizando como cofactor NADH, se realizó en presencia de $[1 \times 10^{-10}]$ M de LDH_{mc} , $(0.03\text{--}2.0) \times 10^{-4}$ M de NADH, $(0.0, 0.5, 1.0 \text{ y } 2.0) \times 10^{-4}$ M de **2a** (a-d, respectivamente), 1.2×10^{-3} M de piruvato a $\text{pH} = 7.5$ y 37°C .

También se llevó a cabo el análisis del proceso oxidativo, se muestran los resultados para la reacción de oxidación de L-lactato a piruvato utilizando en dos experimentos independientes primero L-lactato variable y después NAD^+ a una concentración variable.

Cuando se utiliza el complejo **1a** con L-lactato variable, nuevamente se observa una inhibición mixta. Se puede observar las pendientes que se cruzan entre los ejes. También podemos observar de la tabla 9 que mientras que los valores de V_{\max} disminuyen, los valores de K_m aumentan, debido a la inhibición mixta.

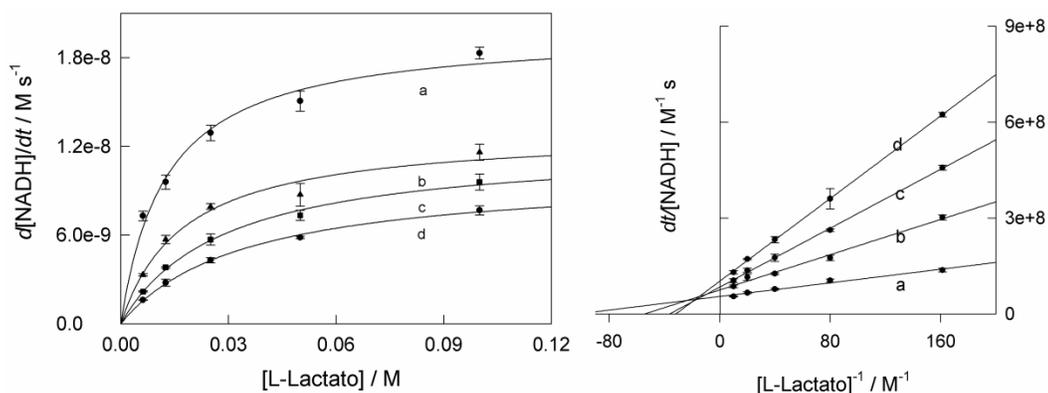


Figura 48. Gráficas de Michaelis-Menten y Lineweaver-Burk para obtener los datos cinéticos de V_{\max} y K_m por el método del estado estacionario. La reacción de oxidación de L-lactato a piruvato utilizando como cofactor NAD^+ , se realizó en presencia de $[4 \times 10^{-10}]$ M de LDH_{mcr} , (0.003–0.1) M de L-lactato, (0.0, 0.5, 1.0 y 2.0) $\times 10^{-4}$ M de **1a** (a-d, respectivamente), 1.0×10^{-3} M de $[\text{NAD}^+]$ a pH = 7.5 y 37 °C.

Cuando se utiliza en las mismas condiciones el complejo **2a**, es decir, la oxidación de diferentes concentraciones de L-lactato observamos nuevamente que las pendientes en el gráfico de dobles inversos cruzan sobre el eje de las abscisas, mostrándonos una inhibición no competitiva, por lo que el complejo interactúa en un sitio diferente al sitio activo.

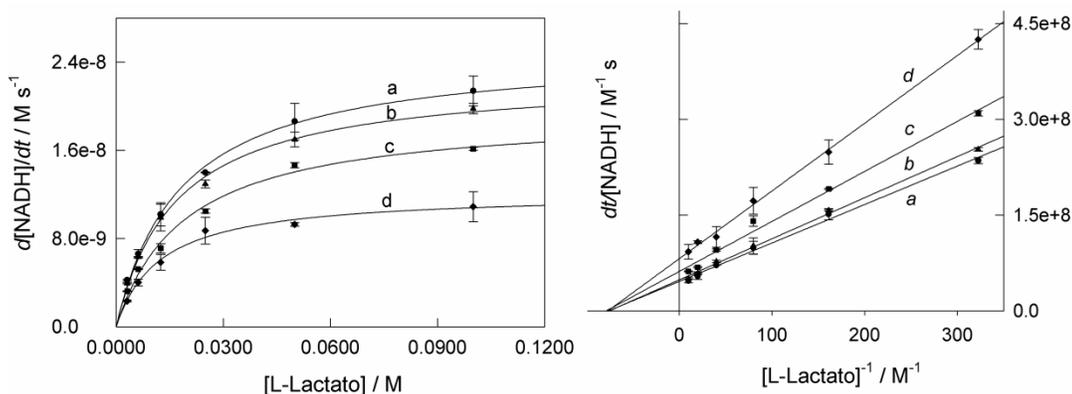


Figura 49. Gráficas de Michaelis-Menten y Lineweaver-Burk para obtener los datos cinéticos de V_{\max} y K_m por el método del estado estacionario. La reacción de oxidación de L-Lactato a piruvato utilizando como cofactor NAD^+ , se realizó en presencia de $[4 \times 10^{-10}]$ M de LDH_{mcr} , (0.003–0.1) M de L-lactato, (0.0, 0.5, 1.0 y 2.0) $\times 10^{-4}$ M de **2a** (a-d, respectivamente), 1.0×10^{-3} M de $[\text{NAD}^+]$ a pH = 7.5 y 37 °C.

En el último ensayo que se realizó variando la concentración de NAD^+ se observa un comportamiento similar a los anteriores cuando se utiliza el

complejo **1a**, ya que al agregar el complejo a la reacción muestra una inhibición mixta, únicamente en el caso donde se varía la concentración de NADH se observa una inhibición competitiva.

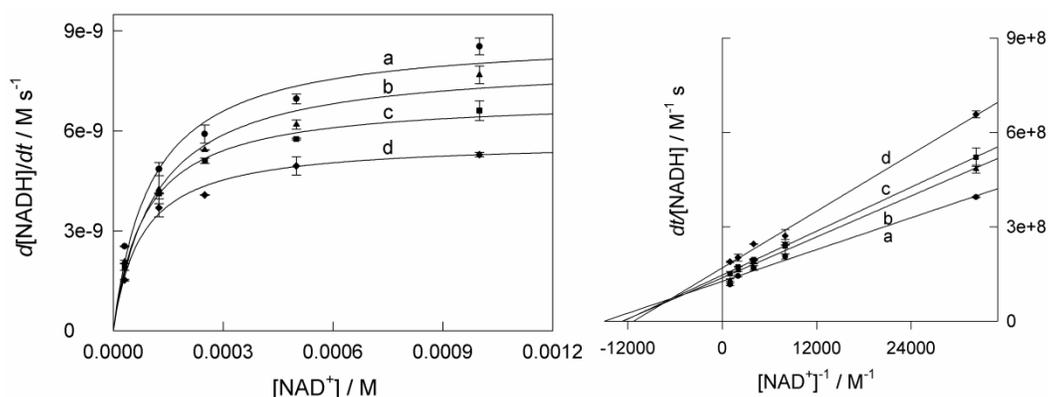


Figura 50. Gráficas de Michaelis-Menten y Lineweaver-Burk para obtener los datos cinéticos de V_{\max} y K_m por el método del estado estacionario. La reacción de oxidación de L-lactato a piruvato utilizando como cofactor NAD^+ , se realizó en presencia de $[4 \times 10^{-10}]$ M de LDH_{mc} , $(0.03-1.0) \times 10^{-3}$ de NAD^+ , $(0.0, 0.5, 1.0 \text{ y } 2.0) \times 10^{-4}$ M de **1a** (a-d, respectivamente), 0.1 M de L-lactato a pH = 7.5 y 37 °C.

Cuando se utiliza el complejo **2a** se observa el mismo comportamiento que en los casos anteriores para este complejo. La inhibición no competitiva es la forma de interactuar del complejo organometálico **2a** con la enzima LDH_{mc} . En este caso la inhibición es en otro sitio de la enzima diferente a donde se lleva a cabo la reacción.

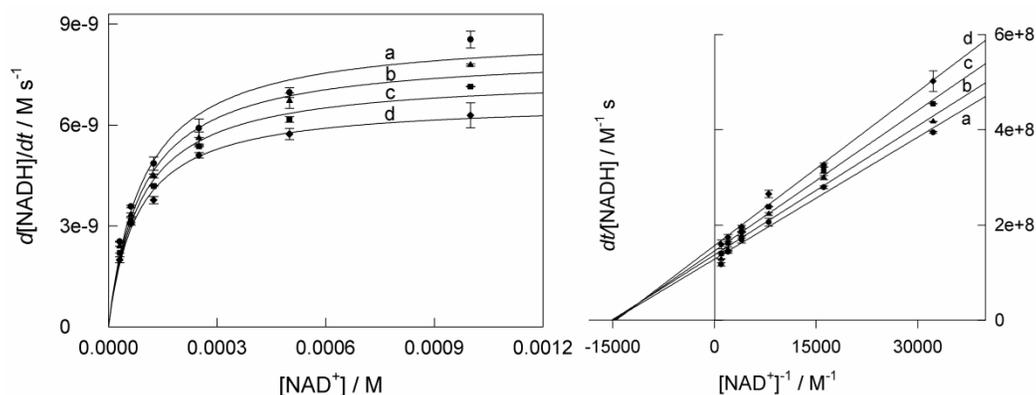


Figura 51. Gráficas de Michaelis-Menten y Lineweaver-Burk para obtener los datos cinéticos de V_{\max} y K_m por el método del estado estacionario. La reacción de oxidación de L-lactato a piruvato utilizando como cofactor NAD^+ , se realizó en presencia de $[4 \times 10^{-10}]$ M de LDH_{mc} , $(0.03-1.0) \times 10^{-3}$ de NAD^+ , $(0.0, 0.5, 1.0 \text{ y } 2.0) \times 10^{-4}$ M de **2a** (a-d, respectivamente), 0.1 M de L-lactato a pH = 7.5 y 37 °C.

Tabla 9. Valores de V_{\max} ($M s^{-1}$) y K_m (M) para el complejo **1a** en las reacciones de oxidación de L-lactato y piruvato y en la reducción de piruvato a L-lactato.

[1a] / M	Oxidación				Reducción			
	L-lactato ^{a)}		NAD ⁺ ^{b)}		Piruvato ^{c)}		NADH ^{d)}	
	$10^8 \times V_{\max}$	$10^2 \times K_M$	$10^8 \times V_{\max}$	$10^5 \times K_M$	$10^8 \times V_{\max}$	$10^4 \times K_M$	$10^8 \times V_{\max}$	$10^5 \times K_M$
0	1.9±0.06	1.0±0.1	0.79±0.03	6.7±0.6	10.7±0.1	5.6±0.1	5.6±0.1	2.2±0.2
5×10^{-5}	1.3±0.07	1.8±0.1	0.72±0.02	7.8±0.5	10.1±0.9	5.9±0.6	5.7±0.1	2.7±0.1
1×10^{-4}	1.1±0.04	2.7±0.1	0.68±0.01	7.9±0.5	10.1±0.7	6.3±0.5	5.9±0.1	3.7±0.2
2×10^{-4}	0.9±0.04	3.1±0.2	0.59±0.01	8.8±0.5	9.2±0.4	6.8±0.9	5.7±0.4	4.2±0.4

^{a)} [LDH_{mc}] 4×10^{-10} M, [NAD⁺] 1.0×10^{-3} M; ^{b)} [LDH_{mc}] 4×10^{-10} M, [lactato] 0.1 M; ^{c)} [LDH_{mc}] 1×10^{-10} M, [NADH] 1.2×10^{-4} M; ^{d)} [LDH_{mc}] 1×10^{-10} M, [piruvato] 1.2×10^{-3} M.

Tabla 10. Valores de V_{\max} ($M s^{-1}$) y K_m (M) para el complejo **2a** en las reacciones de oxidación de L-lactato y piruvato y en la reducción de piruvato a L-lactato.

[2a] / M	Oxidación				Reducción			
	L-lactato ^{a)}		NAD ⁺ ^{b)}		Piruvato ^{c)}		NADH ^{d)}	
	$10^8 \times V_{\max}$	$10^2 \times K_M$	$10^8 \times V_{\max}$	$10^5 \times K_M$	$10^8 \times V_{\max}$	$10^4 \times K_M$	$10^8 \times V_{\max}$	$10^5 \times K_M$
0	2.1±0.2	1.3±0.1	0.79±0.03	6.6±0.5	13.1±0.5	4.0±0.2	5.1±0.3	2.9±0.2
5×10^{-5}	2.0±0.1	1.3±0.1	0.73±0.02	6.5±0.5	9.5±0.6	3.8±0.3	4.4±0.3	2.9±0.3
1×10^{-4}	1.6±0.1	1.2±0.1	0.68±0.01	6.7±0.4	7.9±0.1	3.9±0.2	3.9±0.3	3.1±0.3
2×10^{-4}	1.2±0.3	1.3±0.1	0.63±0.01	6.8±0.4	6.6±0.1	3.8±0.2	3.0±0.1	2.8±0.2

^{a)} [LDH_{mc}] 4×10^{-10} M, [NAD⁺] 1.0×10^{-3} M; ^{b)} [LDH_{mc}] 4×10^{-10} M, [lactato] 0.1 M; ^{c)} [LDH_{mc}] 1×10^{-10} M, [NADH] 1.2×10^{-4} M; ^{d)} [LDH_{mc}] 1×10^{-10} M, [piruvato] 1.2×10^{-3} M.

En este caso se muestra primero el esquema para el proceso reductivo es decir, la reducción de piruvato a L-lactato variando la concentración de piruvato y de NADH en dos ensayos independientes.

Tabla 11. Constantes de inhibición K_i o $i_{0.5}$ (M) para el proceso reductivo. Es decir la reacción de reducción de piruvato a L-lactato.

Inhibidor	Proceso reductivo	
	Piruvato	NADH
1a	$(2.0 \pm 1) \times 10^{-4}$ mi)	$(2.2 \pm 0.6) \times 10^{-4}$ c)
2a	$(2.0 \pm 0.5) \times 10^{-4}$ nc)	$(6.0 \pm 3) \times 10^{-4}$ nc)
3a	$(4.9 \pm 0.2) \times 10^{-4}$ nc)	$(5.5 \pm 0.2) \times 10^{-4}$ nc)
1b	$(1.8 \pm 0.2) \times 10^{-4}$ mi)	$(1.8 \pm 0.2) \times 10^{-4}$ mi)
2b	$(1.8 \pm 0.1) \times 10^{-3}$ nc)	$(3.2 \pm 0.1) \times 10^{-4}$ nc)

En la tabla 12 se muestran los datos de la constante de inhibición o $i_{0.5}$ para el proceso oxidativo, es decir, la reacción de oxidación de L-lactato a piruvato. Se utilizaron dos condiciones de reacción diferentes, L-lactato variable y NAD^+ variable.

Tabla 12. Constantes de inhibición K_i o $i_{0.5}$ (M) para el proceso oxidativo.

Inhibidor	Proceso oxidativo	
	L-lactato	NAD^+
1a	$(2.2 \pm 0.8) \times 10^{-4}$ mi)	$(4.0 \pm 0.4) \times 10^{-4}$ mi)
2a	$(1.7 \pm 0.2) \times 10^{-4}$ nc)	$(8.5 \pm 0.7) \times 10^{-4}$ nc)

Se evaluó la cinética de la reacción de reducción de piruvato a L-lactato, utilizando la enzima LDH y añadiendo a la celda de reacción dos inhibidores: oxamato y los complejos de rutenio **1a** y **2a**.

En las figuras 52 y 53 se muestran las gráficas de Michaelis-Menten y de Lineweaver-Burk, con los cuales se determinó la $i_{0.5}$ es decir la inhibición del 50% de la reacción, debido a que en ambos casos, con oxamato se observa una inhibición mixta tanto para el complejo **1a** como para el complejo **2a**.

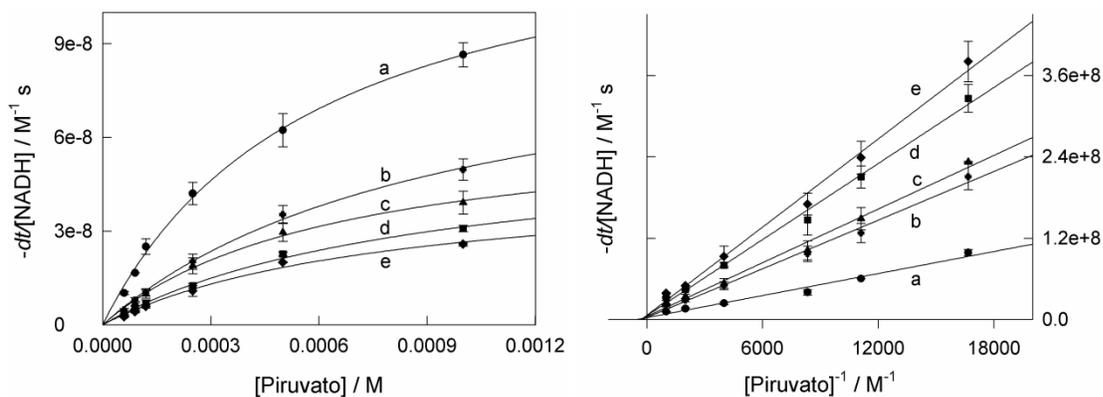


Figura 52. Gráficas de Michaelis-Menten y Lineweaver-Burk para obtener los datos cinéticos de V_{\max} y K_m por el método del estado estacionario. En la reacción de reducción de piruvato a L-lactato se utilizó como cofactor NADH, se realizó en presencia de $[4 \times 10^{-10}]$ M de LDH_{mc} , $(0.03 - 1.0) \times 10^{-3}$ M de piruvato, 3×10^{-4} M de oxamato (línea b), $(0.0, 0.5, 1.0$ y $2.0) \times 10^{-4}$ M de **1a** (a, c, d, y e respectivamente), 1.2×10^{-4} M de [NADH] a pH = 7.5 y 37 °C.

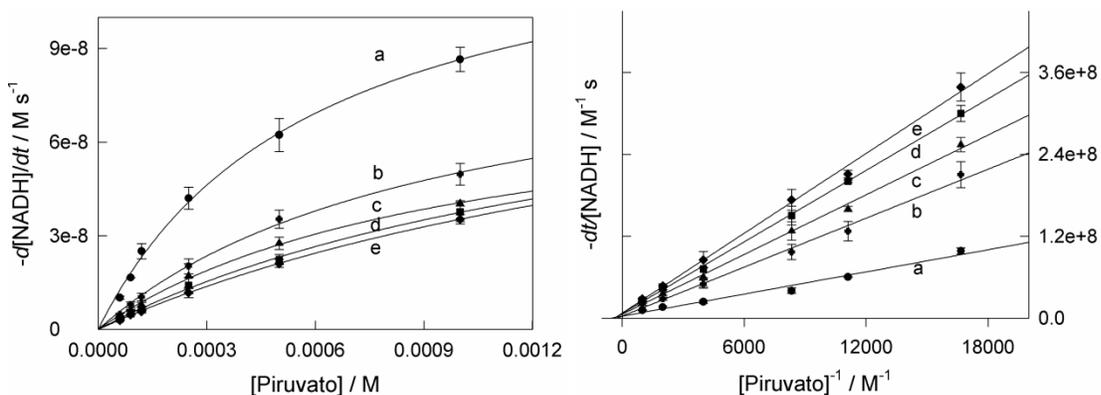


Figura 53. Gráficas de Michaelis-Menten y Lineweaver-Burk para obtener los datos cinéticos de V_{\max} y K_m por el método del estado estacionario. En la reacción de reducción de piruvato a L-lactato se utilizó como cofactor NADH, se realizó en presencia de $[4 \times 10^{-10}]$ M de LDH_{mc} , $(0.03 - 1.0) \times 10^{-3}$ M de piruvato, 3×10^{-4} M de oxamato (línea b), $(0.0, 0.5, 1.0$ y $2.0) \times 10^{-4}$ M de **2a** (a, c, d, y e respectivamente), 1.2×10^{-4} M de [NADH] a pH = 7.5 y 37 °C.

Debido a que el la interacción de los compuestos de rutenio y osmio con la enzima genera una inhibición, decidimos utilizar otro inhibidor de la LDH_{mc} . En este caso utilizamos oxamato, el cual genera una inhibición competitiva de la actividad catalítica de la enzima LDH. La similitud estructural entre el piruvato y el oxamato permite que el oxamato interactúe en el sitio activo de la enzima.

El estudio del oxamato con los compuestos de rutenio nos permitirá observar el efecto de dos inhibidores dentro de la misma celda de reacción, importante si consideramos que en el las células puede haber distintos inhibidores de la reacción.

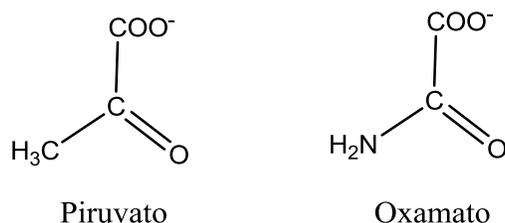


Figura 54. Estructuras de piruvato y del inhibidor competitivo oxamato.

Cuando se tienen dos inhibidores, es decir, oxamato y los complejos de rutenio en la misma celda de trabajo, se genera un efecto sinérgico, que se ve reflejado en el valor de la constante de inhibición, y en el gráfico de Michaelis-Menten se observa una disminución en la velocidad de la reacción cuando están presentes los dos inhibidores. Sin embargo, el efecto no es tan grande, las constantes de inhibición de **1a** y **2a** cuando sólo hay el complejo de rutenio es 2.0×10^{-4} M y cuando se agrega oxamato la constante de inhibición es 1.8×10^{-4} y 1.5×10^{-4} M respectivamente, cuando se agrega sólo oxamato la constante de inhibición reportada es de 5×10^{-4} M [79].

Tabla 13. Constantes de inhibición $i_{0.5}$ para el proceso reductivo. Es decir la reacción de reducción de piruvato a L-lactato agregando el inhibidor oxamato.

Inhibidor + oxamato	Proceso reductivo
	Piruvato (M)
1a	$(1.8 \pm 0.2) \times 10^{-4}$ (mi)
2a	$(1.5 \pm 0.1) \times 10^{-4}$ (mi)

Los datos de las cinéticas con la enzima LDH_{mc} nos indican que efectivamente los complejos de rutenio y osmio interactúan con la enzima lactato deshidrogenasa. Se comprobó que la interacción que existe entre la enzima y el complejo es una inhibición. Sin embargo, los valores de las constantes de inhibición son menores comparados con otros compuestos que inhiben la LDH, como el gossypol y el FX-11 con constantes de inhibición de

1.9 y 0.05×10^{-6} M [55]. Además los resultados en cuanto a la inhibición son muy similares, como en el caso de la glucosa oxidasa, estos valores no explican la diferencia observada en cuanto a la citotoxicidad de **1a** y **2a**. Es por ello que se decidió hacer un estudio teórico para comprender la relación estructural que existe entre la enzima, los complejos de rutenio, el cofactor y el oxamato (inhibidor de la LDH). Los sitios de unión del complejo, así como las distancias de enlace podrían darnos información de la interacción enzima-complejo, para comprender el mecanismo de inhibición sobre la enzima.

5.4.1 SIMULACIÓN DE SITIOS DE UNIÓN DE LOS COMPLEJOS CON LA LDH

Debido a los resultados de inhibición de la reacción de la LDH_{mc} por parte de los complejos organometálicos se decidió estudiar el sitio de interacción de los complejos sobre la enzima, por medio de cálculos de acoplamiento molecular. Por otro lado se estudió la interacción de oxamato, un inhibidor competitivo de la enzima LDH, en presencia y ausencia de los complejos de rutenio **1a** y **2a**. El trabajo fue realizado en colaboración con el Dr. Longzhu Q. Shen del Departamento de Química en la Universidad de Carnegie Mellon, en Pittsburgh, Estados Unidos.

Los sitios de unión más favorables para el complejo de coordinación [Ru(bpy)₃]Cl₂ (**1a**) y su contraparte el complejo organometálico [Ru(phpy)(bpy)₂]Cl (**2a**) fue el sitio 1. Este modelo de unión se muestra en la figura 55, utilizando el complejo **2a** como ejemplo, aunque el mismo sitio es utilizado por **1a**. Las afinidades de unión (ΔG) son -6.8 y -7.1 kcal mol⁻¹ para **1a** y **2a** respectivamente. Estas energías fueron utilizadas para calcular las constantes de disociación ($-\Delta G = RT(\ln K_d^{-1})$) con valores de 0.16×10^{-4} y 0.099×10^{-4} M para **1a** y **2a** respectivamente. Los complejos antes mencionados se unen en la cercanía del sitio activo de la enzima LDH_{mc}. En la figura 55a se observan las posiciones de los complejos de rutenio, así como del NADH (en anaranjado) y del inhibidor oxamato (en azul).

Como se puede observar, la similitud del oxamato con respecto al piruvato es notable, esta molécula inhibe la reacción de forma competitiva (se une al

sitio activo de la enzima), debido a que se parece mucho el sustrato. Es importante destacar que los complejos **1a** y **2a** deberían estar localizados en la misma región que el NADH, compitiendo por el sitio activo de la enzima, el cual consiste de la interacción del piruvato en el carbono del carbonilo pro L a las cadenas laterales de arginina 109 e histidina 195 y la interacción de los dos oxígenos del carbono 1 del piruvato con los nitrógenos de la arginina 171.

Por lo tanto, los complejos pueden comportarse como un inhibidor competitivo, al menos con respecto a NAD^+/NADH , el cual es más cercano al comportamiento del complejo **1a**. Si suponemos que el complejo **2a** y el NADH están simultáneamente unidos en el sitio activo, la separación más corta entre el carbono más cercano de **2a** y el carbono C4 del anillo de nicotinamida es igual a 4.5 Å (figura 55b). De forma similar la separación más corta entre el carbono más cercano de **2a** y el carbono C2 del oxamato es igual a 5.4 Å (figura 55b).

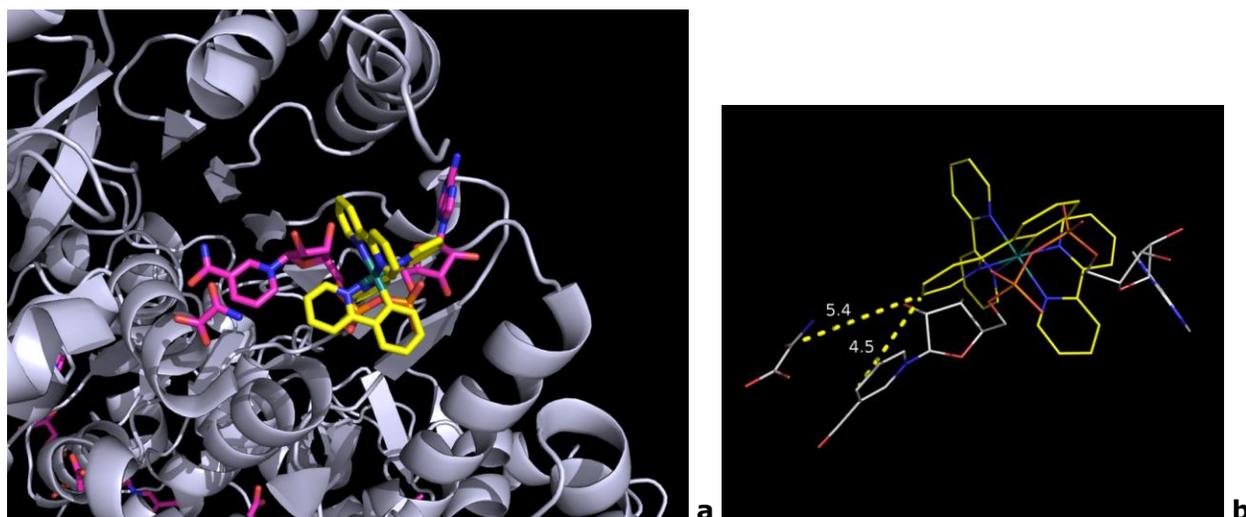


Figura 55. a) Sitios de unión más favorable para los complejos **1a** y **2a** ejemplificado por **2a** (en amarillo), el cofactor NADH y el inhibidor oxamato también se muestran. b) Las líneas punteadas en amarillo hacen énfasis en la más cercana separación entre el compuesto **2a** y oxamato (5,4 Å) y entre **2a** y NADH (4.5 Å).

Aunque el modelo de unión mostrado es el energéticamente más probable, existen otros sitios de unión que fueron identificados. En la mayoría de los casos los compuestos **1a** y **2a** comparten los mismos sitios de unión. Por ejemplo, la separación más corta entre el carbono C2 del oxamato y los

compuestos de rutenio es de 11.4 Å, donde las energías de enlace son -5.1 y -5.8 kcalmol⁻¹ para **1a** y **2a** respectivamente, con constantes de disociación de 2.5×10^{-4} y 0.81×10^{-4} M.

Las afinidades de unión para los sitios 1 y 2 son ligeramente más favorables para el compuesto **2a** que para el **1a**. Una de las variaciones en los compuestos es su carga, mientras que para **1a** es 2+ en **2a** es 1+, por ello se observó que el ΔG entre ambos compuestos tiene una diferencia de 0.3 kcalmol⁻¹ para el sitio 1, que es el energéticamente más probable.

Observando el potencial electrostático de la proteína en la cercanía del sitio activo nos indica que hay una carga ligeramente positiva, es por ello que se prefiere al compuesto **2a** que tiene una carga 1+ que el compuesto **1a** que tiene una carga 2+ que puede generar más repulsión. Esta hipótesis es acorde con los cálculos de superficie electrostática de la enzima LDH_{mc} para el sitio 1 (figura 56). Observamos que hay diversas áreas con potencial electrostático positivo, el cual podría causar una mayor repulsión del complejo de coordinación [Ru(bpy)₃]Cl₂ que el organometálico [Ru(phpy)(bpy)₂]Cl.

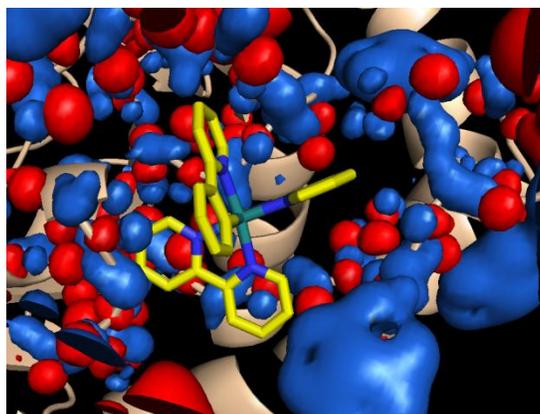


Figura 56. Superficie electrostática del sitio de unión 1, acoplado al complejo **2a**. En azul y en rojo se muestran las áreas negativas y positivas de potencial electrostático.

Por otro lado, se probó el sitio de unión del compuesto **2a** con el complejo enzima-sustrato {LDH_{mc}, oxamato} y {LDH_{mc}, NADH}. Se observa que no hay una modificación del enlace con el complejo organometálico con la enzima libre o con el complejo {LDH_{mc}, oxamato}, en términos de localización y de

energía. Todos los sitios están separados del sitio de unión del oxamato (figura 57).

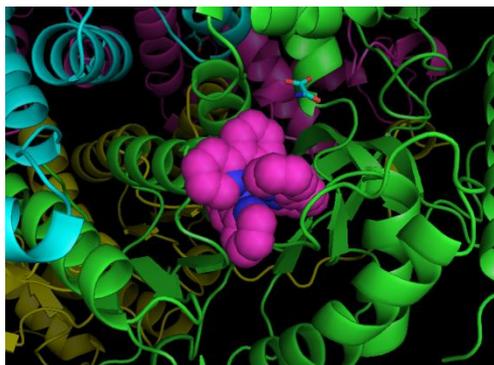


Figura 57. Sitios de unión preferidos para el compuesto **2a** en el complejo enzima sustrato $\{\text{LDH}_{\text{mc}}, \text{oxamato}\}$. Las esferas en magenta muestran el sitio de unión preferido para el compuesto **2a**.

Algo que se observó es que el complejo organometálico no puede ocupar el sitio 1, porque está bloqueado por el enlace con NADH (ver arriba). Para el caso de la enzima libre (sitio 2) el complejo $[\text{Ru}(\text{phpy})(\text{bpy})_2]\text{Cl}$ no puede entrar cuando hay una interacción $\{\text{LDH}_{\text{mc}}, \text{NADH}\}$, debido a que el NADH es más próximo a la enzima.

El complejo **2a** tiene dos sitios más de unión, los sitios 3 y 4, los cuales se muestran en la figura 58 en color rosa y magenta. Los sitios 3 y 4 son mucho más cercanos para unirse con NADH, el carbono más cercano del compuesto organometálico **2a** y el C4 del NADH tienen una separación de 10.5 y 6.9 Å respectivamente. La unión de NADH, el cual tiene una carga de 2-, hace más favorable la interacción electrostática con la proteína que el complejo **2a** con carga 1+. Por lo tanto el sitio de enlace de NADH es favorecido sobre el complejo de rutenio, el cual no puede competir con el cofactor NADH.

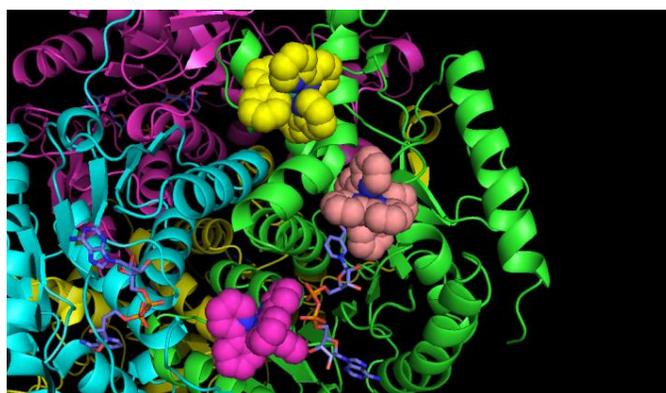


Figura 58. Sitios de unión preferidos del compuesto **2a** en el complejo enzima sustrato {LDH_{mc}, NADH} mostrados en rosa y magenta (sitios 3 y 4). La unión del compuesto **2a** en el sitio 2 en ausencia de NADH se muestra en amarillo.

En la tabla 14 se muestran los resultados del análisis teórico. Para los complejos **1a** y **2a** se muestran dos sitios de enlace diferente con la más cercana separación entre el complejo y el NADH o el oxamato, calculando la energía existente en el enlace (ΔG) y la constante de disociación K_d . Para el caso del complejo **2a**, se añadieron dos opciones más, los sitios 3 y 4 que son geoméricamente cercanos a NADH y oxamato.

Tabla 14. Resumen de resultados de modelado teórico de las interacciones de **1a** y **2a** con LDH_{rm}: sitios de unión, energías de enlace y constantes de disociación.

Sitio	Complejo	Separación más cercana / Å		ΔG / kcal mol ⁻¹	K_d / M
		C(1/2)···C4(NADH)	C(1/2)···C2(oxamato)		
1	1a	4.5	5.4	-6.8	1.6×10^{-5}
	2a	4.5	5.4	-7.1	9.9×10^{-6}
2	1a	13.9	11.4	-5.1	2.5×10^{-4}
	2a	13.9	11.4	-5.8	8.1×10^{-5}
3	2a	10.5	10.9	-5.35	1.7×10^{-4}
4	2a	6.9	5.6	-5.08	2.6×10^{-4}

Lo que podemos observar de los datos experimentales, comparándolo con los datos teóricos, es que efectivamente existen diferencias de unión y de energía entre los complejos **1a** y **2a**. Sin embargo, estas diferencias podríamos considerarlas no significativas en cuanto al valor de la inhibición. Por otro lado estas mismas diferencias en energía, distancia de enlace,

constante de disociación y sitios de unión, pueden generar los diferentes tipos de inhibición: competitivo, no competitivo y mixto.

De esta forma lo que complementarían el estudio de la enzima LDH con los complejos de rutenio y osmio sería observar su comportamiento en organismos más complejos como los son las células, es por ello que se trabajó con células de cáncer de colon HCT116.

5.4.2 LDH EN HCT116 CÁNCER DE COLON

Los estudios de las células HCT116 en presencia y ausencia de los complejos organometálicos se enfocaron en observar la expresión de la enzima LDH tanto a nivel proteínico como en ARN, es así que en este capítulo se describen los experimentos realizados para tal efecto.

En la tabla 15 se muestran los valores de la concentración a la cual se inhibe el 50% de la proliferación celular IC_{50} y la inhibición de la proliferación celular en un 75%, IC_{25} , en este último caso debido a que se inhibe la proliferación celular en un 75%, sólo el 25% de la población se mantiene viva, por ello el nombre de IC_{25} . Se utilizó el compuesto $[Ru(phpy)(fen)(NCMe)_2]^+$, debido a que es uno de los compuestos de rutenio más estudiados y nos puede servir como una referencia.

Tabla 15. Concentración de los compuestos de rutenio y osmio a la cual se inhibe el 50% de la proliferación celular o el 75% de la proliferación celular, IC_{50} e IC_{25} respectivamente.

HCT116		
Compuesto	IC_{50} μ M	IC_{25} μ M
1a	>200	>200
1b	>200	>200
2a	0.3	2.8
2b	0.5	1.5
3a	0.4	1.4
3b	0.6	2.0
RDC11*	1	-
cis-platino	8	-

* $[Ru(phpy)(fen)(NCMe)_2]^+$

En un primer ensayo, se midió la expresión a nivel proteico en las células HCT116, con 24 horas de tratamiento de los compuestos **2a**, **2b**, **3a** y **3b**. En este caso se utilizaron como referencia los complejos *cis*-platino y [Ru(phpy)(NCMe)₂(fen)]PF₆ (RDC11).

El inmunoensayo, que se realizó fue por medio de la técnica de Western Blot con el anticuerpo LDH (H-160), el tiempo de tratamiento de los compuestos en las células fue de 24 horas, aislando las proteínas por rompimiento de la pared celular por sonicación, de acuerdo a lo ya reportado [80]. En la figura 59 se observa la imagen del inmunoensayo, utilizando actina como proteína estándar el cual se realizó en dos membranas diferentes, por ello la diferencia de intensidad de las señales, cada membrana cuenta con una muestra control (sin tratamiento del complejo organometálico) que sirve como referencia. Lo que podemos observar es que el nivel de la expresión de este anticuerpo no cambia de manera significativa con el tratamiento a diferentes concentraciones de los complejos de rutenio y de osmio.

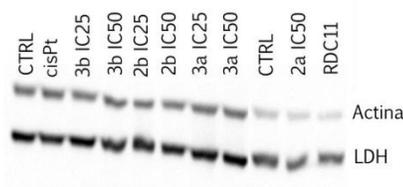


Figura 59. Western Blot del anticuerpo LDH (H-160) utilizando los compuestos **2a**, **3a**, **2b**, **3b**, RDC11 y *cis*-platino.

La LDH es una enzima que podemos encontrar en el citoplasma en casi todas las células, y que pasa al medio extracelular cuando hay un daño en la membrana celular. Se midió la actividad de la LDH en el medio extracelular e intracelular debido a que el NADH que produce la enzima al oxidar L-lactato a piruvato, puede utilizarse cuando el NADH reacciona con una sal de tetrazolio, la reacción con estas sales generalmente da productos coloridos que pueden ser monitoreados por espectroscopia UV-vis, de acuerdo a lo ya reportado [81].

El estudio se realizó en el interior de las células HCT116 (retirando el sobrenadante con una micropipeta) y por otro lado midiendo la actividad de la LDH en el sobrenadante a diferentes tiempos de reacción, de 1 a 24h.

Cuando se mide la actividad de la LDH a tiempos de 1 a 4 horas la influencia de los complejos es apenas perceptible, ya que la actividad es prácticamente la misma del control (sin tratamiento) o cuando tiene el tratamiento con los complejos. En la figura 60a cuando se tiene un tratamiento de 4 a 24 horas se puede observar una disminución de la actividad de la LDH en el sobrenadante, cuando aumenta el tiempo de tratamiento de los complejos organometálicos **2a** y **2b**, así como una menor actividad cuando se incrementa la concentración de los complejos.

Por otro lado, como se muestra en la figura 60b, la actividad de la enzima en el interior de la célula disminuye alrededor de un 20% a diferentes tiempos de reacción y disminuye prácticamente de la misma forma para todas las concentraciones de los complejos. La menor actividad (67%) la observamos para el complejo **2a** a las 24 horas para el IC₂₅.

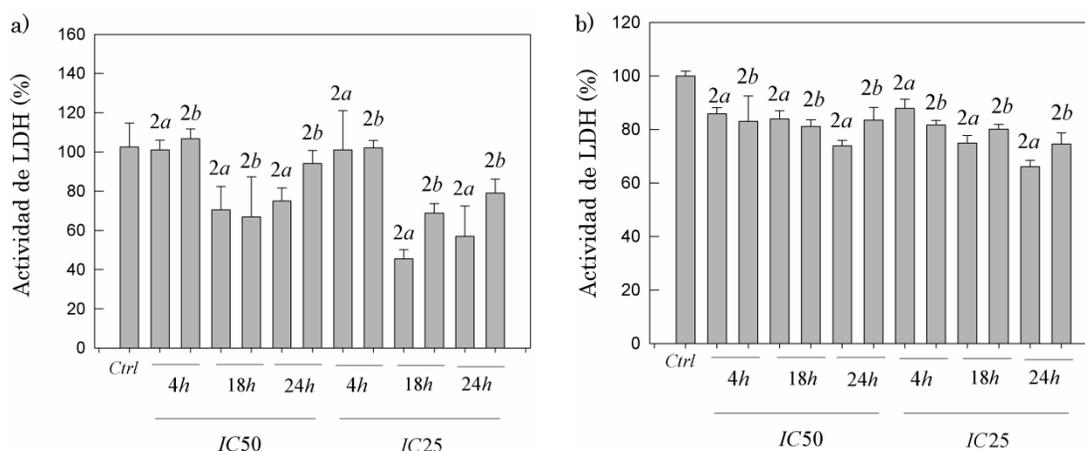


Figura 60. Actividad de LDH en las células HCT116 utilizando los complejos **2a** y **2b**. a) sobrenadante. b) dentro de las células. Los ensayos se llevaron a cabo de 4 a 24 horas.

La influencia de los complejos organometálicos **2a** y **2b** sobre la enzima LDH es notoria en el ensayo realizado en el sobrenadante a tiempos de 18 y 24 horas, corroborando la interacción de estos mismos complejos sobre la enzima purificada cuando se mide la velocidad de la reacción. En este último caso se observa una inhibición de la reacción. Es por ello que se decidió utilizar un inhibidor de la reacción de la LDH para observar el comportamiento de ambos, es decir, los complejos organometálicos y el oxamato, el cual es un inhibidor competitivo de la LDH ya que interactúa en

el sitio activo de la enzima al tener una estructura muy similar a la de los reactivos.

Se midió la viabilidad de las células HCT116 a 24 y 48 horas variando la concentración de oxamato de 0 a 100 mM de acuerdo a lo ya reportado [82], en presencia de los complejos **2a** y **2b** usando la concentración IC_{50} de ambos. Se puede observar en la figura 61, una clara diferencia cuando el tratamiento es a 24 horas, comparándolo con el de 48 horas. En la figura 61a, es decir a 24 horas, se observa que la viabilidad celular alcanza un valor alrededor del 50% hasta la concentración de oxamato 50 mM. Mientras que a las 48 horas de tratamiento se observa que la viabilidad al 50% se obtiene aproximadamente a una concentración de oxamato de 25 mM y a 50 mM se obtiene una viabilidad del 30%.

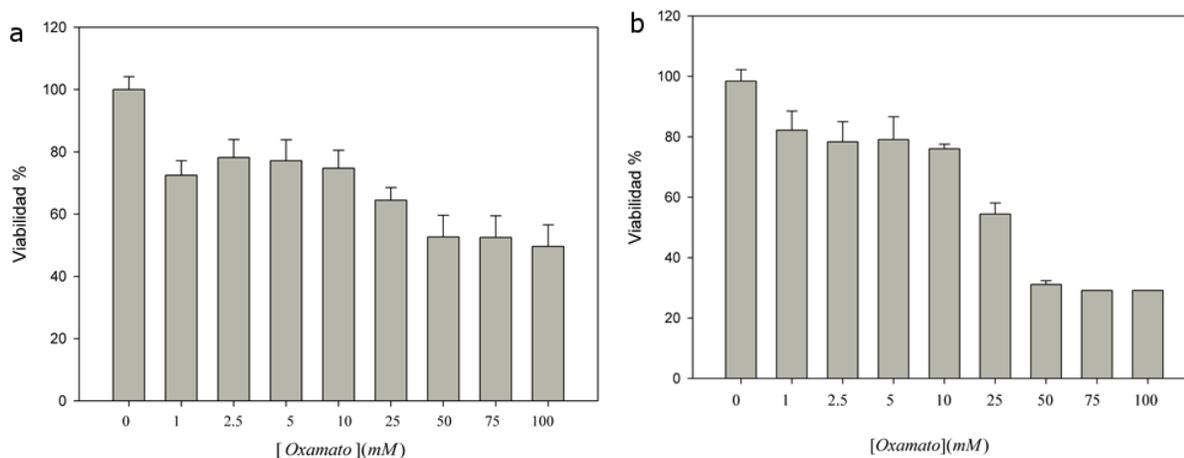


Figura 61. Viabilidad celular utilizando oxamato en la línea celular HCT 116 cáncer de colon. a) 24 horas de tratamiento. b) 48 horas de tratamiento.

También, por otro lado, se puede observar en la figura 62 un efecto sinérgico de actividad citotóxica entre el oxamato y los complejos. Cuando se tratan en una misma celda de reacción las células HCT116 con los complejos y el oxamato se observa el mismo fenómeno sinérgico de disminución de la viabilidad celular.

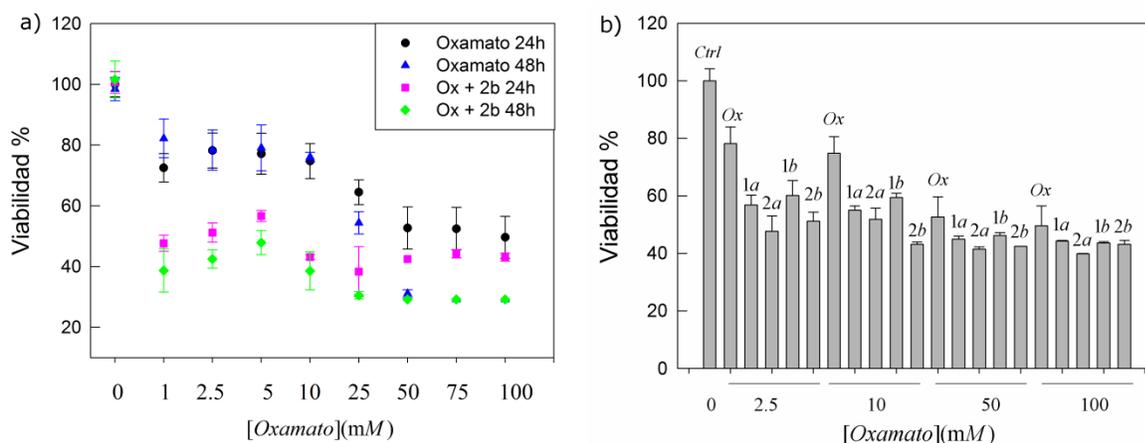


Figura 62. Viabilidad de las células HCT116, a) viabilidad celular a 24 y 48 horas de tratamiento con oxamato y el complejo **2b** a la concentración de IC_{50} , b) diferentes concentraciones de oxamato (Ox), utilizando los complejos **1a**, **2a**, **1b** y **2b**, a la concentración de IC_{50} .

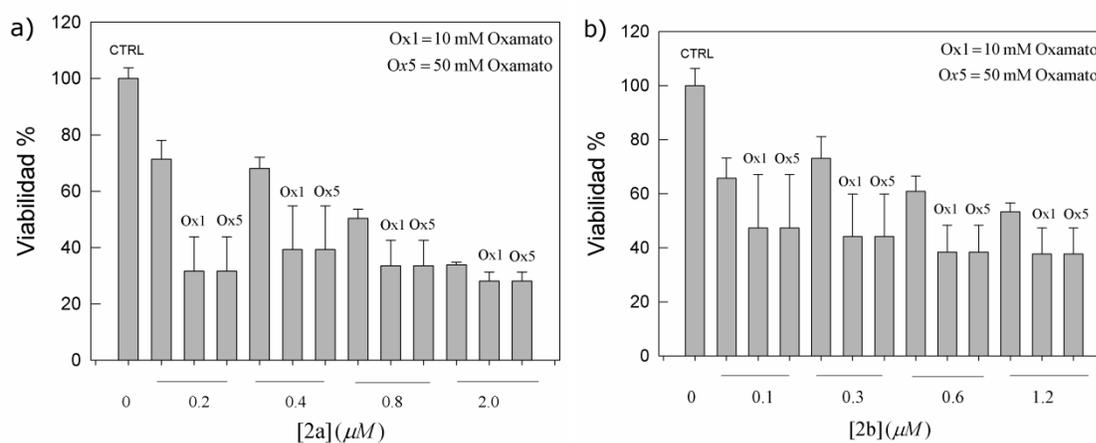


Figura 63. Viabilidad de las células HCT116. a) Tratamiento durante 48 horas con el complejo **2a**, utilizando Ox1 = 10 mM de oxamato y Ox5 = 50 mM de oxamato. b) Tratamiento durante 48 horas con el complejo **2b**, utilizando Ox1 = 10 mM de oxamato y Ox5 = 50 mM de oxamato.

Se puede observar que cuando se utiliza una sola concentración de oxamato y diferentes concentraciones de los complejos organometálicos existe algún tipo de sinergia, es decir, cooperación entre ambos compuestos para obtener un mayor efecto. La viabilidad disminuye considerablemente cuando se utilizan oxamato más los complejos, que cuando sólo se utiliza oxamato o sólo el complejo organometálico.

Cuando hay dos compuestos que presentan actividad citotóxica frente a una línea celular pueden pasar tres efectos: la pérdida de citotoxicidad de uno de los compuestos por causa del segundo compuesto; pérdida de la citotoxicidad de ambos compuestos; aumento de la citotoxicidad por efecto de ambos compuestos [83][84]. Por lo tanto no es de extrañar que el oxamato y los compuestos de rutenio y osmio presenten una mejoría en su citotoxicidad cuando están presentes ambos. Se ha observado su cooperatividad cuando mejora la constante de inhibición con la enzima LDH, cuando se midió su cinética con la enzima purificada. Además los estudios teóricos que se mostraron en la sección previa demuestran que no se contraponen el hecho de que estén el oxamato y los compuestos en la misma región.

Por otro lado, ambos pudieran interactuar con otras enzimas. En el caso de los compuestos de rutenio aunque el efecto inhibitorio no es muy grande, si demuestra que puede interactuar con varias enzimas, en el caso del oxamato pudiera ser lo mismo, debido a que puede ser un inhibidor de diversas enzimas, como pudieran ser las enzimas del ácido cítrico, debido a la similitud estructural del oxamato con estos metabolitos.

Para tratar de entender mejor la interacción de los complejos con las células HCT116, decidimos observar la expresión del ARN dentro de estas células. Hasta el momento se habían realizado estudios con la enzima purificada LDH_{mc}, estudios teóricos y estudios a nivel proteico, además de medir la actividad enzimática en el sobrenadante y dentro de la membrana celular de la lactato deshidrogenasa en las células HCT116 de cáncer de colon.

Los estudios realizados hasta el momento han sido sobre la enzima purificada, y el estudio de la actividad enzimática a nivel celular, así como a nivel proteínico. El paso que faltaba era estudiar la enzima LDH a nivel de regulación en genes.

Se trataron las células HCT116 con los complejos **2a**, **2b**, **3a** y **3b** durante 24 horas, se purificó con el reactivo de TRIzol para obtener el ARN celular y se realizó el ensayo de la reversa transcriptasa para transformar el ARN mensajero obtenido por medio del reactivo de TRIzol para convertirlo en ADN complementario, esto se realizó utilizando 2 mg de ARN. Posteriormente se realizó el ensayo de la reacción cuantitativa en cadena de la polimerasa, comúnmente conocido como q-PCR, usando como fluoróforo SYBR Green.

Se utilizaron los genes LDHA y LDHB, y como gen estándar GADPH. Los resultados del análisis de la reacción en cadena de la polimerasa se referencia al gen GADPH debido a que este no cambia su nivel de expresión. Se puede observar de la figura 64 que hay una menor expresión de los genes LDHA y LDHB cuando las células se someten a tratamiento con los diferentes complejos. Al compararlos con el CTRL (sin tratamiento de ningún complejo) en todos los casos se observa una disminución significativa de su expresión. También existe una tendencia a un mayor efecto, cuando se utiliza una mayor concentración, en este caso el IC₂₅.

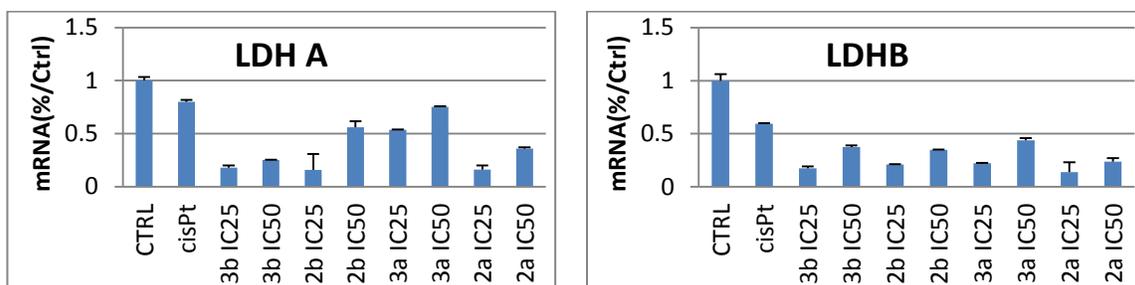


Figura 64. Expresión de los genes LDHA y LDHB con diversos complejos organometálicos. IC₂₅>IC₅₀.

Este efecto de la disminución de la expresión genética de los genes LDHA y LDHB que nosotros observamos pudiera estar controlado por el HIF-1 α debido a que es una proteína que puede regular la expresión génica de la enzima LDH. La proteína HIF-1 α a su vez está regulada por medio de otra oxidorreductasa, la enzima PHD2 [61]. Recordemos que lo que observamos en la figura 64 es el efecto de la expresión de los genes, es decir, no es la interacción directa de los compuestos con la enzima, más bien es el efecto indirecto de los compuestos de rutenio y osmio sobre la expresión de estos genes. Tampoco podemos descartar que pueda ser otra la causa de la disminución de la expresión de los genes LDHA y LDHB, por ejemplo la generación de especies reactivas de oxígeno o la influencia sobre otros genes, que repercute en la expresión de la LDH. Sin embargo, hay muchos puntos que interconectan la LDH y la PHD2.

La enzima LDH es controlada genéticamente por la HIF-1 α , sus metabolitos han sido señalados como puntos clave para entender el metabolismo del cáncer [54][85], el L-lactato se acumula en diversos tipos de cáncer debido a

la glicólisis aeróbica produciendo L-lactato, conocido desde hace más de medio siglo como el efecto Warbug [55]. El piruvato que es el metabolito que se reduce a L-lactato en presencia de la LDH proviene de la glicólisis, vía metabólica controlada genéticamente por la HIF-1 α .

Se sabe que tanto el piruvato como el L-lactato son metabolitos clave para la acumulación de HIF-1 α [86]. Por otro lado las enzimas PHD2 y LDH son oxidorreductasas, esto nos lleva a pensar que los compuestos de rutenio y osmio pudieran interaccionar con las enzimas como en el caso del diseño de mediadores para biosensores [39][40], y que el resultado de esta interacción sea la actividad citotóxica de los compuestos, vía la regulación del factor de hipoxia inducido, que como ya vimos controla una gran cantidad de vías metabólicas. En la figura 65 se observan algunos de los mecanismos en células cancerosas, por los cuales se relacionan la glucólisis, la enzima LDH y el HIF-1 α .

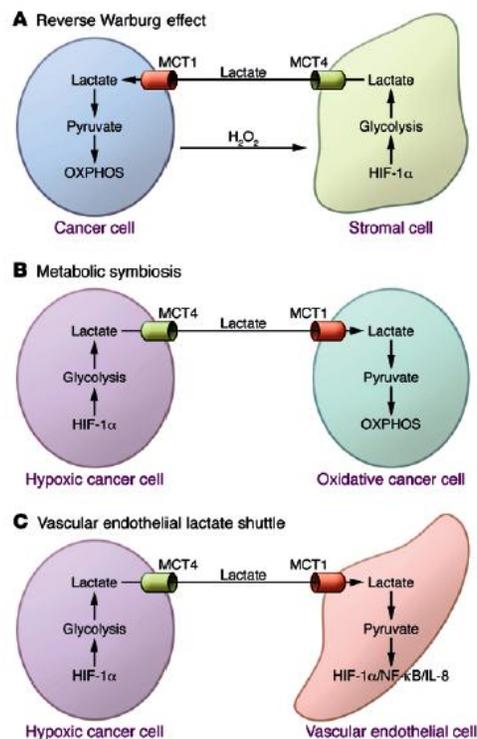


Figura 65. Diversos mecanismos celulares, donde se ven involucrados LDH e HIF1- α [55].

5.5 PROLIL HIDROXILASA

La baja concentración de oxígeno dentro de una célula, propia de un tumor cancerígeno (hipoxia $\approx 1\%$ $[O_2]$) es reconocido como uno de los microambientes con gran influencia sobre el comportamiento de los tumores, tal que permite adquirir mutaciones en diversos genes, promueve la invasión de células cancerígenas a tejidos adyacentes o a tejidos lejanos (metástasis). Los factores de transcripción (proteínas que participan en la regulación de la transcripción del ADN) que regula el factor de hipoxia inducido son numerosos, entre los que se encuentra la metástasis, proliferación celular, muerte celular, entre otros, que son de vital importancia a considerar en un tumor cancerígeno. Otro punto a considerar es que el factor de hipoxia inducido promueve cascadas de señalización para la resistencia a la quimioterapia. Es por esto y por los factores antes relatados que se vuelve de vital importancia conocer la interacción de los compuestos de rutenio y osmio con el factor de hipoxia inducido y/o con la enzima prolil hidroxilasa, ya que este pudiera ser la interacción central que promueva la actividad cancerígena de los compuestos ciclotmetalados.

Los ensayos con la enzima humana prolil hidroxilasa (PHD2) se llevaron a cabo utilizando un sensor de oxígeno para medir la variación de la concentración de oxígeno en una celda de trabajo de 300 μ L.

Primero se utilizó L-prolina como sustrato de la enzima PHD2, esto debido a que es el aminoácido donde se da la hidroxilación, lo cual permitiría probar con diferentes concentraciones del aminoácido, además de ser más sencillo de manipular, comparándolo con la proteína completa. Se adicionó de forma complementaria a la celda de reacción 2-oxoglutarato como cosustrato, $FeCl_2$ para mantener un reservorio de hierro 2+ y ácido ascórbico para conservar el hierro del sitio activo de la enzima en un estado de oxidación 2+ [87]. Sin embargo, en estas condiciones de reacción no se observa una variación en la concentración de oxígeno que nos indique que la reacción se produce.

Bajo estas mismas condiciones se utilizó de manera independiente D-L-prolina y alanina-prolina (adquiridas de forma comercial), debido a que es el aminoácido que se encuentra a lado de las prolinas 402 y 564, pese a haber cambiado el sustrato no disminuye la concentración de oxígeno.

Tabla 16. Compuestos utilizados en la celda de reacción, así como el rango de concentraciones al que fueron utilizados.

Compuesto	Concentración (mol/L)	Observaciones
Prolina*	2×10^{-7} – 0.1	No disminuye la concentración de O ₂ .
2-Oxoglutarato	2×10^{-7} – 0.1	Excepto cuando la concentración de FeCl ₂ es superior a 1×10^{-4} M.
PHD2	1×10^{-9} – 1×10^{-8}	
FeCl ₂	0 – 0.1	
Ac. Ascórbico	0 – 0.1	
Buffer	0.05	

* L-prolina; D-L-prolina y alanina-prolina.

Debido a que no disminuyó la concentración de oxígeno, se decidió utilizar el fragmento de la proteína donde se da la hidroxilación, que es el dominio dependiente de oxígeno que comprende los aminoácidos 401-603. De forma natural se hidroxilan las prolina 402 y 564, por ello se sintetizó el fragmento ODD para los residuos 530-698 expresando en *E. Coli* el plásmido mpRSEHisLipoTEV-ODDD, purificando con una columna de Ni⁺². Posteriormente se agrega la proteasa TEV y se realizan dos columnas sucesivas una columna 30S y una columna de filtración en gel superdex 200, de acuerdo a lo reportado [88]. Sin embargo, en estas condiciones tampoco observamos la disminución de la concentración de oxígeno.

Se concentra la fracción que contenga la proteína a 10 mL y se realiza una columna de filtración en gel superdex 200.

Tabla 17. Compuestos utilizados en la celda de reacción, así como el rango de concentraciones al que fueron utilizados.

Compuesto	Concentración (mol/L)	Observaciones
HIF-1 α (530-698)	5×10^{-5} – 5×10^{-6}	No disminuye la concentración de O ₂ .
2-Oxoglutarato	2×10^{-4} – 1×10^{-6}	
PHD2	5×10^{-9} – 5×10^{-10} M	
FeCl ₂	1×10^{-4}	
Ac. Ascórbico	1×10^{-4}	
Buffer	0.05	

Se llevó a cabo un ensayo adicional, por lo que se compró la proteína HIF-1 α para tratar de observar si se llevaba a cabo la reacción. Sin embargo, a pesar de la variación de concentraciones en los diferentes ensayos, no se observó la disminución de la concentración de oxígeno.

Tabla 18. Compuestos utilizados en la celda de reacción, así como el rango de concentraciones al que fueron utilizados.

Compuesto	Concentración (mol/L)	Observaciones
HIF-1 α	1.2×10^{-8} - 1.2×10^{-7}	No disminuye la concentración de O ₂ .
2-Oxoglutarato	2×10^{-4} - 1×10^{-6}	
PHD2	2.5×10^{-8} - 5×10^{-9} M	
FeCl ₂	1×10^{-4}	
Ac. Ascórbico	1×10^{-4}	
Buffer	0.05	

El método utilizando un sensor de oxígeno ya había sido probado con la enzima glucosa oxidasa y los complejos de osmio, donde se observaba una disminución de la concentración de oxígeno. A pesar de esto, con la enzima prolil hidroxilasa en ninguna de las múltiples condiciones de reacción se observó este fenómeno de disminución de la concentración de oxígeno.

Tratando de comparar con lo ya reportado con los complejos de osmio y la glucosa oxidasa, observamos que en este caso se utilizó una concentración máxima del sustrato de 0.1 M, mismo caso que cuando se utiliza la L-prolina (2×10^{-7} – 0.1) M. Sin embargo, en este caso pensamos que la reacción no se lleva a cabo por utilizar sólo el aminoácido. Cuando utilizamos el fragmento de la proteína HIF-1 α (530-698) tenemos una variación de concentración entre 5×10^{-5} - 5×10^{-6} M, por otro lado cuando se utiliza la proteína completa HIF-1 α se tiene una variación de la concentración entre 1.2×10^{-8} - 1.2×10^{-7} M.

En ambos casos suponemos que no es suficiente la concentración del sustrato para poder observar una pendiente en la variación de la concentración de oxígeno, que nos indique que la reacción se lleva a cabo, debido a la sensibilidad del sensor. Tomando en cuenta la problemática de la sensibilidad del sensor de oxígeno se pensó en adquirir un sensor de oxígeno óptico, no obstante estos utilizan el complejo [Ru(bpy)₃](PF₆)₂ dentro de su sistema de medición, lo cual podría tener interferencia con nuestros compuestos.

Otra cuestión a resolver es tener un protocolo que nos asegure que la enzima PHD2 y la proteína HIF-1 α se encuentran en óptimas condiciones, es decir que no se hayan desnaturalizado y por ende que hayan perdido su actividad. De lo contrario en cualquier intento por observar la reacción va a dar un falso negativo, esto es, la reacción no podrá llevarse a cabo bajo ninguna circunstancia debido a la inactividad de la enzima o de la proteína.

Tanto la enzima PHD2, como la proteína HIF-1 α se adquieren con el proveedor Abnova. Se solicitó con el proveedor un protocolo que nos asegure lo anteriormente mencionado, pero la respuesta fue que los productos salen de sus instalaciones en las óptimas condiciones, negándonos la información. La incertidumbre de las condiciones de traslado de nuestros productos, desde las instalaciones de ABnova, hasta las instalaciones del Instituto de Química nos dejan con la inquietud y desconocimiento acerca de las condiciones reales en las que se encuentran la enzima y la proteína.

Dentro de las opciones que se pueden realizar para observar la cinética de hidroxilación de la proteína HIF-1 α es desarrollar un método para comprobar la actividad de la enzima y de la proteína. Esto puede realizarse en una celda de reacción de 100 μ L con los sustratos y cosustratos necesarios, para posteriormente por medio de un anticuerpo que sólo detecte HIF-1 α o HIF-1 α hidroxilado corroborar por medio de la técnica de Western blot si la reacción se lleva a cabo.

Para tratar de aumentar la concentración de sustrato podríamos utilizar la serie de aminoácidos LXXLAP [87], debido a que es esta secuencia que reconoce la enzima PHD2.

Por último podríamos adquirir un nuevo sensor de oxígeno con mayor sensibilidad, capaz de medir concentraciones más bajas a las utilizadas en el caso de la enzima glucosa oxidasa.

5.6 PROTEÍNAS DISULFURO ISOMERASAS

Se realizó el estudio de cinco diferentes genes de la familia de las proteínas disulfuro isomerasas, para lo cual se compraron los siguientes oligonucleótidos: ERP29, PDI3, PDI4, PDI5 y PDI6. Se siguió el mismo procedimiento para analizar los genes que en el caso de la LDH, en el cual se aísla el ARN con el reactivo de TRIzol, para posteriormente medir 2 mg de ARN y llevar a cabo la reacción de la transcriptasa reversa, para finalmente utilizar de forma cuantitativa la reacción en cadena de la polimerasa, comúnmente llamada RT-qPCR.

Se puede observar que en las células HCT116 tratadas con los compuestos **2a**, **2b**, **3a** y **3b**, hay una disminución en la expresión de los genes ERP29, PDI3, PDI4, PDI5 y PDI6. Esto es un indicativo de que hay una fuerte influencia de los complejos organometálicos con esta familia de enzimas, localizada en el retículo endoplásmico. Si bien la interacción de los complejos no es directa con las enzimas PDI, si nos indica que los compuestos afectan la producción dentro de las células de esta familia de enzimas. Además podemos observar que se tiene una menor expresión en la mayoría de los genes cuando se aumenta la concentración del complejo. Podemos ver de la figura 66 que comparado con el CTRL (sin tratamiento de los complejos), la respuesta es menor, es decir, la expresión del gen es menor cuando hay una mayor concentración del compuesto. Por lo que la expresión de estos genes es dependiente de la concentración del compuesto de osmio o rutenio.

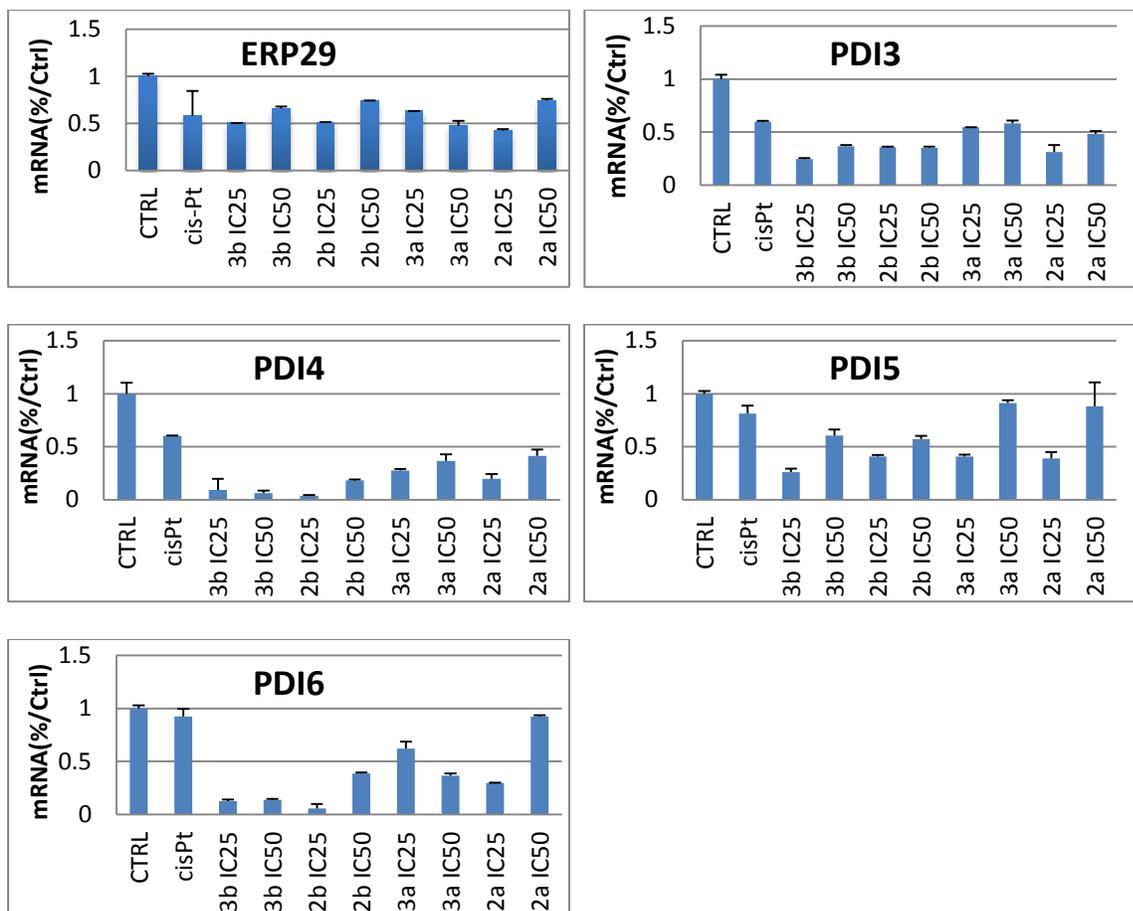


Figura 66. Expresión de los genes ERP29, PDI3, PDI4, PDI5 Y PDI6 con diversos complejos organometálicos. IC₂₅>IC₅₀.

Por otro lado, para complementar el estudio de las enzimas PDI, se observó la expresión a nivel de proteínas, por medio de la técnica de Western Blot con el anticuerpo ERP72 (D70D12) (PDI4). Se utilizó actina como proteína estándar, como se puede apreciar en la figura 67. Esta proteína se expresa con la misma intensidad para servir de referencia. Una diferencia en la intensidad de la luminiscencia en la proteína de estudio, nos indica que hay una modificación en la expresión de esa proteína. En este inmunoensayo podemos observar que el complejo **2a** a la concentración del IC₂₅ tiene un impacto fuerte sobre la expresión de esta proteína, debido a que la intensidad de la señal es menor comparado con el control (CTRL), lo que nos indica que hay una disminución en la expresión de esa enzima por influencia del compuesto. También en el complejo **3b** a la concentración del IC₂₅ se observa una disminución en la expresión de esta proteína, en los demás casos la expresión de la PDI4 es similar a la de la proteína estándar.

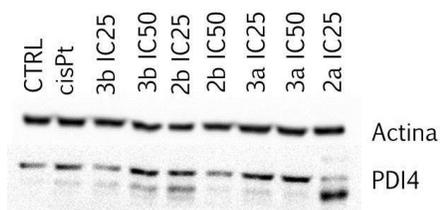


Figura 67. Western Blot utilizando el anticuerpo ERP72 (D70D12) (PDI4) con los complejos **2a**, **2b**, **3a** y **3b**. IC₂₅>IC₅₀.

En el inmunoensayo se observa que al menos con dos de los complejos hay una alteración en la expresión de la enzima PDI4, por otro lado, los ensayos con RT-qPCR nos muestran de forma más clara la alteración sobre los genes ERP29, PDI3, PDI4, PDI5 y PDI6. Por ello decidimos estudiar el orgánulo en donde se encuentra la familia de las PDI, para lo cual estudiamos los agresomas, que son cuerpos de inclusión generados por la formación de agregados proteicos, los cuales pueden generarse por estrés celular, lo que involucra un daño en el retículo endoplásmico.

Se realizaron diferentes ensayos, con tiempo de tratamiento de los compuestos de 6 y 24 horas. Una vez terminado el tiempo, las células se fijan con paraformaldehído 4%, se lisan con Tritón 0.1% y se agrega ProteoStat® Aggresome Detection, el cual dará la fluorescencia con los agresomas.

Se puede observar que hay diferencias en la intensidad de la señal entre el control (CTRL) y los complejos **2a** y **2b**. Además se observa fluorescencia con los compuestos RDC11, MG-132 y tunicamicina (anexos), los cuales fueron utilizados como control positivo de la reacción, ya que se sabe que causan daños en el retículo endoplásmico. Los canales que se utilizaron en el software del equipo para observar la fluorescencia fueron DAPI y Cy5.

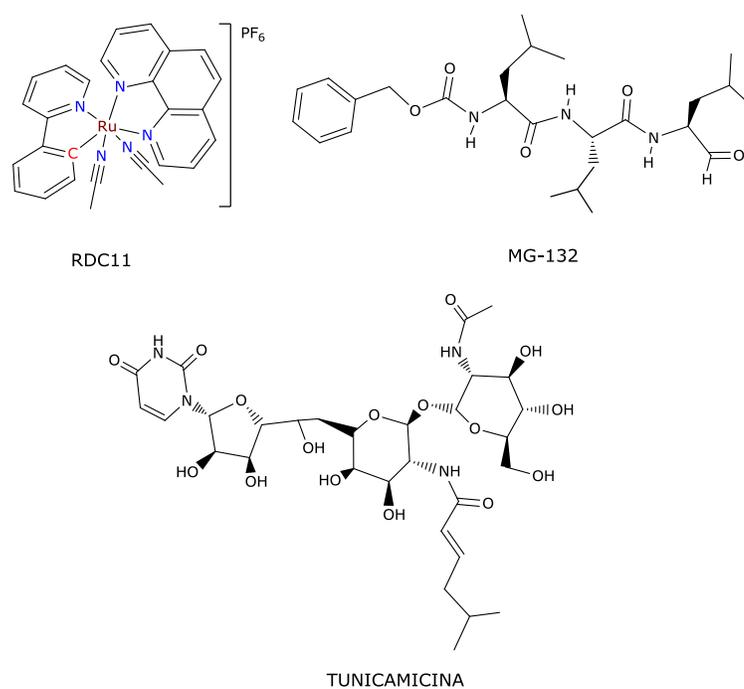


Figura 68. Compuestos utilizados como blanco positivo en daño al retículo endoplásmico.

En este caso se usó Hoechst 33342 Nuclear Stain (color azul) como marcador fluorescente que se une a regiones enriquecidas de adenina y timina en secuencias de ADN, por lo que nos hace referencia a las células que se encuentran presentes en la muestra, al situarse en él núcleo. Mientras que el canal Cy5 hace referencia a la señal detectada cuando la proteína p62 (localizada junto con los agresomas) se une al anticuerpo p62, el cual presenta una señal de fluorescencia.

Se observaron señales de agresomas para el control (CTRL), el compuesto **2b** y el compuesto **2a** a la concentración del IC₂₅. Es evidente que la señal de fluorescencia para el agresoma tiene el siguiente orden **2a**>**2b**>CTRL, es decir, mayor daño en **2a** y **2b** que en el control. En este caso la señal del agresoma se observa con mayor intensidad cuando hubo tratamiento con los complejos organometálicos que en el control (sin tratamiento de compuestos organometálicos). Lo cual nos indica que hay un daño en el retículo endoplásmico y este daño genera la formación de agregados de proteínas. Se realizaron otros ensayos con más compuestos, y a diferentes tiempos de tratamiento, los cuales se muestran en la sección de anexos.

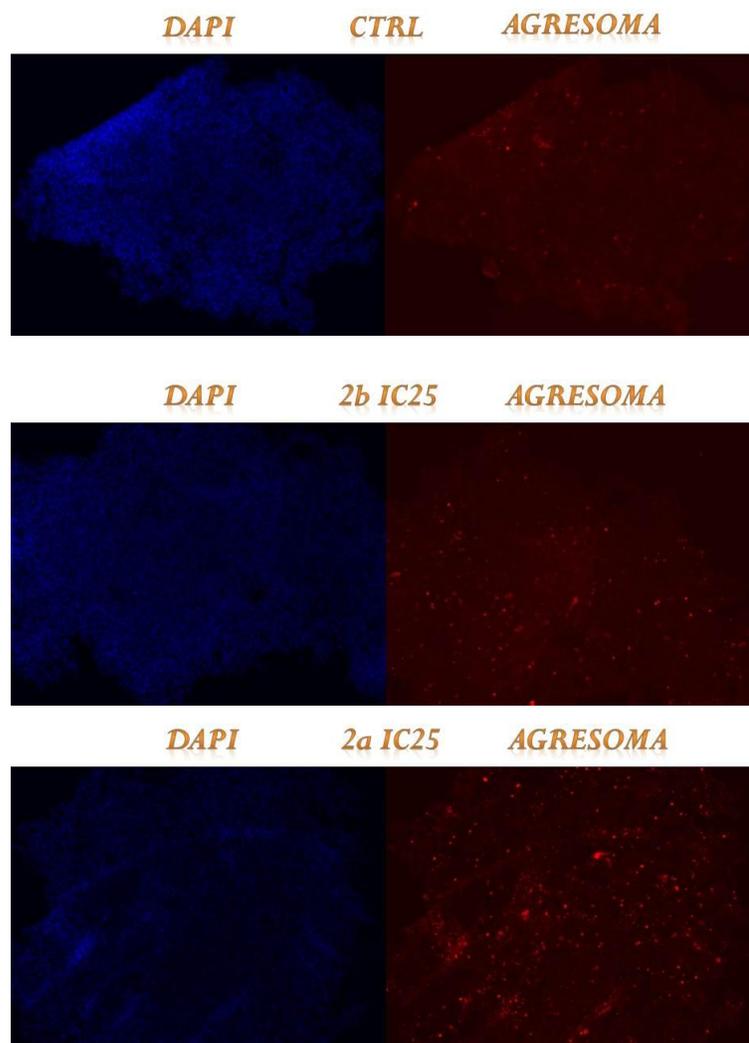


Figura 69. Imágenes de fluorescencia usando los canales DAPI y Cy5. Ensayo a 24 horas de tratamiento.

La generación de daño en el retículo endoplásmico puede ser como consecuencia de la generación de especies reactivas de oxígeno, este tipo de especies reactivas han sido detectadas previamente por el grupo de C. Gaiddon en otros compuestos ciclometalados [71][19]. La consecuencia directa de esta hipótesis es la formación de agregados de proteínas. De forma indirecta observamos la disminución en la expresión de enzimas proteínas disulfuro isomerasas (PDI), lo cual es acorde con lo observado anteriormente, cuando en el ensayo con la reacción en cadena de la polimerasa (qPCR), observamos la disminución de la expresión de los genes de algunas PDI.

5.7 ANÁLISIS ESTRUCTURAL

A pesar de los esfuerzos que se han realizado, el mecanismo de acción de complejos citotóxicos de rutenio y osmio no es del todo claro, incluso en algunos casos es confuso. Lo que pudiera resultar evidente es que el mecanismo de acción depende de la estructura de los complejos y que existen tres factores importantes en el desarrollo de los complejos: *i*) el potencial redox del complejo, *ii*) la lipofilicidad, *iii*) la carga del complejo, las cuales analizaremos comparándolo con otras investigaciones.

Recientemente se han publicado artículos de complejos tipo medio sándwich llamados **RAS** análogos de **Ru-29** o ciclometalados llamados **RDC**, incluidos los compuestos **1a**, **1b**, **2a**, **2b**, **3a**, **3b**, **4**, **5**, y **6**, dónde se relacionan algunas propiedades, como la lipofilicidad y la actividad citotóxica, variando el areno coordinado al metal o modificaciones a los ligantes polipiridínicos [77][89].

En el caso de los compuestos **RAS** cambia de benceno en el compuesto **RAS1**, tolueno en **RAS2**, *p*-cimeno en **RAS3**, hexametilbenceno en **RAS4** y 1,3,5-triisopropilbenceno para **RAS5**; mientras que para los compuestos **RDC** lo que cambia es el ligante polipiridínico, para **RDC1** CN = 3-bromo-fenilpiridinato, NN = fenantrolina, N'N' = ligantes monodentados acetónitrilo; **RDC2** CN = fenilpiridinato, NN = N'N' = fenantrolina; **RDC3** CN = fenil-(5-espermina)piridinato, NN = N'N' = fenantrolina. **RDC4** = NN = N'N' = fenantrolina, ON = 5-hidroxiquinolina. Aunque en este último caso no hay ningún enlace ciclometalado como en los anteriores **RDC**, únicamente es para resaltar la importancia del enlace carbono metal, las estructuras generales de **RDC** y **RAS** se muestran en la figura 70.

Lo que se observa en el caso de los compuestos **RAS** es que por debajo del valor de $\log P_{ow}$ de -1.5 la actividad anticancerosa disminuye considerablemente, cuando aumenta la hidrofobicidad, la actividad citotóxica aumenta considerablemente, en este caso hay un valor de hidrofobicidad de -1.5 que sirve como punto de partida para decidir si un compuesto puede ser hipotéticamente citotóxico. En este caso el benceno es el menos hidrofóbico y 1,3,5-triisopropilbenceno es el más hidrofóbico. Hay que notar que a pesar de que para estos compuestos conforme aumenta la lipofilicidad aumenta la citotóxicidad, son propiamente compuestos hidrofílicos por el carácter del $\log P_{ow}$.

Mientras que los compuestos **RDC** tienen un $\log P_{ow}$ más hidrofóbico con valores alrededor de 2, el compuesto **RDC3** es de carácter hidrofílico con el sustituyente espermina y su valor de IC_{50} aumenta con respecto a los demás. El compuesto **RDC4** es el único que no tiene un enlace ciclometalado y también se nota en su actividad citotóxica, al disminuir su actividad citotóxica casi 10 veces con respecto a **RAS1** y **RAS2**.

Nuestros compuestos **1a**, **1b**, **2a**, **2b**, **3a**, **3b**, **4**, **5**, y **6** tienen un valor de lipofilidad propios de los compuestos **RDC**, los cuales presentan un mejor valor de citotoxicidad cuando el valor del $\log P_{ow}$ es por arriba de 2, mientras que los compuestos que tienen un $\log P_{ow}$ más hidrofílico $\log P_{ow} < 1$ la actividad citotóxica disminuye [89].

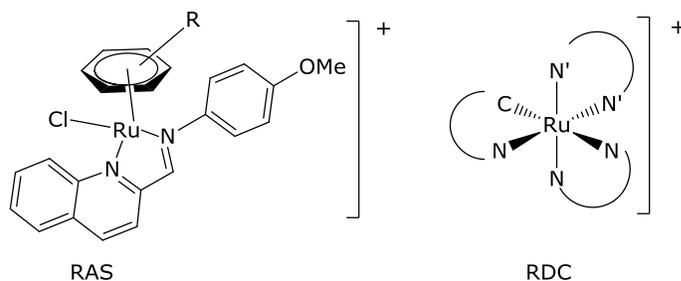


Figura 70. Estructuras generales de los compuestos tipo medio sándwich R = **RAS1** benceno; **RAS2** tolueno; **RAS3** *p*-cimeno; **RAS4** hexametilbenceno; **RAS5** 1,3,5-isopropilbenceno o ciclometalados **RDC1** CN = 3-bromo-fenilpiridinato, NN = fenantrolina, N'N' = ligantes monodentados acetonitrilo; **RDC2** CN = fenilpiridinato, NN = N'N' = fenantrolina; **RDC3** CN = fenil-(5-espermina)piridinato, NN = N'N' = fenantrolina. **RDC4** = NN = N'N' = fenantrolina, ON = 5-hidroxiquinolina.

Tabla 19. Comparación entre diferentes compuestos de rutenio de acuerdo a su lipofilidad y su actividad anticancerígena [77][89].

Compuesto	Log P_{ow}	IC_{50} (μM) HCT116
RAS1	-2.32 ± 0.22	288 ± 44
RAS2	-2.01 ± 0.21	175 ± 22
RAS3	-1.58 ± 0.12	25.5 ± 4.0
RAS4	-1.40 ± 0.15	5.76 ± 1.22
RAS5	-0.85 ± 0.02	1.19 ± 0.12
RDC1	2.05 ± 0.10	1.00 ± 0.5
RDC2	2.35 ± 0.10	0.10 ± 0.05
RDC3	<0	> 50
RDC4	0.85	15.00 ± 5

Recordemos que nuestro compuesto **Ru-29** tiene una menor IC_{50} (108 μ M) que su análogo el **RAS1** (288 μ M). Una de las perspectivas que se tienen es cambiar el areno como en el caso de los compuestos **RAS** para observar si hay una mejoría en la actividad citotóxica, cabe mencionar que hay diferencias entre los compuestos tipo **RAS** y el compuesto ciclometalado **Ru-29** debido a que este último es neutro y los compuestos **RAS** son catiónicos. Sin embargo, del compuesto **Ru-29** hay un análogo que en lugar de tener cloro como ligante, tiene un acetonitrilo, y el compuesto es catiónico.

Aún con los datos obtenidos en este trabajo y los que han sido publicados en la literatura, no podemos formular una correlación directa entre la actividad citotóxica y el potencial redox, debido a que hay algunas inconsistencias. Fetzer y colaboradores probaron diferentes compuestos ciclometalados de rutenio (**RDC**) y de coordinación (análogos a los compuestos polipiridínicos que utilizamos nosotros en este trabajo), frente a la línea celular de cáncer de colon HCT116 y observaron que sus mejores resultados estaban entre 200 y 400 mV vs SCE [89]. Sin embargo, por arriba de 400 mV hay compuestos con una concentración de IC_{50} entre 2-4 μ M, es decir, con una buena actividad citotóxica comparado con el cis-platino con una concentración de IC_{50} de 8 μ M.

Para nuestros compuestos existe un rango de potencial redox mucho más amplio, ya que para el compuesto **2a** con un potencial redox de 800 mV vs SCE hasta el compuesto **3b** con un potencial redox de -316 mV vs SCE y el valor de la concentración de IC_{50} es prácticamente el mismo. La diferencia estructural en este caso es el ligante polipiridínico, mientras que los compuestos RDC usan fenantrolinas, los compuestos de rutenio y osmio **1-3** contienen bipyridinas.

Por otro lado, los resultados obtenidos con las enzimas purificadas GO y LDH no son acordes con los potenciales redox, y la actividad citotóxica, ya que las constantes de inhibición son muy parecidos entre sí, mientras que los potenciales redox son ampliamente diferentes, así como la actividad citotóxica de los compuestos de coordinación **1a** y **2a**, es muy diferente a los compuestos ciclometalados. En este caso la relación entre las enzimas purificadas GO y LDH y los compuestos ciclometalados indican que es probable que los compuestos estén interactuando con las enzimas por un mecanismo de esfera externa, intercambiando electrones con los ligantes del complejo, debido a la similitud de las constantes de inhibición.

Tabla 20. Comparación del potencial redox de los complejos ciclometalados de rutenio y osmio vs SCE en NMe, con 0.1 M de ${}^n\text{Bu}_4\text{NPF}_6$ a 100 mV/s.

Compuesto	$E^\circ(\text{Ru}^{\text{III/II}})/\text{mV vs SCE}$	$\text{IC}_{50} (\mu\text{M}) \text{HCT116}$
RDC1	620	1.00
RDC2	410	0.10
RDC3	520	> 50
RDC4	530	15
1a	1500	>200
1b	933	>200
2a	800	0.3
2b	311	0.5
3a	260	0.4
3b	-316	0.6

Otra causa probable de la diferencia de actividad citotóxica entre los compuestos de rutenio y osmio **1-4** es la carga en el complejo, mientras que en los compuestos de coordinación se tiene al metal en estado de oxidación 2+ con una carga del complejo 2+, en los compuestos ciclometalados se tiene al metal en estado de oxidación 2+, pero con carga del complejo 1+. Sainuddin y colaboradores sintetizaron una serie de ocho compuestos de rutenio polipiridínicos con estado de oxidación 2+ y carga del complejo 1+ y 2+ [90]. Para los complejos con carga 1+ se tiene un enlace carbono metal, es decir se forma un enlace ciclometalado, para los complejos con carga 2+ se utiliza un enlace nitrógeno metal, el resto de la estructura es la misma para el par de complejo 1+ y 2+ (figura 71). Lo que se observa es que para los complejos con carga 1+ la actividad citotóxica frente a la línea celular de melanoma humano SK-MEL-28 es cercano a 1 μM , pero los compuestos con carga 2+ tienen una actividad citotóxica superior a 300 μM , con el mismo comportamiento para la línea celular de leucemia promeolítica humana HL60.

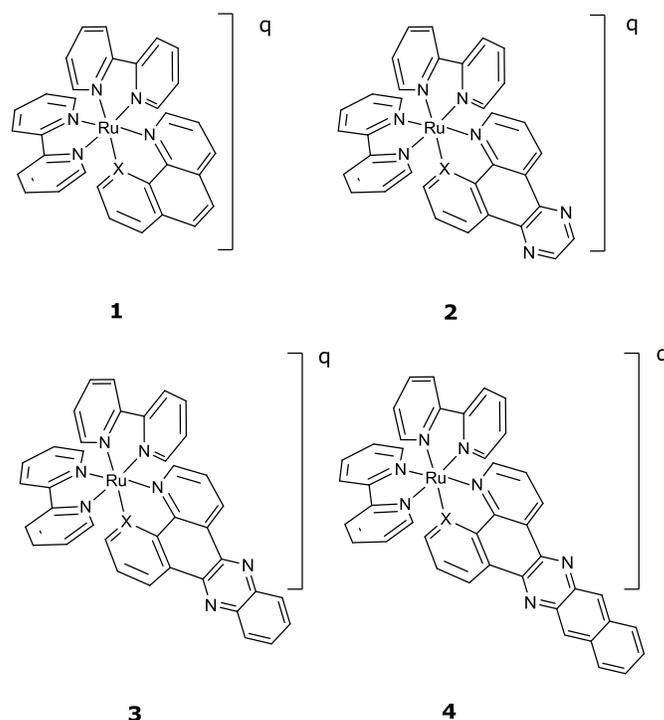


Figura 71. Compuestos de rutenio polipiridínicos con ligantes de organometálicos o de coordinación. X = C, carga del complejo 1+; X = N carga del complejo 2+ [90].

Lo que nos hace replantearnos una cuestión ¿qué es más importante la carga del complejo o el enlace ciclometalado? (incluyendo la reducción del potencial redox). De momento es una incógnita, para resolver esta pregunta nos planteamos dentro de las actividades experimentales tener dos complejos con la misma estructura pero con estado de oxidación diferente, esta parte del proyecto se realizó en colaboración con el Dr. Bernardo Frontana en las instalaciones del Centro Conjunto de Investigación en Química Sustentable UAEM-UNAM.

Desafortunadamente este trabajo quedó inconcluso, debido a problemas en el aislamiento de las especies formadas, es probable que estas especies sean reactivas y que sufran reacciones de oxidorreducción para volver al compuesto original. Otro de los problemas en la purificación es aislarlo de la sal hexafluorofosfato de tetrabutil amonio que sirve como electrolito soporte para conducir las cargas, para ello se ha pensado en utilizar otro electrolito soporte. Se tiene el reporte de un compuesto ciclometalado de rutenio que lograron oxidar manteniendo la misma estructura, sólo modificando el estado de oxidación del metal, el cual utilizaron para medir la cinética de la glucosa oxidasa [48].

El objetivo era establecer un método para oxidar el compuesto $[\text{Ru}^{\text{II}}(\text{phpy})(\text{bpy})_2]\text{Cl}$ a $[\text{Ru}^{\text{III}}(\text{phpy})(\text{bpy})_2]\text{Cl}_2$, y poder aislar la especie oxidada.

La culminación de esta parte experimental es una de las perspectivas que se tienen de este trabajo, lo cual nos permitiría conocer la importancia tanto del enlace carbono metal, como de la carga del complejo. La carga del metal es importante debido a que es probable que no puedan atravesar la membrana celular y por ende la actividad anticancerígena disminuya considerablemente, debido a los mecanismos de transporte celular [91].

6.0 CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

6.0 CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

La propuesta del presente estudio fue obtener información sobre el mecanismo de acción de una serie de compuestos anticancerígenos ciclometalados de rutenio y osmio con ligantes polipiridínicos, que permita el desarrollo de estos complejos como una alternativa a los problemas adversos de los compuestos de platino actualmente utilizados. Se estudió el comportamiento con enzimas oxidorreductasas, particularmente tres: glucosa oxidasa (GO), lactato deshidrogenasa (LDH) y prolil hidroxilasa (PHD2), además de la familia de enzimas proteínas disulfuro isomerasas (PDI).

Con anterioridad se habían estudiado otros compuestos ciclometalados de rutenio y osmio, así como compuestos tipo medio sándwich, o de coordinación. Sin embargo, no se había investigado la interacción de los complejos ciclometalados con enzimas oxidorreductasas. Este trabajo es preliminar y se necesitan de más estudios con otras enzimas oxidorreductasas para comprender de manera completa la actividad citotóxica de los complejos.

Es deseable recalcar los puntos importantes de este trabajo. Primero, el hecho indiscutible de la interacción de los complejos con enzimas oxidorreductasas, con glucosa oxidasa y lactato deshidrogenasa hay inhibición de la actividad enzimática de ambas enzimas, lo cual es un inicio para seguir investigando con otras enzimas oxidorreductasas involucradas en procesos cancerígenos. Pudiera ser que alguna de ellas tenga una interacción mucho más fuerte de la que en este trabajo se obtuvo, o que interaccione con diversas enzimas, y que la suma de todas las interacciones generen la actividad anticancerígena.

Segundo y no menos importante, la reducción en la expresión de los genes de la familia de enzimas PDI, además de la formación de agresomas, lo cual sugiere un daño en el retículo endoplásmico, para confirmar esto hace falta un análisis subcelular de nuestros compuestos. Se sabe que la formación de agresomas puede llevar a la muerte celular por autofagia, la cual es independiente de p53, causante de la resistencia celular. Estos resultados abren un panorama alentador para estos compuestos, debido a su alta

citotoxicidad y la posibilidad de evitar la resistencia a la quimioterapia, dos de los efectos más deseables en la formación de nuevos compuestos anticancerígenos.

Si bien de momento la interacción de los complejos con las enzimas no explican la actividad citotóxica tan diferente entre los complejos de coordinación y los ciclometalados, si es un parámetro para tener en cuenta, debido a que con GO y LDH hay una inhibición de la actividad catalítica de la enzima. Se piensa que los compuestos de rutenio y osmio interaccionan con otras enzimas, algunas de ellas pueden participar directamente en procesos cancerígenos.

También hay que tener en cuenta que los compuestos pueden generar estrés en la célula de tal forma que se creen especies reactivas de oxígeno. El daño en el retículo podría ser causa de estas especies, por lo que se infiere que la aparición de agresomas es debido al daño en el retículo endoplásmico, también la disminución en la expresión de los genes de la familia de enzimas PDI pudiera deberse a la misma razón.

Aun cuando no está confirmado que los compuestos estudiados en este trabajo causen estrés celular, si es factible que la producción de especies reactivas de oxígeno dañen el retículo, como otros compuestos de rutenio se ha visto que lo hacen [71], y que de corroborarse esta hipótesis sería de gran ayuda para desvelar el mecanismo de acción.

Los valores obtenidos de las constantes de inhibición de los compuestos estudiados de osmio y rutenio son muy parecidos, así como su actividad citotóxica es muy parecida. En los estudios realizados en proteínas y genes de las células HCT116, no se aprecia ninguna diferencia considerable entre los compuestos de ambos metales.

A pesar de las diferencias intrínsecas de rutenio y osmio, como el potencial redox o la dureza del metal, la actividad anticancerígena no se ve afectada, lo que indica que el metal por sí solo no cambia la actividad anticancerígena y que depende de la estructura completa del complejo.

7.0 MÉTODOS Y METODOLOGÍA

7.0 MÉTODOS Y METODOLOGÍA

En esta sección se describen los siguientes métodos y condiciones:

- Reactivos
- Equipos
- Síntesis de los complejos ciclometalados de rutenio y osmio.
- Estudio cinético de los complejos ciclometalados con las diferentes enzimas:
 - Glucosa oxidasa (GO)
 - Lactato deshidrogenasa (LDH)
 - Prolyl hidroxilasa (PHD2)
- Estudio de las enzimas PDI
- Síntesis y purificación del fragmento ODD de la proteína HIF-1 α .
- Mantenimiento celular:
 - MTT
 - RT-qPCR
 - Western Blot
- Actividad de la enzima LDH en las células HCT116.
- Medición de agresomas.

7.1 REACTIVOS

Los reactivos pentóxido de fósforo, 2-fenilpiridina, 2,2'-bipiridina, 1,10-fenantrolina, 1,3-ciclohexadieno, magnesio, hexafluorofosfato de potasio, Na_2HPO_4 , NaH_2PO_4 , hidróxido de sodio, acetato de mercurio, piruvato de sodio, L-lactato de sodio, oxamato de sodio, ácido-2-oxoglutarico de sodio, L-prolina, D-L-prolina, alanina-prolina, glucosa, glucosa oxidasa de *Aspergillus Niger* tipo (VII), lactato deshidrogenasa de musculo de conejo tipo (XI), NADH, NAD^+ , cloruro de sodio, imidazol, DTT, cloruro de 2-*p*-yodofenil-3-*p*-nitrofenil-5-fenil tetrazolio, metil sulfato de *N*-metilfenazonio, ácido láctico y los buffers Tris-HCl y HEPES fueron comprados en Sigma Aldrich. El tricloruro de rutenio, hexacloroosmato de sodio y tricloruro de osmio se compraron en Strem Chemicals. La enzima PHD2 y la proteína HIF-1 α se compraron en Abnova, obtenidas a partir de germen de trigo.

Las células humanas HCT116 cáncer de colon, las células humanas de adenocarcinoma de cáncer de colon SW480 y HT-29, las células humanas de adenocarcinoma gástrico AGS y KATOIII fueron adquiridas con ATCC® (Manassa, VA). Las células HCT116 se utilizaron en confluencia (espacio total utilizado por las células) del 80%, para lo cual el conteo inicial de células fue de: Caja con 96 pozos: 1×10^5 células /mL, se agregan 100 μL por pozo. Caja con 24 pozos: 1.5×10^5 células /mL, se agrega 1 mL por pozo. Caja con 12 pozos: 2.5×10^5 células /mL, se agrega 1 mL por pozo. Caja con 6 pozos: 4×10^5 células /mL, se agregan 2 mL por pozo.

7.2 EQUIPOS

Para la caracterización de los productos obtenidos se utilizaron diferentes técnicas espectroscópicas entre ellas la resonancia magnética nuclear (RMN). Esta técnica se llevó a cabo en un equipo JEOL GX 300 (300.5296 MHz para ^1H y 75.5682 MHz para ^{13}C). Las muestras fueron disueltas en los respectivos disolventes deuterados CD_3CN y CDCl_3 . Se tomó como referencia el disolvente deuterado utilizado. La espectrometría de masas se llevó a cabo en un espectrómetro JEOL de alta resolución modelo JMS-SX102A mediante el método de FAB^+ (bombardeo rápido de átomo en forma de ión positivo) utilizando una matriz de alcohol *m*-nitrobencílico. La espectroscopía de infrarrojo se llevó a cabo en un equipo Bruker Alpha-p ATR.

Los estudios electroquímicos se realizaron en un galvanostato potenciostato AUTOLAB modelo PGSTAT12; el electrodo de referencia fue Ag/AgCl saturado, el electrodo de trabajo de carbón vítreo (el cual se tiene que pulir y limpiar cada vez que se utiliza para que esté completamente limpio y así evitar cualquier contaminación en la superficie del electrodo), el electrodo auxiliar fue de platino.

Se utilizó un equipo UV-Vis 2600 Shimadzu para medir a 340 nm el máximo de absorción de NADH con un $\epsilon = 6220 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Se utilizó un controlador de temperatura micromulticell positioner, temperature control, para trabajar en las celdas de reacción a 37°C.

Para medir la variación de la concentración de oxígeno se utilizó un sensor de oxígeno DO166MT pO_2 probe Shelfscientific, utilizando 300 μL de volumen total y un agitador magnético dentro de la celda de trabajo.

Se utilizó el equipo de flujo laminar PSM Flux Laminar Herasafe KS Thermo Scientific Type KS12 para la manipulación celular. Para el mantenimiento de las células a 37°C con 5% de CO_2 se utilizó una incubadora Thermo Scientific Serie 800 WJ. El conteo celular se realizó con una cámara de Malassez.

Para obtener los valores de supervivencia celular se mide a 590 nm en el equipo de TrisStar Multimode Reader LB 942. Berthold Technologies.

Para centrifugar se utilizaron los equipos VWR MicroStar 17R, Eppendorf centrifuge 5810. Para medir la concentración y la pureza del ARN se utilizó

un espectrofotómetro marca Thermo Fisher Nanodrop 1000. Para realizar el ensayo de reversa transcriptasa se utilizó un equipo BioRad T100 Thermal Cycler. Para la RT-qPCR se utilizó un equipo Applied Biosystems 7500 Real Time PCR Systems. Para cuantificar proteína se utilizó un equipo de UV-vis Biotek Instruments UVlite a 595 nm. Para observar los inmunoensayos se utiliza un equipo de SynGen PXi GeneSys. Se utilizaron los microscopios Lavobert Microscope, Zeiss Axio, Apotome Zeiss.

7.3 SÍNTESIS DE LOS COMPUESTOS CICLOMETALADOS DE RUTENIO Y OSMIO

La síntesis de los compuestos de rutenio y osmio se llevaron a cabo bajo las técnicas de Schlenk utilizando nitrógeno como gas inerte. Los disolventes fueron secados con su respectivo agente secante de acuerdo a la tabla 21.

Tabla 21. Agentes secantes para los disolventes utilizados

Disolvente	Agente secante
Diclorometano	Pentóxido de fósforo
Metanol	Metóxido de magnesio
Etanol	Etóxido de magnesio
Acetonitrilo	Pentóxido de fósforo

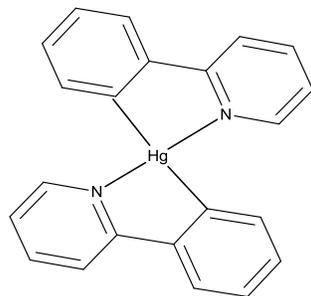
Otros disolventes grado HPLC como éter etílico anhidro, hexano e isopropanol se utilizaron como se recibieron. También se utilizó agua desionizada como fue recibida.

Los compuestos **1a**, **2a**, **3a**, **1b**, **2b**, **3b**, **4**, **5**, **6**, **Ru-29**, **Ru-34** y **Ru-49** que se informan en esta tesis fueron sintetizados conforme a la referencia reportada respectivamente para cada compuesto y caracterizados por las técnicas de IR, ^1H RMN y espectrometría de masas por la técnica de FAB⁺, en todos los casos los datos fueron acordes con lo mencionado en la literatura.

Síntesis del derivado organomercurado [Hg(phpy)₂] [92]

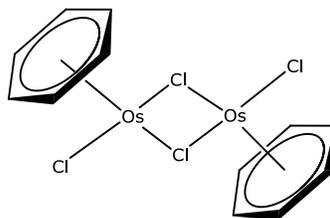
En un matraz bola se mezclan 2.06 mL (14 mmol) de 2-fenilpiridina (phpyH) en 30 mL de etanol absoluto, la mezcla se agita por 30 min, mientras que en otro matraz se mezclan 10.00 g (31 mmol) de acetato mercúrico, 2 mL de ácido acético en 150 mL de etanol absoluto, se agita durante el mismo tiempo. La primera disolución se agrega a la segunda, y la mezcla se agita durante 24 horas. Concluido el tiempo de reacción se calentó a reflujo de etanol por 6 horas y se obtuvo una suspensión blanca que se filtra en caliente. Se evaporó el disolvente y el líquido obtenido se enfría y cristaliza. Los cristales se disuelven en etanol caliente y se filtran, recibéndolos en 150 mL de una solución saturada de NaCl. Se agita por 1 hora para formar un precipitado blanco que se filtra al vacío. El sólido se disolvió en 150 mL de CH₂Cl₂, se agita durante 2 horas y se filtra. Mientras tanto, se prepara una disolución de estanito de sodio a partir de 2.70 g (14 mmol) de SnCl₂ y 5.00

g (125 mmol) de NaOH en 50 mL de agua. En esta disolución se agrega el filtrado anterior y la mezcla permaneció en agitación por 20 min. Después, se separan las 2 fases; a la fase acuosa se le hacen 3 extracciones con CH_2Cl_2 y la fase orgánica se lava con agua y se seca con MgSO_4 , se filtra y evapora hasta sequedad. Finalmente, se hizo una recristalización por par de disolventes con CH_2Cl_2 /etanol. Se obtuvieron 3.52 g (50%) de cristales color blanco.



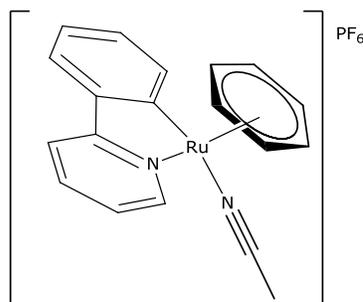
Síntesis del precursor $[\text{OsCl}(\mu\text{-Cl})(\eta^6\text{-C}_6\text{H}_6)]_2$ [93]

En un matraz de Schlenk se agregan 0.97 g (2.75 mmol) de $\text{OsCl}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 3 mL (32 mmol) del 1,3-ciclohexadieno en 50 mL de etanol absoluto, la mezcla de reacción se deja a reflujo de 49 horas. Al término del tiempo se observa un precipitado de color amarillo, el cual se filtra con vidrio poroso y se lava con 30 mL de dietil éter. Se obtienen 820 mg (95%) de un polvo de color amarillo.



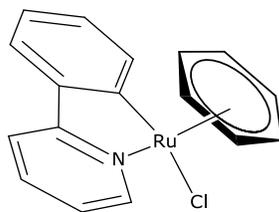
Síntesis del precursor [Os(o-C₆H₄py-κC,N)(η⁶-C₆H₆)(NCMe)]PF₆ [93]

En un matraz de Schlenk se mezclan 100 mg (0.147 mmol) de [OsCl(μ-Cl)(η⁶-benceno)]₂, 12 mg (0.294 mmol) de NaOH, 91 mg (0.588 mmol) de KPF₆, 49 μL (0.294 mmol) de 2-fenilpiridina en 15 mL de acetonitrilo, la mezcla de reacción se deja en agitación por 48 horas a 40°C. Al término del tiempo se evapora el disolvente y se purifica en una columna de alúmina eluyendo con CH₂Cl₂, colectando la fracción amarilla y evaporando el disolvente para obtener 95 mg (54%) de un polvo amarillo.



Síntesis del precursor [OsCl(o-C₆H₄py-κC,N)(η⁶-C₆H₆)] [93]

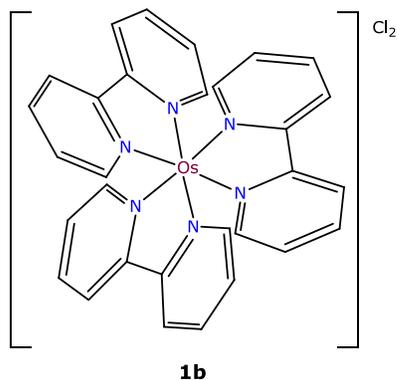
En un matraz de Schlenk se mezclan 100 mg (0.147 mmol) de [OsCl(μ-Cl)(η⁶-benceno)]₂, 49 μL (0.294 mmol) de 2-fenilpiridina en 15 mL de metanol. La mezcla de reacción se deja en reflujo por 24 horas. Al término del tiempo se evapora el disolvente y se purifica en una columna de alúmina eluyendo con CH₂Cl₂, colectando la fracción amarilla, evaporando el disolvente. Se obtiene 80 mg (59%) de un sólido color amarillo.



Síntesis de [Os(bpy)₃]Cl₂ [94]

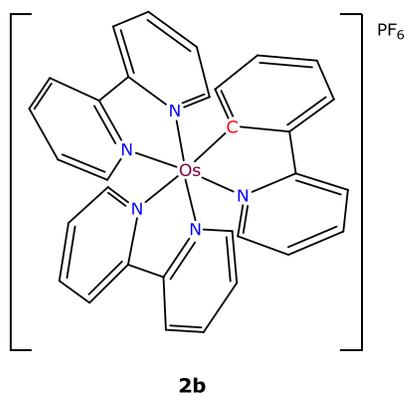
En un matraz de Schlenk se mezclan 100 mg (0.235 mmol) de Na[OsCl₆], en 6 mL de etilenglicol, se deja en agitación por 15 minutos, para posteriormente añadir 110 mg (0.705 mmol) de 2,2'-bipiridina (bpy) dejando

la mezcla de reacción 4 horas a reflujo. Se forma un sólido verde que se filtra y se lava con éter etílico.



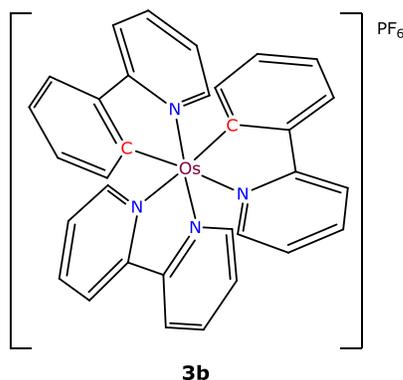
Síntesis de $[Os(o-C_6H_4py-\kappa C,N)(bpy)_2]PF_6$ [95]

En un matraz de Schlenk se mezclan 70 mg (0.114 mmol) de $[Os(o-C_6H_4py-\kappa C,N)(\eta^6-C_6H_6)(NCMe)]PF_6$, 46 mg (0.254 mmol) de 2,2'-bipiridina en 10 mL de metanol, la mezcla de reacción se deja a reflujo por 24 horas. Al término del tiempo se evapora el disolvente y se purifica en una columna de alúmina eluyendo con CH_2Cl_2 -acetonitrilo 90-10, colectando la fracción morada, evaporando el disolvente para obtener 74 mg (68%) de un sólido morado.



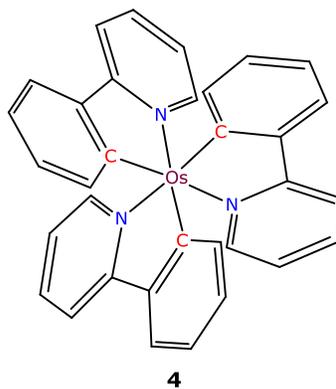
Síntesis de [Os(o-C₆H₄py-κC,N)₂(bpy)]PF₆ [18]

En un matraz de Schlenk se mezclan 100 mg (0.225 mmol) de [OsCl(o-C₆H₄py-κC,N)(η⁶-C₆H₆)], 55 mg (0.110 mmol) de [Hg(o-C₆H₄py-κC,N)₂], 35 mg (0.225 mmol) de 2,2'-bipiridina y 80 mg (0.435 mmol) de KPF₆ en 15 mL de etanol, la mezcla de reacción se agita 30°C por 48 horas. Al término del tiempo se evapora el disolvente y se purifica en una columna de alúmina utilizando como eluyente CH₂Cl₂/NCMe 90-10. Se colecta la banda color café, evaporando el disolvente para obtener 85 mg (49%) de un sólido color café oscuro.



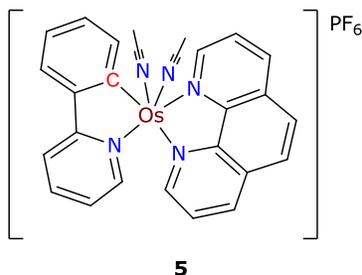
Síntesis de [Os(o-C₆H₄py-κC,N)₃] [18]

En un matraz de Schlenk se mezclan 100 mg (0.225 mmol) de [OsCl(o-C₆H₄py-κC,N)(η⁶-C₆H₆)], 275 mg (0.540 mmol) de [Hg(o-C₆H₄py-κC,N)₂], en 15 mL de metanol, la mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante 25 horas. Al término del tiempo se evapora el disolvente. Se purifica en una columna de alúmina utilizando como eluyente CH₂Cl₂. Se colecta la fracción roja, evaporando el disolvente para obtener 150 mg (96%) de un sólido color café oscuro.



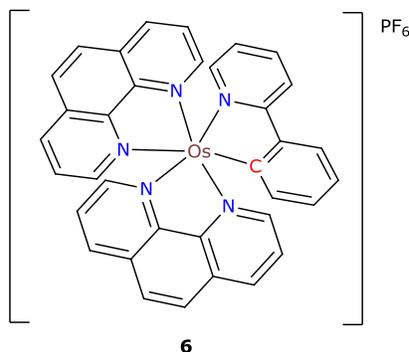
Síntesis de [Os(o-C₆H₄py-κC,N)(fen)(NCMe)₂]PF₆ [93]

En un matraz de Schlenk se mezclan 120 mg (0.204 mmol) de [Os(o-C₆H₄py-κC,N)(η⁶-C₆H₆)(NCMe)]PF₆, 45 mg (0.246 mmol) de 1,10-fenantrolina en 10 mL de acetonitrilo, la mezcla de reacción se deja a reflujo por 48 horas. Al término del tiempo se evapora el disolvente. Se purifica en una columna de alúmina utilizando como eluyente CH₂Cl₂-acetonitrilo 95-5%. Se colecta la fracción morada, evaporando el disolvente para obtener 99 mg (64%) de un sólido color morado.



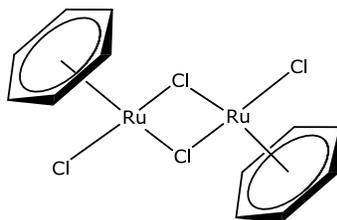
Síntesis de [Os(o-C₆H₄py-κC,N)(fen)₂]PF₆ [93]

En un matraz de Schlenk se mezclan 140 mg (0.228 mmol) de [Os(o-C₆H₄py-κC,N)(η⁶-C₆H₆)(NCMe)]PF₆, 92 mg (0.508 mmol) de 1,10-fenantrolina en 10 mL de metanol, la mezcla de reacción se deja a reflujo por 48 horas. Al término del tiempo se evapora el disolvente. Se purifica en una columna de alúmina utilizando como eluyente CH₂Cl₂-acetonitrilo 99-1%. Se colecta la fracción morada, evaporando el disolvente para obtener 160 mg (82%) de un sólido color morado.

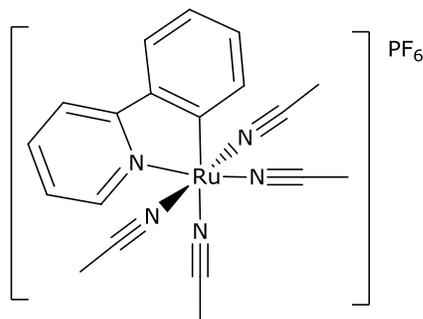


Síntesis del precursor $[\text{RuCl}(\mu\text{-Cl})(\eta^6\text{-C}_6\text{H}_6)]_2$ [96]

En un matraz bola se disuelven 4.69 g (19.0 mmol) de $\text{RuCl}_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ en 100.0 mL de etanol absoluto, se agregan 17.0 mL (128.0 mmol) de 1,3-ciclohexadieno y se calienta a reflujo por 4 horas. Al término del tiempo se enfría a temperatura ambiente. El producto comienza a sedimentarse formándose un sólido café, una vez que todo precipita es filtrado, se obtiene un sólido amorfo, el cual se lava con 40.0 mL de dietiléter y es secado al vacío. Se obtuvo 4.00 g de un sólido color rojo, con un rendimiento del 84%.

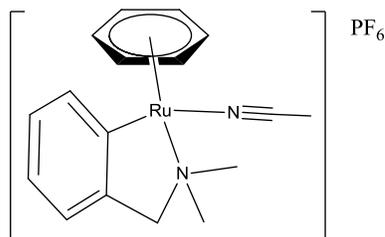
*Síntesis del precursor $[\text{Ru}(o\text{-C}_6\text{H}_4\text{py-}\kappa\text{C,N})(\text{NCMe})_4]\text{PF}_6$ [97]*

En un matraz de Schlenk se mezclan 500 mg (1 mmol) de $[\text{RuCl}(\mu\text{-Cl})(\eta^6\text{ benceno})]_2$, 310 mg (2 mmol) de 2-fenilpiridina, 104 mg (2.6 mmol) de NaOH, 552 mg (3 mmol) de KPF_6 , en 30 mL de acetonitrilo. La mezcla de reacción se deja 20 horas a 45°C. Al término del tiempo se purifica en una columna de alumina, utilizando como eluyente CH_2Cl_2 . Se colecta la fracción amarilla, evaporando el disolvente para obtener 750 mg (65%) de un sólido color amarillo.

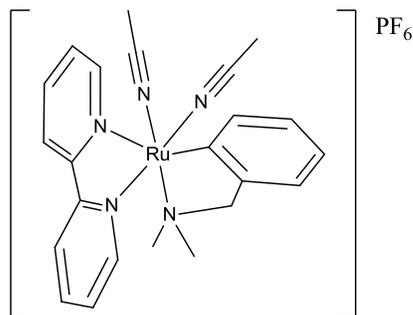


Síntesis del precursor $[Ru(o-C_6H_4CH_2NMe_2-\kappa C,N)(\eta^6-C_6H_6)(NCMe)]PF_6$ [97]

En un matraz de Schlenk se mezclan 500 mg (1mmol) de $[RuCl(\mu-Cl)(\eta^6 \text{ benceno})]_2$, 270 mg (2 mmol) de dimetilbencilamina, 120 mg (3 mmol) de NaOH, 736 mg (4 mmol) de KPF_6 , en 30 mL de acetonitrilo. La mezcla de reacción se deja a temperatura ambiente durante 24 horas. Al término del tiempo se purifica en una columna de alúmina utilizando como eluyente CH_2Cl_2 . Se colecta la fracción amarilla, evaporando el disolvente para obtener 608 mg (61%) de un sólido color amarillo.

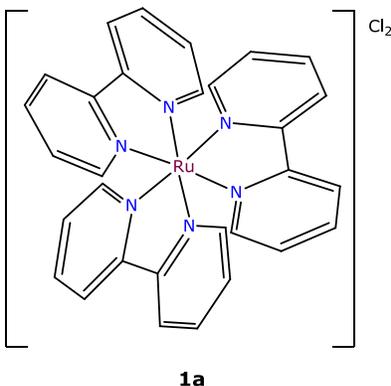
*Síntesis del precursor $[Ru(o-C_6H_4CH_2NMe_2-\kappa C,N)(bpy)(NCMe)_2]PF_6$ [98]*

En un matraz de Schlenk se mezclan 395 mg (0.79 mmol) de $[Ru(o-C_6H_4CH_2NMe_2-\kappa C,N)(\eta^6 \text{ benceno})(NCMe)]PF_6$, 123 mg (0.79 mmol) de 2,2'-bipiridina, en 30 mL de acetonitrilo. La mezcla de reacción se deja a 50°C durante 24 horas. Al término del tiempo se evapora el disolvente y se purifica en una columna de alúmina eluyendo con CH_2Cl_2 . Se colecta la fracción roja oscura, evaporando el disolvente para obtener 404 mg (85%) de un sólido color morado.

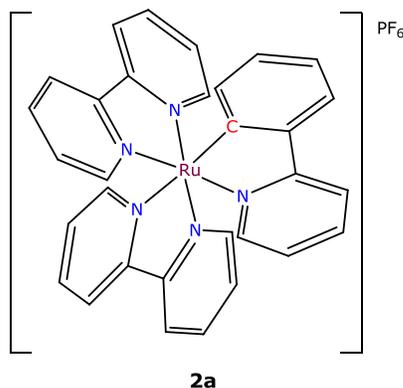


Síntesis de [Ru(bpy)₃]Cl₂ [99]

En un matraz de Schlenk se mezclan 300 mg (1.4 mmol) de RuCl₃, 791 mg (5mmol) de 2,2'-bipiridina, en 4 mL de etilenglicol, la mezcla de reacción se deja a reflujo durante 20 horas. Al término del tiempo se diluye la mezcla de reacción con 12 mL de isopropanol, esta mezcla se agrega gota a gota en éter etílico para precipitarlo sobre las paredes del matraz. Se obtienen 550 mg (60%) de un sólido color anaranjado.

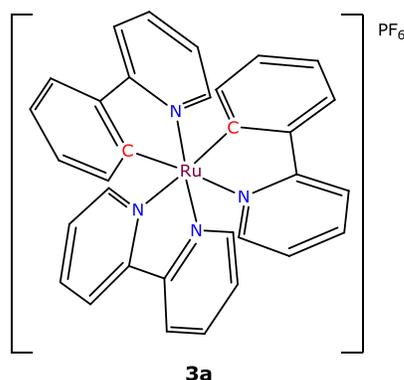
*Síntesis de [Ru(o-C₆H₄py-κC,N)(bpy)₂]PF₆ [17]*

En un matraz de Schlenk se mezclan 500 mg (0.88 mmol) de [Ru(o-C₆H₄py-κC,N)(NCMe)₄]PF₆, 302 mg (1.95 mmol) de 2,2'-bipiridina, en 20 mL de metanol, la mezcla de reacción se deja a reflujo durante 20 horas. Al término del tiempo el disolvente es evaporado y se purifica en una columna de alúmina utilizando como eluyente CH₂Cl₂. Se colecta la fracción morada, evaporando el disolvente se obtienen 810 mg (58%) de un sólido color morado.



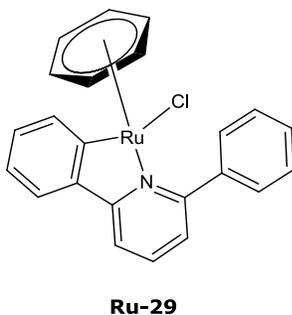
Síntesis de $[Ru(o-C_6H_4py-\kappa C,N)_2(bpy)]PF_6$ [17]

En un matraz de Schlenk se mezclan 120 mg (0.19 mmol) de $[Ru(o-C_6H_4CH_2NMe_2-\kappa C,N)(bpy)(NCMe)_2]PF_6$, 198 mg (0.38 mmol) de $[Hg(phpy)_2]$, en 15 mL de metanol, la mezcla de reacción se deja a reflujo durante 20 horas. Al término del tiempo se purifica en una columna de alúmina eluyendo con una mezcla $CH_2Cl_2/NCMe$ 95-5%. Se colecta la fracción verde, evaporando el disolvente para obtener 66 mg (48%) de un sólido color verde oscuro.



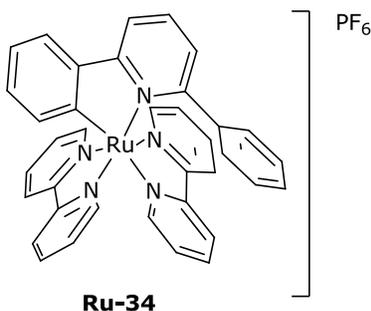
Síntesis de $[Ru(\eta^6-C_6H_6)(o-C_6H_4-2-phpy-\kappa C,N)Cl]$ [74]

En un matraz de Schlenk se mezclan 94 mg (0.20 mmol) de $Hg(ph_2py)Cl$ y 50 mg (0.10 mmol) de $[Ru(\eta^6-C_6H_6)Cl_2]_2$ en 10 mL de metanol. Se calienta a reflujo durante 24 horas. Al término del tiempo se purifica en una columna de alúmina eluyendo con una mezcla $CH_2Cl_2/NCMe$ 90-10%. Se colecta la fracción de color anaranjado, evaporando el disolvente para obtener 48 mg (53%) de un sólido color anaranjado.

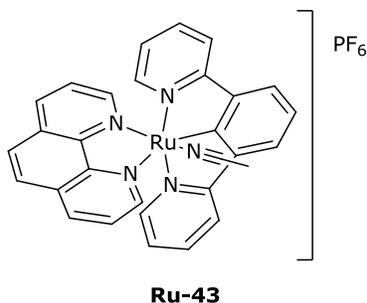


Síntesis del compuesto [Ru(o-C₆H₄-2-Phpy-κC,N)(bpy)₂]PF₆ [74]

En un matraz de Schlenk se mezclan 35 mg (0.226 mmol) de 2,2'-bipiridina, 50 mg (0.112 mmol) de [Ru(η⁶-C₆H₆)(o-C₆H₄-2-phpy-κC,N)Cl] y 41 mg (0.226 mmol) de KPF₆ en 10 mL de metanol. Se calienta a reflujo durante 24 horas. Al término del tiempo se observa una disolución morada, el disolvente es evaporado a sequedad. Al término del tiempo se purifica en una columna de alúmina eluyendo con una mezcla CH₂Cl₂/NCMe 85-15%. Se recupera la fracción de color morado, evaporando el disolvente para obtener 46 mg (52%) de un sólido color morado.

*Síntesis de [Ru[1,3-bis(2-piridil)-C₆H₃-κNCN](fen)(NCMe)]PF₆ [74]*

En un matraz de Schlenk se mezclan 32 mg (0.0642 mmol) de [Ru(η⁶-C₆H₆)Cl₂]₂, 60 mg (0.128 mmol) de [Hg(phpy)₂]Cl, 35 mg (0.385 mmol) de KPF₆ en 10 mL de acetonitrilo. Se deja a temperatura ambiente en agitación durante 2 horas. Al término del tiempo se observa una disolución color anaranjado, el disolvente es evaporado hasta tener 2 mL de acetonitrilo. Se purifica en una columna de alúmina eluyendo con una mezcla CH₂Cl₂/NCMe 50-50% se recupera una fracción de color anaranjado, el disolvente se evapora hasta aproximadamente 10 mL. A esta disolución se adicionan 11 mg (0.128 mmol) de 1,10-fenantrolina, la mezcla de reacción queda bajo agitación a temperatura ambiente durante 24 horas. Al término del tiempo se observa una disolución roja, el disolvente es evaporado a sequedad. Se purifica en una columna de alúmina eluyendo con CH₂Cl₂ se recupera una fracción de color rojo. Se obtienen 32 mg (69%) de un sólido de color rojo.



Intercambio de contraión por reacción de metátesis.

Para mejorar la solubilidad en agua de los complejos organometálicos **1a**, **2a**, **3a**, **1b**, **2b** y **3b**, **5**, **6**, **Ru-29**, **Ru-34** y **Ru-43** en agua, se realizó una reacción de metátesis, es decir un intercambio del anión PF_6^- por Cl^- con una columna Dowex 8x 100 en forma de cloruros [100].

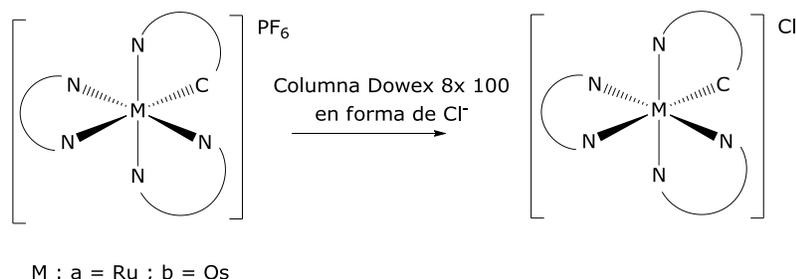


Figura 72. Intercambio de contraión de PF_6^- a Cl^- para mejorar la solubilidad de los complejos organometálicos [100].

El compuesto se disuelve en metanol, o mezcla metanol acetonitrilo, se hace una pequeña columna de 0.2 cm de diametro con la resina Dowex 8x 100 utilizando como eluyente una mezcla 1:1 metanol-acetonitrilo. La desaparición de la banda a 830 cm^{-1} en el espectro de IR indica el completo intercambio de contraión.

7.4 ESTUDIO DE LOS COMPLEJOS CICLOMETALADOS CON LAS ENZIMAS

En esta sección se describe la metodología que se siguió para medir las cinéticas con las enzimas glucosa oxidasa, lactato deshidrogenasa y prolil hidroxilasa y los compuestos de rutenio y osmio. Se utilizaron dos diferentes metodologías. Para las enzimas GO y PHD2 se utilizó un sensor de oxígeno, mientras que para la enzima LDH se utilizó un equipo UV-Vis.

7.4.1 GLUCOSA OXIDASA (GO)

Estudio cinético de la glucosa oxidasa.

Se monitoreó la reacción enzimática de la oxidación de β -D-glucosa a δ -D-gluconolactona a 25°C, midiendo la concentración de oxígeno utilizando un sensor de oxígeno DO166MT pO₂ probe Shelfscientific, un buffer de acetatos 0.1 M a pH = 5, las concentraciones de glucosa fueron 0.1, 0.05, 0.025, 0.0125, 0.0062 y 0.0031 M, en presencia de $[1 \times 10^{-8}]$ M de glucosa oxidasa utilizando los compuestos de osmio [Os(bpy)₃]Cl₂, [Os(o-C₆H₄py- κ C,N)(bpy)₂]Cl, [Os(o-C₆H₄py- κ C,N)₂(bpy)]Cl, [Os(phpy)₃]. La disolución stock de glucosa se preparó en agua desionizada, todos los complejos se disolvieron en agua desionizada con 10% de metanol para tener una disolución stock de 0.03 M, excepto el complejo [Os(phpy)₃], el cual se disolvió en agua desionizada con 20% de DMSO. Las concentraciones de los complejos de osmio en la celda de reacción fueron 0.00125, 0.0025, 0.005 y 0.01 M.

Las cinéticas de reacción se midieron en ausencia y presencia de los complejos organometálicos, dejando 10 segundos de agitación antes de añadir la enzima, momento en el cual comienza la reacción. Se monitoreó la reacción de 0 a 480 segundos, tomando la parte lineal del decremento de la concentración de oxígeno con respecto del tiempo, como velocidad inicial. En todo momento se mantuvo una agitación constante.

7.4.2 LACTATO DESHIDROGENASA (LDH)

Estudio cinético de la lactato deshidrogenasa.

Se midió la cinética de oxidación de piruvato a L-lactato y la reducción de L-lactato a piruvato así como la conversión de NADH a NAD⁺ a 340 nm debido a que el NADH tiene un máximo de absorción $\epsilon = 6220 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Se monitoreó la concentración de NADH en un equipo Shimadzu UV-Vis 2600. En la reacción de oxidación se midió el decremento de la absorbancia del NADH de 0 a 480 segundos y en la reacción de reducción se midió la aparición de la absorbancia de NADH a 340 nm de 0 a 1800 segundos. Estas reacciones se midieron a 37°C, utilizando un buffer de fosfatos 0.05 M a pH = 7.5. Se utilizaron los compuestos de rutenio [Ru(bpy)₃]Cl₂, [Ru(o-C₆H₄py-κC,N)(bpy)₂]Cl, [Ru(o-C₆H₄py-κC,N)₂(bpy)]Cl, y de osmio [Os(bpy)₃]Cl₂, [Os(o-C₆H₄py-κC,N)(bpy)₂]Cl, utilizando tres diferentes concentraciones 5×10^{-5} , 1×10^{-4} y 2×10^{-4} M. Todos los complejos se disolvieron en agua desionizada con 10% metanol para tener un stock de 1×10^{-3} M. Se preparó una disolución stock de la enzima LDH 2×10^{-8} M y se utilizó a una concentración de 4×10^{-10} M dentro de la celda de reacción.

El stock de los reactivos NAD⁺, L-lactato y piruvato se preparó en agua destilada, mientras que el stock de NADH se preparó en 0.03 M de Na₂CO₃.

Actividad de LDH en células de cáncer de colon HCT116.

Se midió la actividad de LDH en la línea celular HCT116 cáncer de colon en el sobrenadante y dentro de las células, en presencia de oxamato y de los complejos organometálicos de acuerdo al procedimiento previamente descrito [81]. La extracción de ARN de las células HCT116 cáncer de colon fue utilizando el reactivo de TRIzol, para posteriormente realizar la reacción de la transcriptasa reversa con 2 mg de ARN, seguido por q-PCR en el equipo Bio-Rad iCycler thermal cycler utilizando iQ SYBR Green supermix (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Se utilizaron los genes LDHA y LDHB, y como gen estándar GAPDH. El análisis de proteínas por medio de la técnica de Western Blot se realizó conforme a lo reportado [80]. El inmunoensayo se realizó con el anticuerpo LDH (H-160) utilizando actina como anticuerpo estándar. Las membranas se revelaron utilizando como anticuerpo secundario peroxidasa de rábano-conjugada (anti-rabbit 1/10000, -mouse

1/10000, Thermo Fisher, IL), y se reveló con ECL (Thermo Fisher, IL) utilizando para su visualización el equipo SynGen PXi GeneSys.

Estudio teórico de LDH.

Los datos de las estructuras de rayos X para los compuestos **1a** [101] y **2a** [102] fueron optimizados utilizando la teoría de DFT en Gaussian 09 rev. B.01. Los parámetros híbridos de Becke [103][104], así como las correlaciones funcionales Lee-Yang-Parr [105], fueron usados en la máxima optimización geométrica. La optimización de rutenio fue realizada por la serie lan12dz [106][107][108], para los demás átomos se usó la serie 6-31+G(d). Mientras que la estructura de la LDH se tomó del Protein Data Bank. Las estructuras optimizadas de los complejos **1a** y **2a** fueron acopladas al tetrámero de LDH utilizando Autodock [109]. El primer paso fue localizar los sitios de unión de los complejos **1a** y **2a**, posicionándolos de forma aleatoria en las cercanías del confórmero abierto. La dimensión del espacio se estableció como 126x126x126 Å, por una separación de cada punto de 0.375 Å. Cincuenta repeticiones fueron desarrolladas con 27,000 operaciones algorítmicas sobre una simple población de 150 individuos. Todos los resultados de los compuestos **1a** y **2a** fueron agrupados en 53 grupos. Cada modo de unión de las 53 agrupaciones fue seleccionada para acoplarse en las cercanías del sitio de unión en una celda de 60x60x60. La separación entre puntos fue de 0.375 Å. Diez algoritmos genéticos Lamarkianos fueron desarrollados sobre una simple población de 150 individuos. Para cada proceso de acoplamiento las cargas de Gasteiger fueron asignadas, para todos los átomos no metálicos de la proteína y el complejo. La carga neta para el átomo de rutenio fue de 2+. Las gráficas obtenidas fueron preparadas utilizando Pymol [110].

7.4.3 PROLIL HIDROXILASA (PHD2)

Estudio cinético de la prolil hidroxilasa.

Para el estudio de la enzima prolil hidroxilasa se utilizó un sensor de oxígeno DO166MT pO₂ probe Shelfscientific para medir la variación de la concentración de oxígeno en una celda de trabajo. El volumen total de la

celda de trabajo fue de 300 μ L, se utilizaron los buffers de fosfatos, Tris-HCl y HEPES a una concentración de 0.05 M a un pH = 7.5.

Síntesis del fragmento ODD de la proteína HIF-1 α .

El segmento de la proteína HIF-1 α ₍₅₃₀₋₆₉₈₎ se sintetizó y purificó de acuerdo al siguiente protocolo [88]:

Expresión de HIF-1 α de los residuos 530-698 en E. Coli con el plásmido mpRSETHisLipoTEV-ODDD.

Se transformó el plásmido mpRSETHisLipoTEV-ODDD en *E. Coli C41* una noche antes de la expresión, inoculando 50 mL de 2xTY con ampicilina 100 μ g/ml. Se incubó durante 3 horas a 37 °C, transfiriendo 10 mL de cultivo a 1L de 2xTY con ampicilina 100 μ g/ml. El medio se precalentó a 37°C antes de agregar los 10 mL del cultivo. Este cultivo se incubó a 37°C hasta que la densidad óptica a 600 nm alcanzó 0.8. Posteriormente se agregó IPTG para tener una concentración dentro del matraz de 1 mM y se agregó ampicilina fresca a una concentración final de 50 μ g/ml. Se continuó incubando por 4 horas más a 37 °C. Se centrifugan las células y se congelan con nitrógeno líquido.

Purificación de HIF-1 α residuos 530-698.

Al pellet obtenido se le agregan 30 mL de buffer de lisis, inhibidor de proteasas y 1 mg/mL de lisozima. El sobrenadante obtenido se purifica utilizando una columna de Ni⁺².

Se digiere la proteína de fusión con la proteasa TEV. Y posteriormente se realiza una columna 30S 0-100% de buffer B, con un flujo de 5 mL/min.

Columna-S Buffer A	Columna-S Buffer B
50 mM Tris-HCl pH=7.2, 30 mM NaCl	50 mM Tris-HCl pH=7.2, 1 M NaCl

Se concentra la fracción que contenga la proteína a 10 mL y se realiza una columna de filtración en gel superdex 200.

Gel Filtración buffer: 50 mM Tris pH = 7.2, 300 mM NaCl, 10 % glicerol, 5 mM de DTT.

7.4.4 PROTEÍNAS DISULFURO ISOMERASAS (PDI)

Estudio de las enzimas PDI con los complejos organometálicos.

Para medir la influencia de los complejos sobre las PDI se utilizaron dos métodos distintos.

Se utilizó la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa RT-qPCR la cual amplifica millones de veces una secuencia específica de ADN, esta técnica permite detectar cambios en la expresión de los genes mediante los niveles de ARN procedentes de las células. Para ello se utilizaron los genes ERP29, PDI3, PDI4, PDI5, PDI6 con los compuestos **2a**, **2b**, **3a** y **3b**.

Estudio de agregados de proteínas.

Se midió la actividad de los compuestos organometálicos en el retículo endoplásmico de acuerdo al método reportado previamente [111]. Los ensayos se realizaron en una caja estéril de 24 pozos, a la que se le añadió un portaobjetos circular. Para poder fijar las células se añadió L-ornitina a 50µg/mL. Se agregó ProteoStat® Aggresome Detection, para medir la fluorescencia con los agresomas. Se observó la fluorescencia con los microscopios Zeiss Axio, Apotome Zeiss.

8.0 REFERENCIAS

8.0 REFERENCIAS

1. Mathey, F. *Transition Metal Organometallic Chemistry*; Springer; Singapur, Singapur, **2013**.
2. Kim, J.; Rees, D. C. Nitrogenase and biological nitrogen fixation. *Biochemistry* **1994**, *33*, 389–397.
3. Scott, J. M.; Molloy, A. M. The discovery of vitamin B12. *Ann. Nutr. Metab.* **2012**, *61*, 239–245.
4. Perutz, M. F. Structure and function of hemoglobin. *Harvey Lect.* **1969**, *63*, 213–261.
5. Huaizhi, Z. China's Ancient Gold Drugs. *Gold Bull.* **2001**, *34*, 24–29.
6. Litwack, G. *Hedgehog Signaling*; Elsevier; California, EUA, **2012**.
7. Scior, T.; Hans-Georg, M.; Guevara-García, J. A. *La investigación del vanadio en la BUAP; Textos Científicos*; Puebla, México, **2014**.
8. Prestayko, A. W.; D'Aoust, J. C.; Issell, B. F.; Crooke, S. T. Cisplatin (*cis*-diamminedichloroplatinum). *Cancer Treat. Rev.* **1979**, *6*, 17–39.
9. Hughes, M. F.; Beck, B. D.; Chen, Y.; Lewis, A. S.; Thomas, D. J. Arsenic exposure and toxicology: A historical perspective. *Toxicol. Sci.* **2011**, *123*, 305–332.
10. Grandjean, P.; Satoh, H.; Murata, K.; Eto, K. Adverse effects of methylmercury: Environmental health research implications. *Environ. Health Perspect.* **2010**, *118*, 1137–1145.
11. SEMARNAT, *Seguimiento a las acciones de contención del riesgo, preparación del sitio y remediación del predio (ex fábrica de cromatos de México)*; México, **2012**.
12. Kauffman, G. B.; Pentimalli, R.; Doldi, S.; Hall, M. D. Michele Peyrone (1813-1883), discoverer of Cisplatin. *Platin. Met. Rev.* **2010**, *54*, 250–256.
13. Rosenberg, B.; Van Camp, L.; Krigas, T. Inhibition of cell division in escherichia coli by electrolysis products from a platinum electrode. *Nature* **1965**, *205*, 698–699.
14. Lebwohl, D.; Canetta, R. Clinical development of platinum complexes in cancer therapy: an historical perspective and an update. *Eur J Cancer* **1998**, *34*, 1522–1534.
15. Spreckelmeyer, S.; Orvig, C.; Casini, A. Cellular transport mechanisms of cytotoxic metallodrugs: An overview beyond cisplatin. *Molecules* **2014**, *19*, 15584–15610.
16. Seddon, E. A.; Seddon, K. R. *The chemistry of ruthenium*; Elsevier; Amsterdam, The Netherlands, **1984**.
17. Le Lagadec, R.; Alexandrova, L.; Estevez, H.; Pfeffer, M.; Laurinavičius, V.; Razumiene, J.; Ryabov, A. D. Bis-ruthena(III)cycles [Ru(C \equiv N)₂(N \equiv N)]PF₆ as low-potential mediators for

- PQQ alcohol dehydrogenase (C \cap N = 2-phenylpyridinato or 4-(2-tolyl)-pyridinato, N \cap N = bpy or phen). *Eur. J. Inorg. Chem.* **2006**, 2, 2735–2738.
18. Cerón-Camacho, R.; Hernández, S.; Le Lagadec, R.; Ryabov, A. D. Cyclometalated [Os(C-N)_x(N-N)_{3-x}]^{m+} mimetics of tris(2,2'-bipyridine)osmium(II): covering a 2 V potential range by known (x = 0, 1) and new (x = 2, 3) species (C-N = o-2-phenylpyridinato). *Chem. Commun.* **2011**, 47, 2823–2825.
19. Meng, X.; Leyva, M. L.; Jenny, M.; Gross, I.; Benosman, S.; Fricker, B.; Harlepp, S.; Hébraud, P.; Boos, A.; Wlosik, P.; Bischoff, P.; Sirlin, C.; Pfeffer, M.; Loeffler, J. P.; Gaidon, C. A ruthenium-containing organometallic compound reduces tumor growth through induction of the endoplasmic reticulum stress gene CHOP. *Cancer Res.* **2009**, 69, 5458–5466.
20. Boff, B.; Gaidon, C.; Pfeffer, M. Cancer cell cytotoxicity of cyclometalated compounds obtained with osmium(II) complexes. *Inorg. Chem.* **2013**, 52, 2705–2715.
21. <http://www.cancerresearchuk.org/>.
22. <http://globocan.iarc.fr/Default.aspx>.
23. Alessio, E. *Bioinorganic Medicinal Chemistry*; Wiley; Weinheim, Germany, **2011**.
24. Helmlinger, G.; Sckell, A.; Dellian, M.; Forbes, N. S.; Jain, R. K. Acid production in glycolysis-impaired tumors provides new insights into tumor metabolism. *Clin. Cancer Res.* **2002**, 8, 1284–1291.
25. Chaudary, N.; Hill, R. P. Hypoxia and metastasis. *Clin. Cancer Res.* **2007**, 13, 1947–1949.
26. Bertrand, B.; Casini, A. A golden future in medicinal inorganic chemistry: the promise of anticancer gold organometallic compounds. *Dalton Trans.* **2014**, 43, 4209–19.
27. Novohradsky, V.; Liu, Z.; Vojtiskova, M.; Sadler, P. J.; Brabec, V.; Kasparkova, J. Mechanism of cellular accumulation of an iridium(III) pentamethylcyclopentadienyl anticancer complex containing a C,N-chelating ligand. *Metallomics* **2014**, 6, 682–690.
28. Jungwirth, U.; Kowol, C. R.; Keppler, B. K.; G., C. H.; Berger, W.; Heffete, P. Anticancer activity of metal complexes: Involvement of redox processes. *Antioxid Redox Signal.* **2011**, 15, 1085–1127.
29. Siddik, Z. H. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene* **2003**, 22, 7265–79.
30. Kelland, L. R. New platinum antitumor complexes. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **1993**, 15, 191–219.
31. Masters, J. R. W.; Köberle, B. Curing metastatic cancer: Lessons from testicular germ-cell tumours. *Nat. Rev. Cancer* **2003**, 3, 517–25.
32. Köberle, B.; Tomicic, M. T.; Usanova, S.; Kaina, B. Cisplatin resistance: Preclinical findings and clinical implications. *Biochim. Biophys. Acta* **2010**, 1806, 172–182.
33. Dyson, P. J.; Sava, G. Metal-based antitumour drugs in the post genomic era. *Dalton*

Trans. **2006**, 1929–1933.

34. Dougan, S. J.; Habtemariam, A.; McHale, S. E.; Parsons, S.; Sadler, P. J. Catalytic organometallic anticancer complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2008**, *105*, 11628–11633.
35. Antonarakis, E.S.; Emadi, A. Ruthenium-based chemotherapeutics: are they ready for prime time? *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2010**, *66*, 1–9.
36. Leyva, L.; Sirlin, C.; Rubio, L.; Franco, C.; Le Lagadec, R.; Spencer, J.; Bischoff, P.; Gaiddon, C.; Loeffler, J. P.; Pfeffer, M. Synthesis of cycloruthenated compounds as potential anticancer agents. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2007**, 3055–3066.
37. Vidimar, V.; Meng, X.; Klajner, M.; Licon, C.; Fetzer, L.; Harlepp, S.; Hébraud, P.; Sidhoum, M.; Sirlin, C.; Loeffler, J. P.; Mellitzer, G.; Sava, G.; Pfeffer, M.; Gaiddon, C. Induction of caspase 8 and reactive oxygen species by ruthenium-derived anticancer compounds with improved water solubility and cytotoxicity. *Biochem. Pharmacol.* **2012**, *84*, 1428–1436.
38. Despax, S.; Jia, F.; Pfeffer, M.; Hébraud, P.; Ebraud, P. H. Complexation of DNA with ruthenium organometallic compounds : The high complexation ratio limit. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2014**, *16*, 1–13.
39. Ryabov, A. D.; Sukharev, V. S.; Alexandrova, L.; Le Lagadec, R.; Pfeffer, M. New synthesis and new bio-application of cyclometalated ruthenium(II) complexes for fast mediated electron transfer with peroxidase and glucose oxidase. *Inorg. Chem.* **2001**, *40*, 6529–6532.
40. Cerón-Camacho, R.; Morales-Morales, D.; Hernandez, S.; Le Lagadec, R.; Ryabov, A. D. Easy access to bio-inspired osmium(II) complexes through electrophilic intramolecular C(sp²)-H bond cyclometalation. *Inorg. Chem.* **2008**, *47*, 4988–4995.
41. Saavedra-Díaz, O.; Cerón-Camacho, R.; Hernández, S.; Ryabov, A. D.; Le Lagadec, R. Denial of tris(C,N-cyclometalated) ruthenacycle: Nine-membered η^6 -N,N-*trans* or η^2 -N,N-*cis* RuII chelates of 2,2'-bis(2-pyridinyl)-1,1'-biphenyl. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2008**, 4866–4869.
42. Tymoczko, J. L.; Berg, J. M. . S. *Biochemistry: A Short Course*; W. H. Freeman; New York, EUA, **2012**.
43. Nelson, D.L.; Cox, M. *Lehninger Principles of Biochemistry*; W. H. Freeman; New York, EUA, **2008**.
44. Fersht, A. *Structure and Mechanism in Protein Science*; W. H. Freeman; New York, EUA, **2002**.
45. Laidler, K.J.; Meiser, J. H. *Physical Chemistry*; Houghton Mifflin Co.; Boston, EUA, **1995**.
46. Cornish-Bowden, A. *Fundamentals of enzyme kinetics*; Wiley-Blackwell; Weinheim, Alemania, **2014**.
47. Altenberg, B.; Greulich, K. O. Genes of glycolysis are ubiquitously overexpressed in 24 cancer classes. *Genomics* **2004**, *84*, 1014–1020.
48. Saavedra Díaz, R. O.; Le Lagadec, R.; Ryabov, A. D. 2-Phenylpyridine ruthenacycles as effectors of glucose oxidase activity: Inhibition by RuII and activation by RuIII. *J. Biol.*

Inorg. Chem. **2013**, *18*, 547–555.

49. Read, J. A.; Winter, V. J.; Eszes, C. M.; Sessions, R. B.; Brady, R. L. Structural basis for altered activity of M-and H-isozyme forms of human lactate dehydrogenase. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* **2001**, *43*, 175–185.

50. Singh, V.; Kaushal, D. C.; Rathaur, S.; Kumar, N.; Kaushal, N. A. Cloning, overexpression, purification and characterization of Plasmodium knowlesi lactate dehydrogenase. *Protein Expr. Purif.* **2012**, *84*, 195–203.

51. McClelland, M. L.; Adler, A. S.; Deming, L.; Cosino, E.; Lee, L.; Blackwood, E. M.; Solon, M.; Tao, J.; Li, L.; Shames, D.; Jackson, E.; Forrest, W. F.; Firestein, R. Lactate dehydrogenase B is required for the growth of KRAS-dependent lung adenocarcinomas. *Clin. Cancer Res.* **2013**, *19*, 773–784.

52. Warbug, O. On the origin of the cancer cells. *Science* **1956**, 309–314.

53. Shim, H.; Dolde, C.; Lewis, B. C.; Wu, C. S.; Dang, G.; Jungmann, R. A.; Dalla-Favera, R.; Dang, C. V c-Myc transactivation of LDH-A: Implications for tumor metabolism and growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1997**, *94*, 6658–6663.

54. Fantin, V. R.; St-Pierre, J.; Leder, P. Attenuation of LDH-A expression uncovers a link between glycolysis, mitochondrial physiology, and tumor maintenance. *Cancer Cell* **2006**, *9*, 425–434.

55. Doherty, J. R.; Cleveland, J. L. Targeting lactate metabolism for cancer therapeutics. *J. Clin. Invest.* **2013**, *123*, 3685–3692.

56. McDonough, M. A.; Li, V.; Flashman, E.; Chowdhury, R.; Mohr, C.; Liénard, B. M. R.; Zondlo, J.; Oldham, N. J.; Clifton, I. J.; Lewis, J.; McNeill, L. A.; Kurzeja, R. J. M.; Hewitson, K. S.; Yang, E.; Jordan, S.; Syed, R. S.; Schofield, C. J. Cellular oxygen sensing: Crystal structure of hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylase (PHD2). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2006**, *103*, 9814–9819.

57. Gorres, K. L.; Raines, R. T. Prolyl 4-Hydroxylase. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **2010**, *45*, 106–124.

58. Fedele, A. O.; Whitelaw, M. L.; Peet, D. J. Regulation of gene expression by the hypoxia-inducible factors. *Mol. Interv.* **2002**, *2*, 229–243.

59. Jewell, U. R.; Kvietikova, I.; Scheid, A.; Bauer, C.; Wenger, R. H.; Gasmann, M. Induction of HIF-1 α in response to hypoxia is instantaneous. *FASEB J.* **2001**, *15*, 1312–1314.

60. Kizaka-Kondoh, S.; Tanaka, S.; Harada, H.; Hiraoka, M. The HIF-1-active microenvironment: An environmental target for cancer therapy. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2009**, *61*, 623–632.

61. Semenza, G. L. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* **2003**, *3*, 721–732.

62. Keith, B.; Simon, M. C. Hypoxia-inducible factors, stem cells, and cancer. *Cell* **2007**, *129*, 465–472.

63. Galligan, J. J.; Petersen, D. R. The human protein disulfide isomerase gene family. *Hum.*

Genomics **2012**, 6:6.

64. Ellgaard, L.; Ruddock, L. W. The human protein disulphide isomerase family: Substrate interactions and functional properties. *EMBO Rep.* **2005**, 6, 28–32.
65. Appenzeller-Herzog, C.; Ellgaard, L. The human PDI family: Versatility packed into a single fold. *Biochim. Biophys. Acta* **2008**, 1783, 535–548.
66. Hatahet, F.; Ruddock, L. W. Protein disulfide isomerase : A critical evaluation of its function in disulfide bond formation. *Antioxid. Redox Signal* **2009**, 11, 2807–2858.
67. Benham, A. M. The protein disulfide isomerase family: Key players in health and disease. *Antioxid. Redox Signal* **2012**, 16, 781–789.
68. Kullmann, M.; Kalayda, G. V.; Hellwig, M.; Kotz, S.; Hilger, R. A.; Metzger, S.; Jaehde, U. Assessing the contribution of the two protein disulfide isomerases PDIA1 and PDIA3 to cisplatin resistance. *J. Inorg. Biochem.* **2015**, 153, 247–252.
69. Xu, S.; Sankar, S.; Neamati, N. Protein disulfide isomerase: A promising target for cancer therapy. *Drug Discov. Today* **2014**, 19, 222–240.
70. Kaiser, B. K.; Yim, D.; Chow, I.-T.; Gonzalez, S.; Dai, Z.; Mann, H. H.; Strong, R. K.; Groh, V.; Spies, T. Disulphide-isomerase-enabled shedding of tumour-associated NKG2D ligands. *Nature* **2007**, 447, 482–486.
71. Chow, M. J.; Licon, C.; Pastorin, G.; Mellitzer, G.; Ang, W. H.; Gaiddon, C. Structural tuning of organoruthenium compounds allows oxidative switch to control ER stress pathways and bypass multidrug resistance. *Chem. Sci.* **2016**, 7, 4117–4124.
72. Hudson, D. A.; Gannon, S. A.; Thorpe, C. Oxidative protein folding: from thiol-disulfide exchange reactions to the redox poise of the endoplasmic reticulum. *Free Radic. Biol. Med.* **2015**, 171–182.
73. Kopito, R. R. Aggresomes, inclusion bodies and protein aggregation. *Trends Cell Biol.* **2000**, 10, 524–530.
74. Rico Bautista, H. Síntesis de complejos de rutenio con ligantes tipo pinza 2,6-difenilpiridina y 1,3-bis(2-piridil)benceno, Tesis Licenciatura, UNAM, **2010**.
75. Kostova, I. Ruthenium complexes as anticancer agents. *Curr. Med. Chem.* **2006**, 13, 1085–1107.
76. Chow, M. J.; Licon, C.; Wong, D. Y. Q.; Pastorin, G.; Gaiddon, C.; Ang, W. H. Discovery and investigation of anticancer ruthenium–arene schiff-base complexes via water-promoted combinatorial three-component assembly. *J. Med. Chem.* **2014**, 57, 6043–6059.
77. Chow, M. J.; Babak, M. V.; Wong, D. Y. Q.; Pastorin, G.; Gaiddon, C.; Ang, W. H. Structural determinants of p53-independence in anticancer ruthenium–arene schiff-base complexes. *Mol. Pharm.* **2016**, 13, 2543–2554.
78. Geoff, R.-C.; Overton, T. *Descriptive Inorganic Chemistry*; W.H. Freeman; New York, EUA, **2013**.
79. Novoa, W. B.; Winer, A. D.; Glaidj, A. J.; Schwert, G. W. Lactic Dehydrogenase. *J. Biol.*

Chem. **1959**, 234, 1143–1148.

80. Sohm, F.; Gaiddon, C.; Antoine, M.; Boutillier, a L.; Loeffler, J. P. The retinoblastoma susceptibility gene product/Sp1 signalling pathway is modulated by Ca²⁺/calmodulin kinases II and IV activity. *Oncogene* **1999**, 18, 2762–2769.

81. Chan, F. K.-M.; Moriwaki, K.; De Rosa, M. J. Detection of necrosis by release of lactate dehydrogenase (LDH) activity. *Methods Mol. Biol.* **2013**, 979, 65–70.

82. Zhai, X.; Yang, Y.; Wan, J.; Zhu, R.; Wu, Y. Inhibition of LDH-A by oxamate induces G2/M arrest, apoptosis and increases radiosensitivity in nasopharyngeal carcinoma cells. *Oncol. Rep.* **2013**, 30, 2983–2991.

83. Tallarida, R. J. Quantitative methods for assessing drug synergism. *Genes Cancer* **2011**, 2, 1003–1008.

84. Yin, N.; Ma, W.; Pei, J.; Ouyang, Q.; Tang, C.; Lai, L. Synergistic and antagonistic drug combinations depend on network topology. *PLoS One* **2014**, 9, e93960.

85. Augoff, K.; Hryniewicz-Jankowska, A.; Tabola, R. Lactate dehydrogenase 5: An old friend and a new hope in the war on cancer. *Cancer Lett.* **2015**, 358, 1–7.

86. Lu, H.; Forbes, R. A.; Verma, A. Hypoxia-inducible factor 1 activation by aerobic glycolysis implicates the Warburg effect in carcinogenesis. *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, 23111–23115.

87. Wong, B. W.; Kuchnio, A.; Bruning, U.; Carmeliet, P. Emerging novel functions of the oxygen-sensing prolyl hydroxylase domain enzymes. *Trends Biochem. Sci.* **2013**, 38, 3–11.

88. Sánchez-Puig, N.; Veprintsev, D. B.; Fersht, A. R. Binding of natively unfolded HIF-1 α ODD domain to p53. *Mol. Cell* **2005**, 17, 11–21.

89. Fetzer, L.; Boff, B.; Ali, M.; Xiangjun, M.; Collin, J.-P.; Sirlin, C.; Gaiddon, C.; Pfeffer, M. Library of second-generation cycloruthenated compounds and evaluation of their biological properties as potential anticancer drugs: Passing the nanomolar barrier. *Dalton Trans.* **2011**, 40, 8869–8878.

90. Sainuddin, T.; McCain, J.; Pinto, M.; Yin, H.; Gibson, J.; Hetu, M.; McFarland, S. A. Organometallic Ru(II) photosensitizers derived from π -expansive cyclometalating ligands: Surprising theranostic PDT effects. *Inorg. Chem.* **2016**, 55, 83–95.

91. Banci, L. *Metallomics and the Cell*; Springer; New York, EUA, **2013**.

92. Black, D. S.; Deacon, G. B.; Edwards, G. L.; Gatehouse, B. M. Organomercury compounds. XXXI. Preparations and ¹⁹⁹Hg N.M.R. Spectra of organomercury derivatives of 2-phenylpyridine, benzo[h]quinoline, 1-phenylpyrazole and 3,4,5-trimethyl-1-phenylpyrazole, and the X-ray crystal structure of bis[2-(pyridin-2'-yl)phenyl]. *Aust. J. Chem.* **1993**, 46, 1323–1336.

93. Cerón Camacho, R. Síntesis de nuevos complejos mono-, bis- y tris- ciclometalados de osmio y su aplicación como agentes de transferencia de electrones con oxidorreductasas, Tesis Licenciatura, UNAM, **2010**.

94. Garrett, D. J.; Jenkins, P.; Polson, M. I. J.; Leech, D.; Baronian, K. H. R.; Downard, A. J.

- Diazonium salt derivatives of osmium bipyridine complexes: Electrochemical grafting and characterisation of modified surfaces. *Electrochim. Acta* **2011**, *56*, 2213–2220.
95. Ryabov, A. D.; Soukharev, V. S.; Alexandrova, L.; Le Lagadec, R.; Pfeffer, M. Low-potential cyclometalated osmium(II) mediators of glucose oxidase. *Inorg. Chem.* **2003**, *42*, 6598–6600.
96. Bennett, A. M.; Huang, T. N.; Matheson, T. W.; Smith, A. K. Inorganic Syntheses. *Inorg. Synth.* **1982**, *21*, 74.
97. Fernandez, S.; Pfeffer, M.; Ritleng, V.; Sirlin, C. An effective route to cycloruthenated N-ligands under mild conditions. *Organometallics* **1999**, *18*, 2390–2394.
98. Le Lagadec, R.; Rubio, L.; Alexandrova, L.; Toscano, R. A.; Ivanova, E. V.; Meškys, R.; Laurinavičius, V.; Pfeffer, M.; Ryabov, A. D. Cyclometalated N,N-dimethylbenzylamine ruthenium(II) complexes $[\text{Ru}(\text{C}_6\text{H}_4\text{R}^1\text{R}^2\text{R}^3\text{-o-CH}_2\text{NMe}_2)(\text{bpy})(\text{RCN})_2]\text{PF}_6$ for bioapplications: Synthesis, characterization, crystal structures, redox properties, and reactivity toward PQQ-dependent glucose dehydrogenase. *J. Organomet. Chem.* **2004**, *689*, 4820–4832.
99. McFarland, S. A.; Lee, F. S.; Cheng, K. a W. Y.; Cozens, F. L.; Schepp, N. P. Picosecond dynamics of non-thermalized excited states in tris(2,2'-bipyridine)ruthenium(II) derivatives elucidated by high energy excitation. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 7065–7070.
100. Diaz, M. O. G.; Morales, S. L.; Lagadec, R. Le; Alexandrova, L. Homogeneous radical polymerization of 2-hydroxyethyl methacrylate mediated by cyclometalated cationic ruthenium(II) complexes with PF_6^- and Cl^- in protic media. *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* **2011**, *49*, 4562–4577.
101. Rillema, D. P.; Jones, D. S.; Woods, C.; Levy, H. A. Comparison of the crystal-structures of tris heterocyclic ligand complexes of ruthenium(II). *Inorg. Chem.* **1992**, *31*, 2935–2938.
102. Ivanovaa, E. V.; Kurnikovb, I. V.; Fischerc, A.; Larissa Alexandrova, A. D. Enantioselectivity of resolved Δ and Λ orthoruthenated 2-phenylpyridine complexes $[\text{Ru}(\text{o-C}_6\text{H}_4\text{-2-py})(\text{LL})_2]\text{PF}_6$ (LL = bpy and phen) toward glucose oxidase. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2006**, *41*, 110–116.
103. Becke, A. D. Density-functional exchange-energy approximation with correct asymptotic behavior. *Phys. Rev. A* **1988**, *38*, 3098–3100.
104. Becke, A. D. Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange. *J. Chem. Phys.* **1993**, *98*, 5648–5652.
105. Lee, C.; Yang, W.; Parr, R. G. . Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density. *Phys. Rev. B Condens. Matter* **1988**, *37*, 785–789.
106. Hay, P. J.; Wadt, W. R. Ab initio effective core potentials for molecular calculations. Potentials for the transition metal atoms Sc to Hg. *J. Chem. Phys.* **1985**, *82*, 270–283.
107. Wadt, W. R.; Hay, P. J. Ab initio effective core potentials for molecular calculations. Potentials for K to Au including the outermost core orbitals. *J. Chem. Phys.* **1985**, *82*, 299–310.

108. Hay, P. J.; Wadt, W. R. Ab initio effective core potentials for molecular calculations. Potentials for main group elements Na to Bi. *J. Chem. Phys.* **1985**, *82*, 284–298.

109. Morris, G. M.; Huey, R.; Lindstrom, W.; Sanner, M. F.; Belew, R. K.; Goodsell, D. S.; Olson, A. J. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *J. Comp. Chem* **2009**, *16*, 2785–2791.

110. The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.8 Schrödinger, LLC.

111. ProteoStat ® Aggresome Detection Kit for flow cytometry and fluorescence microscopy Instruction Manual. *ENZO LIFE Sci. INC.* **2011**.

9.0 ANEXOS
Y
ARTÍCULO PUBLICADO

9.0 ANEXOS

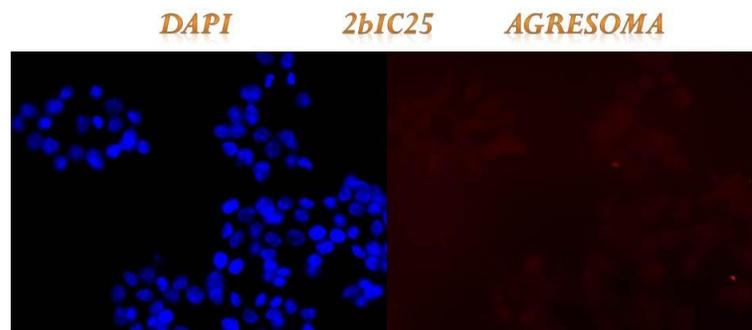
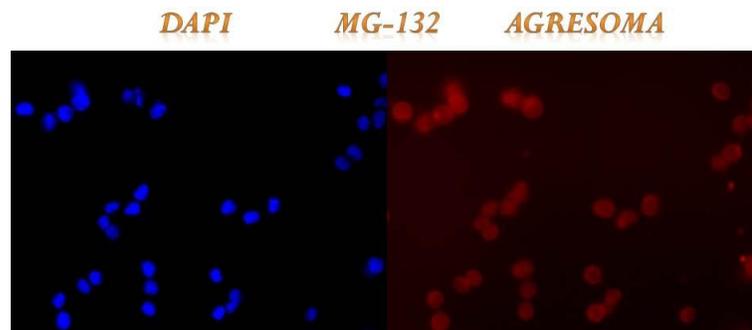
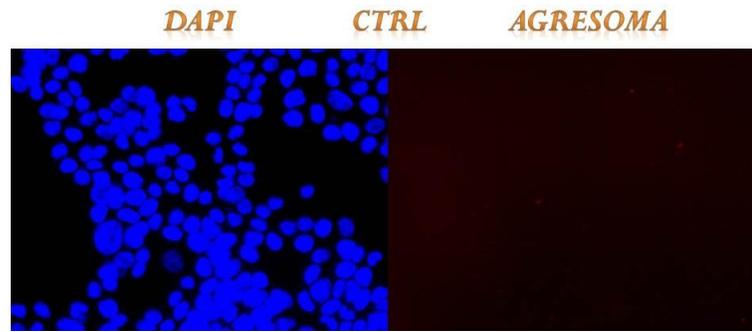
Y

ARTÍCULO PUBLICADO

Tabla A1. Obtención del máximo de absorción (ϵ) $M^{-1}cm^{-1}$. La longitud de onda se midió en nanómetros.

Complejo	Máximos de absorción ϵ nm($M^{-1}cm^{-1}$)
1a	453=10127 ^h ; 350=4288 ^h ; 455=12243 ^d ; 355=4981 ^d .
2a	540=8986 ^h ; 487=8274 ^h ; 401=9229 ^h ; 362=10755 ^h ; 550=10285 ^d ; 494=9221 ^d ; 408=11164 ^d ; 370=12417 ^d .
3a⁵	623=1001 ^h ; 394=5819 ^h ; 555=1777 ^d ; 398=7233 ^d .
1b	481=8427 ^h ; 437=7908 ^h ; 368=6712 ^h ; 327=6375 ^h ; 484=8387 ^d ; 453=8086 ^d ; 371=6914 ^d .
2b	547=9409 ^h ; 411=13291 ^h ; 371=12018 ^h ; 553=7135 ^d ; 415=7938 ^d ; 367=7662 ^d .
3b	371=6023 ^h ; 540=7677 ^d ; 415=9933 ^d .
4	414=4465 ^d .
5	494=3646 ^h ; 377=4540 ^h ; 265=33920 ^h ; 481=5234 ^d ; 381=4904 ^h ;
6	534=2671 ^h ; 265=20419 ^h ; 224=18165 ^h ; 538=10027 ^d ; 481=9909 ^d ; 385=2557 ^d .

h = H₂O; d = DMSO.



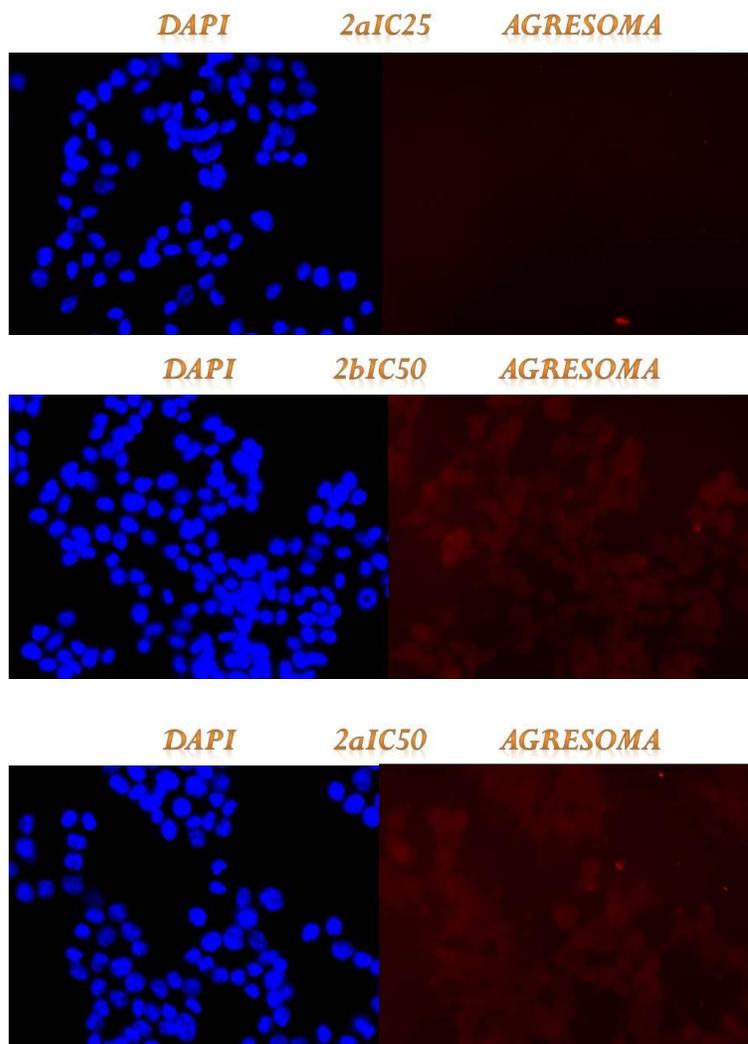
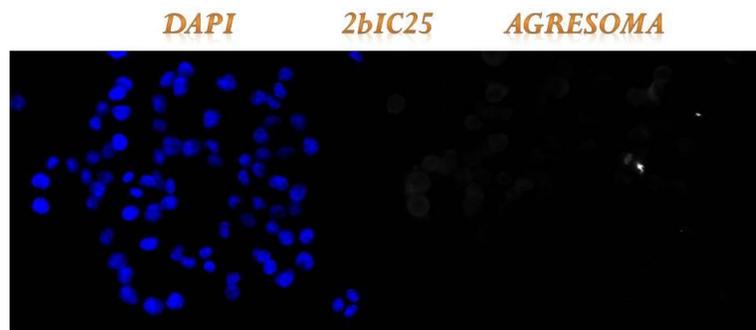
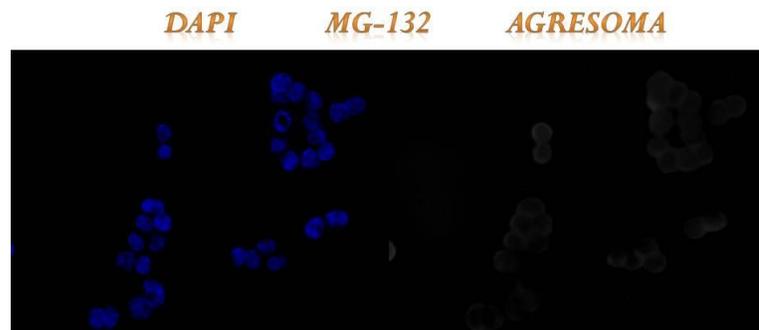
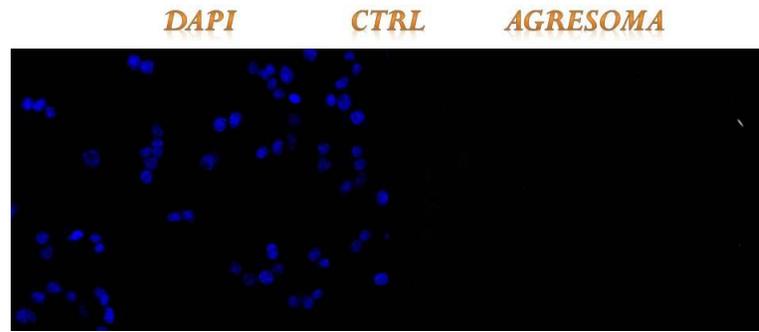


Figura A1. Imágenes de fluorescencia usando los canales DAPI y Cy5. Ensayo 2, 24 horas de tratamiento.



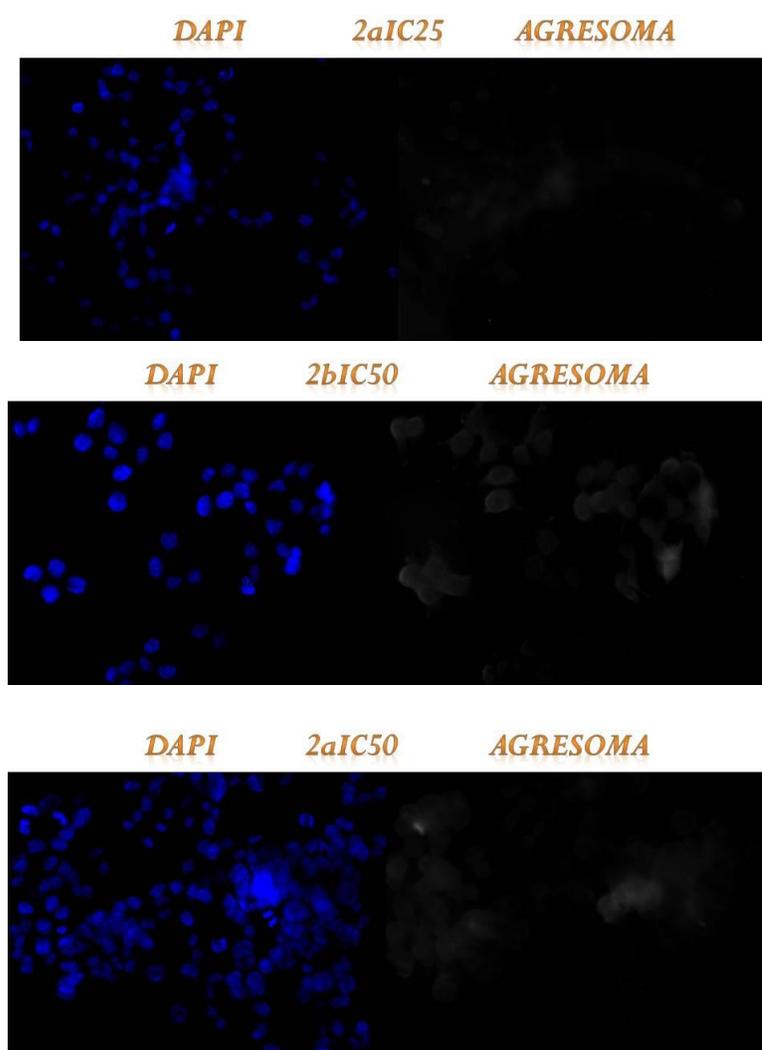


Figura A2. Imágenes de fluorescencia usando los canales DAPI y Cy5. Ensayo 3, 24 horas de tratamiento.



Impact of cyclometalated ruthenium(II) complexes on lactate dehydrogenase activity and cytotoxicity in gastric and colon cancer cells



Hugo Rico Bautista^a, Rafael Omar Saavedra Díaz^a, Longzhu Q. Shen^b, Christophe Orvain^{c,d}, Christian Gaiddon^{c,d}, Ronan Le Lagadec^{a,*}, Alexander D. Ryabov^b

^a Instituto de Química UNAM, Circuito Exterior s/n, Ciudad Universitaria, 04510 México D.F., Mexico

^b Department of Chemistry, Carnegie Mellon University, 4400 Fifth Avenue, Pittsburgh, PA 15213, USA

^c INSERM U1113, Strasbourg University, FMIS, 3 Avenue Molière, 67200 Strasbourg, France

^d Oncology Section, FMIS, Strasbourg University, Strasbourg, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 10 April 2016

Received in revised form 11 July 2016

Accepted 25 July 2016

Available online 26 July 2016

Keywords:

Ruthenium

Cyclometalation

Lactate dehydrogenase

Cytotoxicity

Molecular docking

Enzyme inhibition

ABSTRACT

Lactate dehydrogenase (LDH) is a redox enzyme often overexpressed in cancer cells allowing their survival in stressful metabolic tumor environment. Ruthenium(II) complexes have been shown to impact on the activity of purified horseradish peroxidase and glucose oxidase but the physiological relevance remains unclear. In this study we investigated how ruthenium complexes impact on the activity of LDH *in vitro* and in cancer cells and performed a comparative study using polypyridine ruthenium(II) complex $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ (**1**) and its structurally related cyclometalated 2-phenylpyridinato counterpart $[\text{Ru}(\text{phpy})(\text{bpy})_2]^+$ (**2**) (bpy = 2,2'-bipyridine, phpyH = 2-phenylpyridine). We show that the cytotoxicity in gastric and colon cancer cells induced by **2** is significantly higher compared to **1**. The kinetic inhibition mechanisms on purified LDH and the corresponding inhibition constants K_i or $i_{0.5}$ values were calculated. Though complexes **1** and **2** are structurally very similar (one Ru–C bond in **2** replaces one Ru–N bond in **1**), their inhibition modes are different. Cyclometalated complex **2** behaves exclusively as a non-competitive inhibitor of LDH from rabbit muscle (LDH_{rm}), strongly suggesting that **2** does not interact with LDH in the vicinities of either lactate/pyruvate or NAD^+/NADH binding sites. Sites of interaction of **1** and **2** with LDH_{rm} were revealed theoretically through computational molecular docking. Inhibition of LDH activity by **2** was confirmed in cancer cells. Altogether, these results revealed an inhibition of LDH activity by ruthenium complex through a direct interaction structurally tuned by a Ru–C bond.

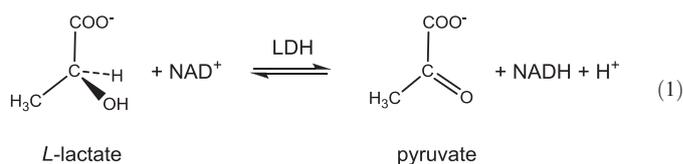
© 2016 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Cyclometalated ruthenium(II) compounds, *i.e.* complexes containing chelated Ru–C sigma bonds (RDC, Ruthenium Derived Compound) such as **2**, have recently been studied as efficient anticancer agents [1–3]. They are particularly interesting due to their lower *in vivo* toxicity and insensitivity toward resistance mechanisms compared to the well-recognized metal-containing drug cisplatin [2]. In addition, they show higher *in vitro* cytotoxicity compared to several other well-characterized ruthenium-based compounds [4]. The much higher activity of RDC compared to their structural homologues which do not contain any Ru–C bond, *viz.* **2** versus **1** (Chart 1) remains enigmatic [5].

The mechanism of anticancer action of RDCs is also still enigmatic, though several attempts to disclose it have been made [3] and a few mechanistic hypotheses have been put forward [5,6]. RDCs and a couple of other compounds similar to **1** [7] differ from the majority of ruthenium-containing anticancer drugs [4,8–19] in their inertness to ligand substitution of the coordination sphere. Ligands in RDCs are strongly

bound to the central metal and they are challenging to replace thermally though their lability can be enhanced by light [20,21]. The substitution inertness of RDCs precludes easy binding to biological targets through the formation of coordinative bonds similar to those recently described [14,22,23]. Binding of intact RDCs to DNA has been shown [2,6,24] and further explored [5,25,26] though these studies did not shed much light on the mechanism of their anticancer action. Other mechanistic options have been explored to show that induction of both the oxidative stress and unfolded protein response (UPR) stress pathways are independent of any DNA interaction [2,6,27].



However, how these pathways are exactly induced by RDCs remains unknown. One hypothesis is that RDCs could affect the activity of essential redox metabolic enzymes leading to oxidative stress that ultimately

* Corresponding author.

E-mail addresses: ronan@unam.mx, lclagadec@gmail.com (R. Le Lagadec).

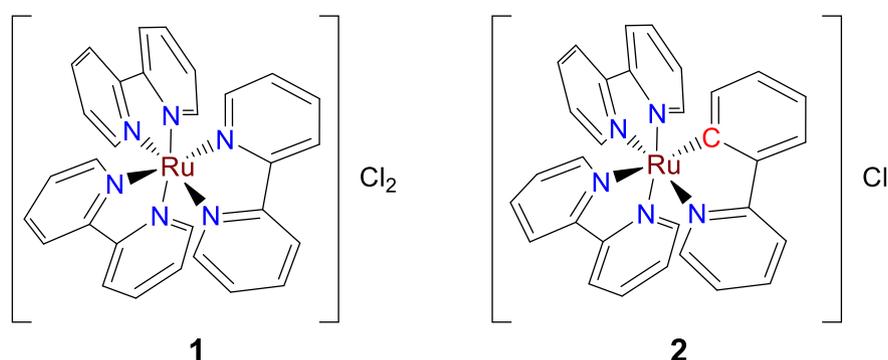


Chart 1. Coordinative (**1**) and cyclometalated (**2**) ruthenium(II) complexes used in this work.

could induce the UPR pathway. This is supported by our previous findings that the cytotoxicity of RDCs correlates with a specific window of their redox potential, that RDCs can inhibit the activity of purified redox enzymes, namely horseradish peroxidase and glucose oxidase, and that a ruthenium arene complex indeed induces endoplasmic reticulum stress *via* reactive oxygen species (ROS) production [28]. Importantly, such activity on selected redox metabolic enzyme could also provide some explanation on the more selective cytotoxicity of RDCs toward tumor cells and help to bypass resistance mechanisms involving DNA repair processes.

Indeed, a very distinctive feature of tumor cells is their enhanced lactate production due to high glucose import and induced glycolytic metabolism [29]. This phenomenon known as the Warburg effect is yet poorly understood at a molecular level. The metabolic changes in the tumor micro-environment, *i.e.* hypoxia and low pH, seem to play important roles by regulating specific signaling pathways including HIF1 (hypoxia inducible factor 1) and the unfolded protein response pathway. The pathways are essential to ensure the survival of cancer cells through

the control of (i) activity and expression of several redox enzymes (oxidoreductases) necessary to produce ATP/energy and (ii) biosynthesis of amino acids, nucleic bases and biomacromolecules. Among these enzymes is lactate dehydrogenase (LDH) [30], which catalyzes the production of lactate in the final step of the glycolytic pathway [31]. The important role of LDH was confirmed by the elevated expression of the *ldha* gene in many tumors. Furthermore, inhibition of *ldha* expression reduces tumor aggressiveness and resistance to chemotherapy [32]. This makes LDH an emerging anticancer target [33,34]. Hence, to further understand the anticancer activity of RDCs we decided to correlate their cytotoxic activity with their impact on the activity of LDH both *in vitro* using purified enzymes and in cancer cells. In addition, we used two compounds structurally very similar but varying in a way that their redox potential was the only noticeable difference, allowing us to further understand the physicochemical determinant essential for their biological activity.

Diminishing the catalytic activity of LDH represents an approach to fight cancer and therefore significant efforts have recently been aimed at the design and synthesis of powerful inhibitors of LDH [35,36] despite the fact that the inhibition of LDH had been thoroughly studied a few decades ago [37–42]. A challenging mechanistic option for the LDH anticancer action could be associated with triggering elevated ROS by loss of LDH activity through the negative feedback on glycolysis and the synthesis of glutathione — the major antioxidant of the cell [43]. The facts mentioned above regarding the LDH/cancer dilemma prompted us to look at the anticancer activity of RDCs through the prism of their inhibitory capability of LDH. It is well established that metal complexes do reduce the catalytic activity of LDH. Examples include arylthallium(III) reagents [44], cisplatin and other platinum compounds [45], as well as copper complexed to 2,2'-bipyridine derivatives [46]. It has also been shown that ruthenium compounds can bind to and modulate the activity of enzymes [22,47–49]. In particular, compound **2** is a noncompetitive inhibitor of glucose oxidase from *Aspergillus niger* with $K_i = 0.036$ M [50]. Thus, it was anticipated that **2** could retard the activity of LDH as well and therefore we have investigated in detail the inhibition of LDH by **2** and its structural analog **1**. LDH from rabbit muscle (LDH_{rm}), which X-ray structural data are known [51], was used in our study as a representative lactate dehydrogenase. The retardation of LDH_{rm} by **1** and **2** was explored in both oxidative and reductive processes (see Eq. (1)) with respect to all four substrates involved, *viz.* L-lactate,

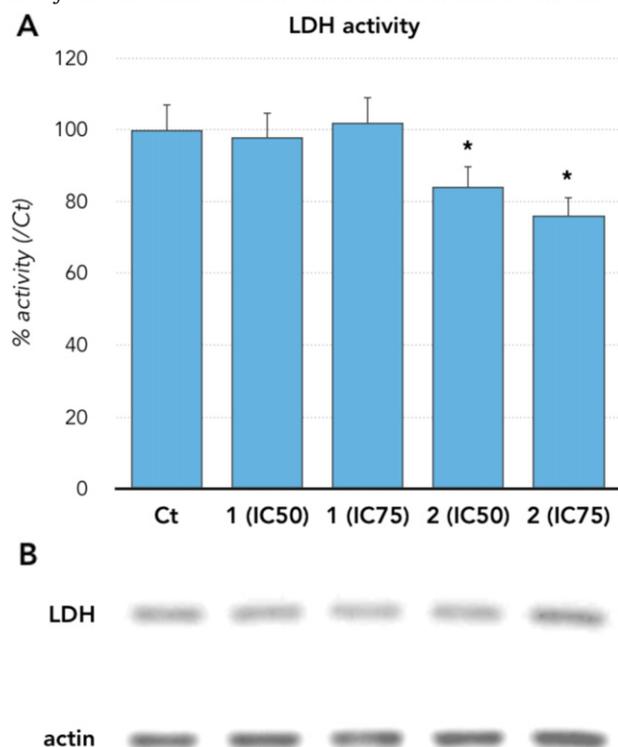


Fig. 1. Impact of ruthenium compounds on LDH activity and expression in gastric cancer cells. AGS cells were treated for 4 hours with the indicated compounds at the IC_{50} and the IC_{75} . LDH activity was measured by enzymatic assays (A) and LDH protein level was assessed by Western blot. Actin was used as loading control. Experiments were done in triplicate. Bars represent means with standard deviations. * Indicates statistical differences (<0.01) assessed by ANOVA followed with Tuckey post-test.

Table 1
Cytotoxicity of **1** and **2** on gastric and colon cancer cells with wild type p53 or mutated p53 genes.

Complex	IC_{50} [μ M]			
	AGS	KATOIII	HCT116	SW480
1	>200	>200	>200	>200
2	1.4 ± 0.06	0.7 ± 0.04	1.6 ± 0.61	1.3 ± 0.42

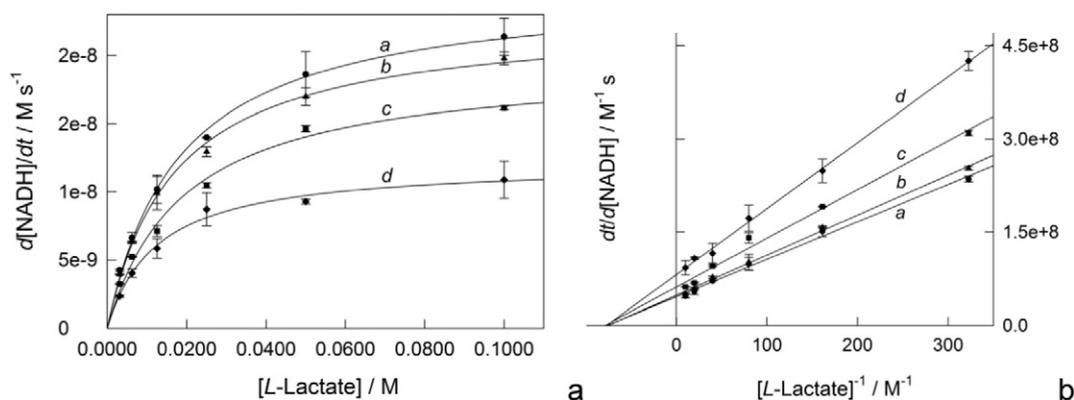


Fig. 2. (a) Steady-state rates of LDH_{rm}-catalyzed oxidation of L-lactate by NAD⁺ as a function of lactate concentration in the presence of **2** [(0.0, 0.5, 1.0 and 2.0) × 10⁻⁴ M (a–d, respectively)] at pH 7.5 and 37 °C. Other conditions: [LDH_{rm}] 4 × 10⁻¹⁰ M, [NAD⁺] 1.0 × 10⁻³ M. (b) Lineweaver-Burk plots of the data in (a).

pyruvate, NAD⁺ and NADH. Different inhibitory mechanisms are established for **1** and **2** which are discussed using the results of molecular docking simulations. Inhibition constants K_i and $i_{0.5}$ values obtained are compared with those reported for specifically designed LDH inhibitors/anticancer drugs. In addition, we correlated the activity of these complexes on purified LDH with their cytotoxicity and inhibition of LDH activity in cancer cells.

2. Experimental section

2.1. Materials

Ruthenium complexes [**1**]Cl₂ [52] and [**2**]Cl [50] were prepared as previously described. LDH from rabbit muscle type XI, pyruvate, L-lactate, KH₂PO₄, NADH, and NAD⁺ were obtained from Sigma Aldrich. The stock solutions (0.01 M) of NADH and NAD⁺ were prepared in 0.03 M Na₂CO₃ and deionized water, respectively. Stock solutions of **1** and **2** (1 × 10⁻³ M) were prepared in water containing 10% methanol.

2.2. Cell lines and tissue culture

The human colorectal carcinoma cells HCT116, human colorectal adenocarcinoma cells SW480 and HT-29, human gastric adenocarcinoma AGS, human gastric carcinoma KATOIII were acquired from ATCC® (Manassa, VA). HCT116, HT-29 and SW480 cells were cultured in DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) containing 10% FBS and 1% Penicillin/Streptomycin. AGS cells were cultured in RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute medium) containing 10% FBS and 1% penicillin/streptomycin. KATOIII cells were cultured in RPMI 1640 medium containing 20% FBS and 1% penicillin/streptomycin. All cell lines were

grown at 37 °C in a humidified atmosphere of 95% air and 5% CO₂. Experiments were performed on cells within 20 passages.

2.3. Inhibition of cell viability assay

The anti-proliferation activities on cancer cells were determined using the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay. Cells were seeded at 10,000 cells per well (100 μL) in Cellstar® 96-well plates (Greiner Bio-One) and incubated for 24 h. Thereafter, cancer cells were exposed to drugs at different concentration in media for 48 h. Then the MTT assay was performed as previously described [53]. Inhibition to cell viability was evaluated with reference to the IC₅₀ value, which is defined as the concentration needed for a 50% reduction of survival based on the survival curves. IC₅₀ values were calculated from the dose-response curves (cell viability vs. drug concentration). The experiments were performed in 8 replicates for each drug concentration and were carried out at least three times independently.

2.4. Antibodies and western blot protocol

The cells were lysed with lysis buffer [100 μL, 1% NP40, 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), protease inhibitor]. The cell lysate were transferred to separate 2 mL tubes and sonicated for 10 s. The samples were then centrifuged at 13,000 rpm, 4 °C for 15 min. The liquid supernatant containing the proteins were collected and total protein content of each sample was quantified via Bradford's assay. 50 μg of proteins from each sample was reconstituted in loading buffer [5% DTT, 1 × Protein Loading Dye] and heated at 95 °C for 5 min. The protein mixtures were resolved on either a 10% or 15% SDS-PAGE gel by electrophoresis and transferred

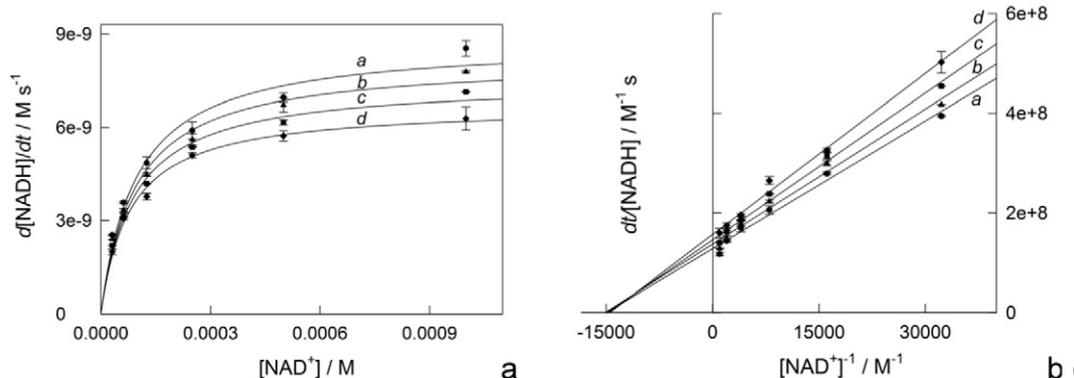


Fig. 3. (a) Steady-state rates of LDH_{rm}-catalyzed oxidation of L-lactate by NAD⁺ as a function of NAD⁺ concentration in the presence of (0.5–2.0) × 10⁻⁴ M **2** at pH 7.5 and 37 °C; [LDH_{rm}] 4 × 10⁻¹⁰ M, [lactate] 0.1 M. (b) Lineweaver-Burk plots of the data in (a).

Table 2

Maximal rates (V_{\max} , in $M s^{-1}$) and the Michaelis constants (K_M , in M) for LDH_{rm}-catalyzed oxidation of L-lactate by NAD⁺ and reduction of pyruvate by NADH in the presence of different concentrations of RDC **2** at pH 7.5 and 37 °C.

[2]/M	Variable substrate (oxidation)				Variable substrate (reduction)			
	L-lactate ^a		NAD ^{+b}		Pyruvate ^c		NADH ^d	
	$10^8 \times V_{\max}$	$10^2 \times K_M$	$10^8 \times V_{\max}$	$10^5 \times K_M$	$10^8 \times V_{\max}$	$10^4 \times K_M$	$10^8 \times V_{\max}$	$10^5 \times K_M$
0	2.1 ± 0.2	1.3 ± 0.1	0.79 ± 0.03	6.6 ± 0.5	13.1 ± 0.5	4.0 ± 0.2	5.1 ± 0.3	2.9 ± 0.2
5×10^{-5}	2.0 ± 0.1	1.3 ± 0.1	0.73 ± 0.02	6.5 ± 0.5	9.5 ± 0.6	3.8 ± 0.3	4.4 ± 0.3	2.9 ± 0.3
1×10^{-4}	1.6 ± 0.1	1.2 ± 0.1	0.68 ± 0.01	6.7 ± 0.4	7.9 ± 0.1	3.9 ± 0.2	3.9 ± 0.3	3.1 ± 0.3
2×10^{-4}	1.2 ± 0.3	1.3 ± 0.1	0.63 ± 0.01	6.8 ± 0.4	6.6 ± 0.1	3.8 ± 0.2	3.0 ± 0.1	2.8 ± 0.2

^a [LDH_{rm}] 4×10^{-10} M, [NAD⁺] 1.0×10^{-3} M.

^b [LDH_{rm}] 4×10^{-10} M, [lactate] 0.1 M.

^c [LDH_{rm}] 1×10^{-10} M, [NADH] 1.2×10^{-4} M.

^d [LDH_{rm}] 1×10^{-10} M, [pyruvate] 1.2×10^{-3} M.

to a nitrocellulose membrane. The proteins bands were visualized via enhanced chemiluminescence imaging (PXi, Syngene) after treatment with the primary antibodies and the appropriate secondary antibodies. Equal loading of protein was confirmed by comparison with actin expression. The following antibodies were used: LDH (sc13032) from Santa Cruz Biotechnologies, β -Actin (ab75186) from Abcam.

2.5. LDH activity in gastric cancer cells

Reagents 2-*p*-iodophenyl-3-*p*-nitrophenyl-5-phenyl tetrazolium chloride, *N*-methylphenazoniummethyl sulfate, and lactic acid were obtained from Sigma Aldrich. LDH activity was performed as previously described [54], compounds **1** and **2** IC₅₀ and IC₇₅ were added at different times of treatment. Bars are mean SD and asterisks indicate a statistically significant difference ($p < 0.01$) compared to control, as calculated by a one-way ANOVA test followed by a Tukey post-test.

2.6. Kinetic measurements and calculations

The kinetic measurements were performed using a UV–vis 2600 Shimadzu instrument at pH 7.5 and 37 °C in a 0.075 M phosphate buffer containing 0.125 M NaCl. The solutions of **1**, **2** and LDH_{rm} were prepared daily and kept on ice. The concentrations of L-lactate, pyruvate, NAD⁺ and NADH were varied in the ranges of 0.003–0.1, $(0.03\text{--}2.0) \times 10^{-3}$, $(0.03\text{--}1.0) \times 10^{-3}$, and $(0.03\text{--}2.0) \times 10^{-4}$ M, respectively. Steady-state rates of LDH_{rm}-catalyzed oxidation of L-lactate by NAD⁺ and reduction of pyruvate by NADH in the presence of different concentrations of **1** and **2** were obtained by measuring changes in NADH concentrations at 340 nm using $\epsilon = 6220 M^{-1} cm^{-1}$. All absorbance versus time plots contained significant steady-state portions from which steady-state rates were obtained. The maximal rates (V_{\max}) and the Michaelis constants (K_M) for LDH_{rm}-catalyzed oxidation of L-lactate

by NAD⁺ and reduction of pyruvate by NADH in the presence of **1** and **2** were calculated using the Lineweaver-Burk plots. The concentrations of **1** and **2** used are indicated in captions to Figs. 2–8. Bars are mean standard error, with 95% of confidence, calculated by SigmaPlot linear regression.

2.7. Molecular docking simulations

The X-ray structural data for compounds **1** [55] and **2** [56] were optimized using DFT theory implemented in Gaussian 09 rev. B.01 computational suite [57]. Becke's three parameter hybrid functional (B3) [58, 59] along with the Lee-Yang-Parr correlation functional (LYP) [60] were used in the full geometrical optimization. The basis set lanl2dz [61–63] was applied for the ruthenium atom. The set 6–31 + G(d) was used for other atoms. The crystal structure of LDH was retrieved from PDB bank (<http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=3H3F>) [51]. The optimized structures of **1** and **2** were docked to LDH tetramer using Autodock [64] following a two-step docking procedure. The first step was global blind docking to search for potential binding sites. Complexes **1** or **2** were positioned randomly in the vicinity of the open conformer. The dimension of searching grid box was set to be $126 \times 126 \times 126 \text{ \AA}$ with each point separated by 0.375 Å. Fifty runs were performed with 27,000 generic algorithm operations generated on a single population of 150 individuals. The default crossover rate (0.80) and mutation rate (0.02) parameters were used. All the global docking results for **1** and **2** were clustered into 53 groups. One representative binding mode for each cluster was selected for a local docking in the vicinity of the binding site in a $60 \times 60 \times 60 \text{ \AA}$ grid box. The separation between points was 0.375 Å. Ten Lamarckian Genetic Algorithm runs were performed on a single population of 150 individuals. For either docking process, the Gasteiger charges were assigned to all non-metal atoms of the protein and the complexes. The

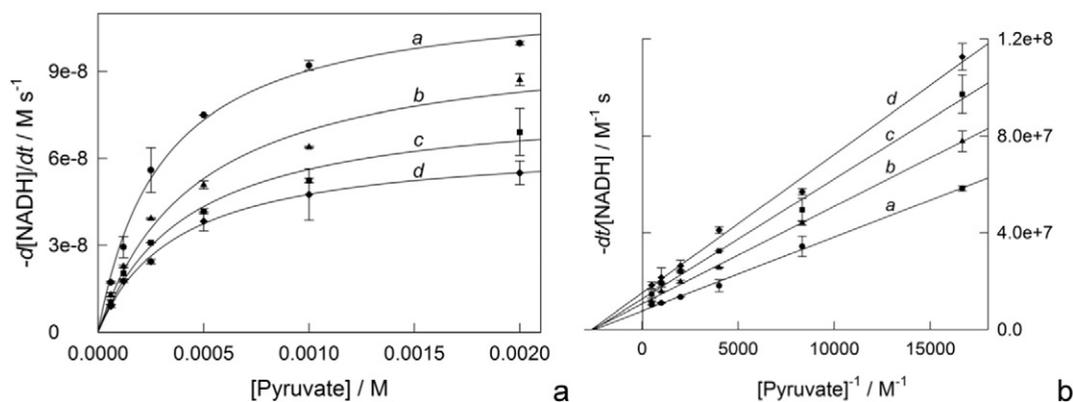


Fig. 4. (a) Steady-state rates of LDH_{rm}-catalyzed reduction of pyruvate by NADH as a function of pyruvate concentration at different concentrations of **2** (0 , 0.5×10^{-4} , 1.0×10^{-4} , and 2.0×10^{-4} M from a to d, respectively) at pH 7.5 and 37 °C; [LDH_{rm}] 1×10^{-10} M, [NADH] 1.2×10^{-4} M. (b) Lineweaver-Burk plots of the data in (a).

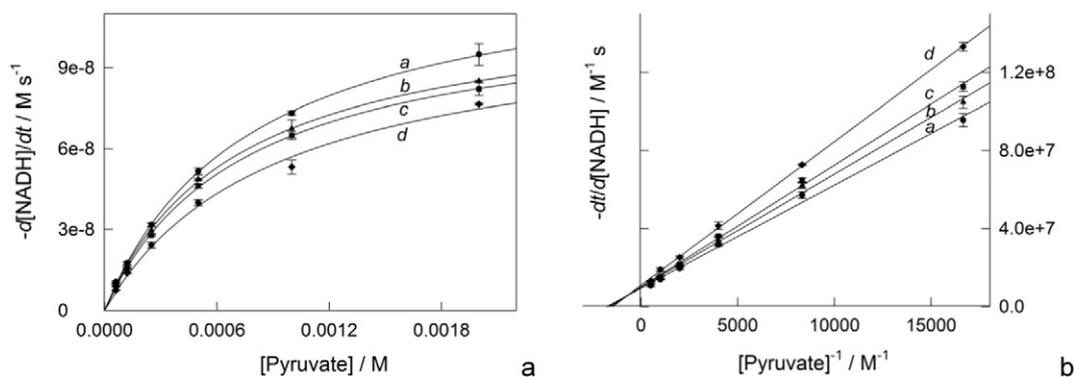


Fig. 5. (a) Steady-state rates of LDH_{rm}-catalyzed reduction of pyruvate by NADH as a function of [pyruvate] in the presence of $(0.5\text{--}2.0) \times 10^{-4}$ M **1** at pH 7.5 and 37 °C; [LDH_{rm}] 1×10^{-10} M, [NADH] 1.2×10^{-4} M. (b) Lineweaver-Burk plots of the data in (a).

net charge of ruthenium was set to be 2+. The Autodock docking input files were prepared using Autodock Tools [64] and existing written scripts. Molecular graphics were prepared using Pymol [65].

3. Results

3.1. Cytotoxic activity of **1** and **2** on gastric and colon cancer cells

The cytotoxic activity of **1** and **2** was tested on several cancer cell lines issued from gastric (AGS, KATOIII) and colon (HCT116, SW480) cancers (Table 1). AGS and HCT116 cells express the wild type p53 tumor suppressor gene while the KATOIII and SW480 express a mutated variant of p53. Expression of the mutant form has been shown to have gain of function activity favoring cancer cell resistance to DNA damaging chemotherapy [66]. The cytotoxicity was tested using MTT test after 48 h of treatment at increasing concentrations. IC₅₀ were calculated and are shown in Table 1. On all cell lines, compound **2** displayed a significantly higher cytotoxicity compared to **1**. The IC₅₀ were not significantly different between wild type or mutated expressing cell lines.

3.2. Impact of **1** and **2** on LDH activity in gastric and colon cancer cells

To establish the impact of the two ruthenium compounds on redox enzymes that are important for the cancer cell metabolism we chose LDH. Intracellular LDH activity was measured after 4 h of treatment with compounds **1** and **2** at their IC₅₀ and their IC₇₅. Only compound **2** had an impact by inhibiting LDH activity (Fig. 1A). The inhibition was dose dependent, reaching about 25%. To verify whether this inhibition was caused by a change in LDH protein level we performed Western blot. Neither compound affected the protein level of LDH after 4 h of

treatment (Fig. 1B). To further characterize the direct impact of both compounds on LDH enzymatic activity, we used purified LDH.

3.3. Inhibition of LDH_{rm} by **2**: Oxidative process

Fig. 2a shows dependencies of the steady-state rates of LDH_{rm}-catalyzed oxidation of L-lactate by NAD⁺ as a function of lactate concentration in the presence of variable loadings of **2** in the range of $(0.5\text{--}2.0) \times 10^{-4}$ M at pH 7.5 and 37 °C. The rates decrease monotonically with increasing the amount of **2** in solution. The Lineweaver-Burk (double inverse) plots (Fig. 2b) show that all four straight lines intersect the x-axis in one point indicative of the noncompetitive inhibition [67], i.e. **2** is a noncompetitive inhibitor of LDH_{rm} with respect to L-lactate. Values of the maximal rates (V_{\max}) and the Michaelis constants (K_M) calculated from slopes and intercepts of straight lines in Fig. 2b at different [**2**] are summarized in Table 2. The values of K_M do not vary but the values of V_{\max} decrease as [**2**] grows. Inverse V_{\max} depends linearly on [**2**] (Fig. S1), which allows to calculate the inhibition constant K_i of $(1.7 \pm 0.2) \times 10^{-4}$ M from the intercept divided by the slope.

Similar data for the oxidative process with variable concentrations of NAD⁺ are presented in Fig. 3. As above for L-lactate, RDC **2** retards the rate of the enzymatic reaction, though the retardation effect is lower. Values V_{\max} and K_M calculated from slopes and intercepts of straight lines in Fig. 3b are shown in Table 2. The inhibition mechanism is non-competitive (Fig. 3b) with noticeably higher K_i of $(8.5 \pm 0.7) \times 10^{-4}$ M, which was calculated as described above (Fig. S1).

3.4. Inhibition of LDH_{rm} by **2**: Reductive process

Fig. 4a shows dependencies of the steady-state rates of LDH_{rm}-catalyzed reduction of pyruvate by NADH as a function of pyruvate

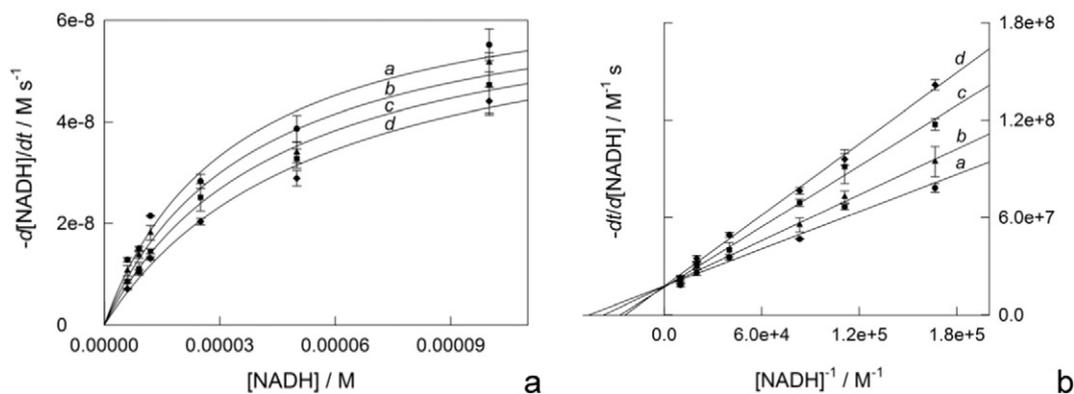


Fig. 6. (a) Steady-state rates of LDH_{rm}-catalyzed reduction of pyruvate by NADH as a function of [NADH] in the presence of $(0.5\text{--}2.0) \times 10^{-4}$ M **1** at pH 7.5 and 37 °C; [LDH_{rm}] 1×10^{-10} M, [pyruvate] 1.2×10^{-3} M. (b) Lineweaver-Burk plots of the data in (a).

Table 3

Maximal rates (V_{\max} in M s^{-1}) and the Michaelis constants (K_M , in M) for LDH_{rm}-catalyzed oxidation of L-lactate by NAD^+ and reduction of pyruvate by NADH in the presence of different concentrations of coordinative compound **1** at pH 7.5 and 37 °C.

[1]/M	Variable substrate (oxidation)				Variable substrate (reduction)			
	L-lactate ^a		NAD ^b		Pyruvate ^c		NADH ^d	
	$10^8 \times V_{\max}$	$10^2 \times K_M$	$10^8 \times V_{\max}$	$10^5 \times K_M$	$10^8 \times V_{\max}$	$10^4 \times K_M$	$10^8 \times V_{\max}$	$10^5 \times K_M$
0	1.9 ± 0.06	1.0 ± 0.1	0.79 ± 0.03	6.7 ± 0.6	10.7 ± 0.1	5.6 ± 0.1	5.6 ± 0.1	2.2 ± 0.2
5×10^{-5}	1.3 ± 0.07	1.8 ± 0.1	0.72 ± 0.02	7.8 ± 0.5	10.1 ± 0.9	5.9 ± 0.6	5.7 ± 0.1	2.7 ± 0.1
1×10^{-4}	1.1 ± 0.04	2.7 ± 0.1	0.68 ± 0.01	7.9 ± 0.5	10.1 ± 0.7	6.3 ± 0.5	5.9 ± 0.1	3.7 ± 0.2
2×10^{-4}	0.9 ± 0.04	3.1 ± 0.2	0.59 ± 0.01	8.8 ± 0.5	9.2 ± 0.4	6.8 ± 0.9	5.7 ± 0.4	4.2 ± 0.4

^a [LDH_{rm}] 4×10^{-10} M, [NAD^+] 1.0×10^{-3} M.

^b [LDH_{rm}] 4×10^{-10} M, [lactate] 0.1 M.

^c [LDH_{rm}] 1×10^{-10} M, [NADH] 1.2×10^{-4} M.

^d [LDH_{rm}] 1×10^{-10} M, [pyruvate] 1.2×10^{-3} M.

concentration in the presence of $(0.5\text{--}2.0) \times 10^{-4}$ M **2** under the same conditions. The corresponding Lineweaver-Burk plots in Fig. 4b illustrate again the noncompetitive inhibition by **2** with respect to pyruvate. Values V_{\max} and K_M are summarized in Table 2. The values of K_M are constant within experimental uncertainty; the values of V_{\max} decrease with increasing [2]. Inverse V_{\max} depends linearly on [2] (Fig. S2) to give K_i of $(2.0 \pm 0.5) \times 10^{-4}$ M.

Similar data for the reductive process with variable concentrations of NADH are demonstrated in Fig. S3a. As above for pyruvate, **2** retards the enzymatic reaction, though the retardation effect is lower compared to the variable pyruvate case. Values of V_{\max} and K_M calculated from slopes and intercepts of straight lines in Fig. S3b are shown in Table 2. The inhibition is noncompetitive (Fig. S3b) and, correspondingly, a higher value of K_i of $(6.0 \pm 3) \times 10^{-4}$ M was obtained (Fig. S2).

3.5. Inhibition of LDH_{rm} by **1**: Reductive process

The LDH_{rm}-catalyzed reduction of pyruvate by NADH in the presence of **1** exemplifies a different inhibitory scenario compared to the behavior of **2**. The data presented in Fig. 5a, b show that **1** at $(0.5\text{--}2.0) \times 10^{-4}$ M does not behave as a noncompetitive or competitive inhibitor of LDH_{rm} with respect to pyruvate because the Lineweaver-Burk lines do not have common intercept on x- or y-axes (Fig. 4b) [67]. Rather, a mixed inhibition is realized. The values of V_{\max} and K_M were calculated from slopes and intercepts of straight lines in Fig. 5b at different [1] (Table 3).

The data in Fig. 5 do not allow to make unambiguous choice between competitive and noncompetitive inhibition mechanism. Correspondingly, the calculation of K_i becomes ambiguous. Therefore, the inhibitor concentration for 50% inhibition ($i_{0.5}$) was calculated. Note that $i_{0.5}$ is identical to K_i in the case of distinct noncompetitive inhibition [68], which was established for **2** in this work. For this particular mixed inhibition case, $i_{0.5}$ was calculated from the values of V_{\max} in Table 3. The dependence V_{\max} on [1] was approximated as

$$V_{\max} = V_{\max}^{\circ} - \alpha[1] \quad (2)$$

The value of $i_{0.5}$ is the concentration of **1** at which $V_{\max} = \frac{1}{2}V_{\max}^{\circ}$. Hence $i_{0.5} = V_{\max}^{\circ}/2\alpha$. Thus calculated $i_{0.5} = 2.0 \times 10^{-4}$ M is compared in Table 4 with the corresponding values of K_i for convenience.

Table 4

Values of K_i or $i_{0.5}$ (in M) measured in this work at pH 7.5 and 37 °C.

Inhibitor	With respect to, in oxidative process		With respect to, in reductive process	
	L-lactate	NAD^+	Pyruvate	NADH
1	$(2.2 \pm 0.8) \times 10^{-4\text{mi}}$	$(4.0 \pm 0.4) \times 10^{-4\text{mi}}$	$(2.0 \pm 1) \times 10^{-4\text{mi}}$	$(2.2 \pm 0.6) \times 10^{-4\text{c}}$
2	$(1.7 \pm 0.2) \times 10^{-4\text{nc}}$	$(8.5 \pm 0.7) \times 10^{-4\text{nc}}$	$(2.0 \pm 0.5) \times 10^{-4\text{nc}}$	$(6.0 \pm 3) \times 10^{-4\text{nc}}$

^c) competitive inhibition; ^{mi}) mixed inhibition, $i_{0.5}$ value; ^{nc}) noncompetitive inhibition.

The NADH case exemplified the competitive inhibition of LDH_{rm} by **1** (Fig. 6). The Lineweaver-Burk straight lines cross the y-axis exactly in one point suggesting that **1** may compete with NADH for its binding site. Correspondingly, the values of V_{\max} remain constant though the K_M values increase with increasing the concentration of **1** (Table 3, Fig. S4). The inhibition constant $K_i = (2.2 \pm 0.6) \times 10^{-4}$ M was calculated as a ratio of the intercept and the slope.

3.6. Inhibition of LDH_{rm} by **1**: Oxidative process

Complex **1** retards the catalyzed conversion of L-lactate to pyruvate as expected. The data in Fig. 7 suggest a mixed inhibition mechanism, as the lines in Fig. 7b do not cross on either x- or y-axes. Values of the maximal rates and the Michaelis constants (Table 3) show variations in both K_M and V_{\max} and therefore Eq. (2) was employed for calculating $i_{0.5}$ to give the value of 2.2×10^{-4} M.

The mixed inhibition was also established when the concentration of NAD^+ was varied at different loadings of **1**. Therefore, a value of $i_{0.5} = 4.0 \times 10^{-4}$ M was calculated using Eq. (2) and was placed in Table 4 for convenience.

3.7. Theoretical modeling

The molecular docking calculations identified similar major, most favorable binding sites for polypyridine complex **1** and cyclometalated counterpart **2** (site 1, RMSD = 4.5 Å between **1** and **2**). This is not surprising as the geometry of both ruthenium complexes is matching. This binding model is shown in Fig. 9a by the example of **2**. The same site is identified for **1**. The estimated binding affinities (ΔG) are -6.8 and -7.1 kcal mol^{-1} for **1** and **2**, respectively. Those energies were used for calculating the corresponding dissociation constants ($-\Delta G = RT \ln K_d^{-1}$) of 0.16×10^{-4} and 0.099×10^{-4} M for **1** and **2**, respectively. The data are summarized in Table 5. Complexes **1** and **2** bind in the proximity of the active site of LDH_{rm}. With the example of **2**, Fig. 9a illustrates the hypothetical positions of the ruthenium complexes and bound molecules of NADH (in orange) and of the inhibitor (oxalic acid monoamide monoanion, oxamate) [69] (in blue). Data in Fig. 9a were generated on the assumption that binding of any molecule is unaffected by two others. Oxamate was chosen as a mimetic of lactate and pyruvate. It is important to note that, within the major binding site, the complex **2** (or **1**) should be located in the same area of the

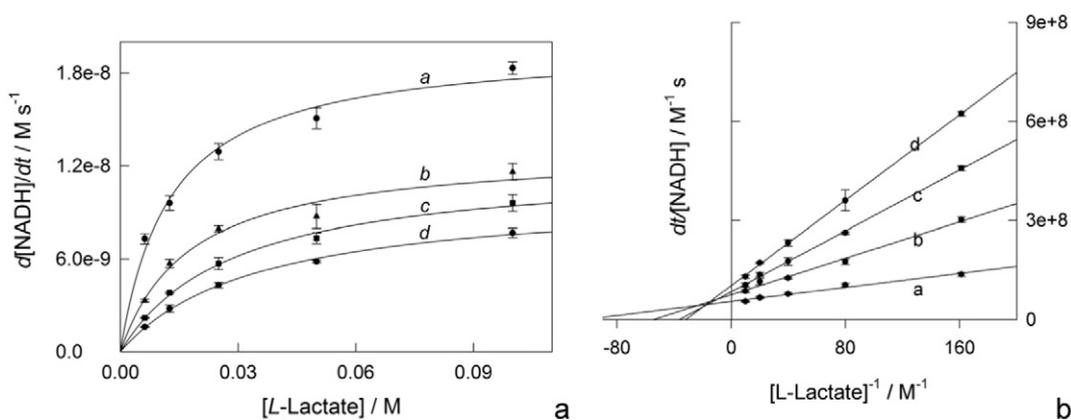


Fig. 7. (a) Steady-state rates of LDH_{rm}-catalyzed oxidation of L-lactate by NAD⁺ versus [lactate] in the presence of **1** ($(0.5\text{--}2.0) \times 10^{-4}$ M) at pH 7.5 and 37 °C. Other conditions: [LDH_{rm}] 4×10^{-10} M, [NAD⁺] 1.0×10^{-3} M. (b) Lineweaver-Burk plots of the data in (a).

enzyme, which is occupied by the central fragment of the bound NADH molecule, *i.e.* **2** (or **1**) and NADH should compete for the binding site. Therefore, **2** (or **1**) could behave as a competitive inhibitor of LDH_{rm} at least with respect to NADH/NAD⁺ (which was actually established for **1**/NADH). On the assumption that both **2** and NADH are simultaneously bound within the active site, the shortest separation between the closest carbon atom of **2** and the C4 carbon of the nicotinamide ring equals 4.5 Å (Fig. 9b). Similarly, the shortest separation between the closest carbon atom of **2** and the C2 carbon of oxamate equals 5.4 Å (Fig. 9b).

Though the binding model shown in Fig. 9a is energetically meaningful and most probable, weaker binding sites have also been identified. In the majority of cases, **1** and **2** share similar binding sites, which are more strongly separated from the bound NADH and oxamate shown in Fig. 9a. In particular, there is a probable binding site for both **1** and **2** with the oxamate C2 – the closest carbon separation of 11.4 Å, the calculated binding energies being -5.1 and -5.8 kcal mol⁻¹, respectively (site 2). The energies correspond to the dissociation constants of 2.5×10^{-4} and 0.81×10^{-4} M for **1** and **2**, respectively (Table 5).

The binding affinities of **2** to sites 1 and 2 are slightly more favorable than those of **1**. The major variance of the complexes in Chart 1 is the overall charge, which is 2+ and 1+ for **1** and **2**, respectively. Thus, electrostatics may be responsible for affinity variations because the geometry is matching. Therefore, the electrostatic contributions to ΔG of **1** and **2** were compared for the major binding site presented in Fig. 9a (site 1). The calculations performed indicate that the electrostatic advantage of **2**

over **1** equals 0.4 kcal mol⁻¹, which is comparable with $\Delta\Delta G$ for **1** and **2**. Higher electrostatic contribution for the complex with lower overall positive charge suggests that the electrostatic potential of the protein within the vicinity of the active site should be slightly more positive to account for stronger repulsion of **1**. This hypothesis agrees with the calculations of the surface potential of LDH_{rm} within site 1 shown in Fig. 10. There are significant areas with positive electrostatic potential, which could cause stronger repulsion of **1** compared to **2**.

We have also probed the binding of **2** to the enzyme-substrate complexes {LDH_{rm},oxamate} and {LDH_{rm},NADH}. As it could be anticipated from the results described above, there is no variance in binding of **2** to either free LDH_{rm} or {LDH_{rm},oxamate} in terms of both the location or the energy — all sites are well separated from the binding site of oxamate (Fig. 11).

The case is more delicate for {LDH_{rm},NADH}. Complex **2** cannot occupy site 1 because it is blocked by bound NADH (see above). Interestingly, on interaction with {LDH_{rm},NADH} **2** does not enter site 2 which was identified for free LDH_{rm}. Instead, complex **2** ‘finds’ two new geometrical binding options, *viz.* sites 3 and 4, which are demonstrated in Fig. 12 in pink and magenta. Sites 3 and 4 are much closer to bound NADH, the closest C of **2** and the C4 of NADH separations being 10.5 and 6.9 Å, respectively. The corresponding values of ΔG are shown in Table 5. We assume that sites 3 and 4 within {LDH_{rm},NADH} have electrostatic origin. The NADH binding site is overall positively charged but **2** cannot compete with NADH. Binding of NADH, which charge is 2-, makes more favorable its electrostatic interactions with positively charged **2**.

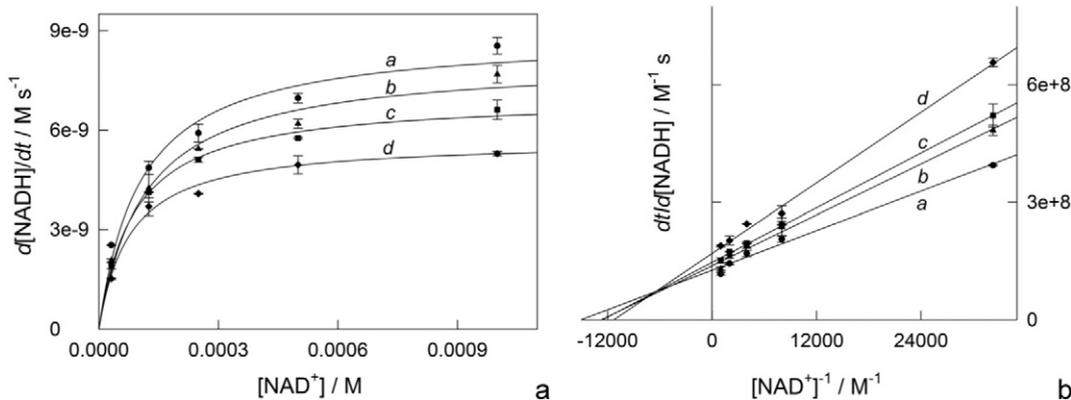


Fig. 8. (a) Steady-state rates of LDH_{rm}-catalyzed oxidation of L-lactate by NAD⁺ as a function of NAD⁺ concentration in the presence of $(0.5\text{--}2.0) \times 10^{-4}$ M **1** at pH 7.5 and 37 °C; [LDH_{rm}] 4×10^{-10} M, [lactate] 0.1 M. (b) Lineweaver-Burk plots of the data in (a).

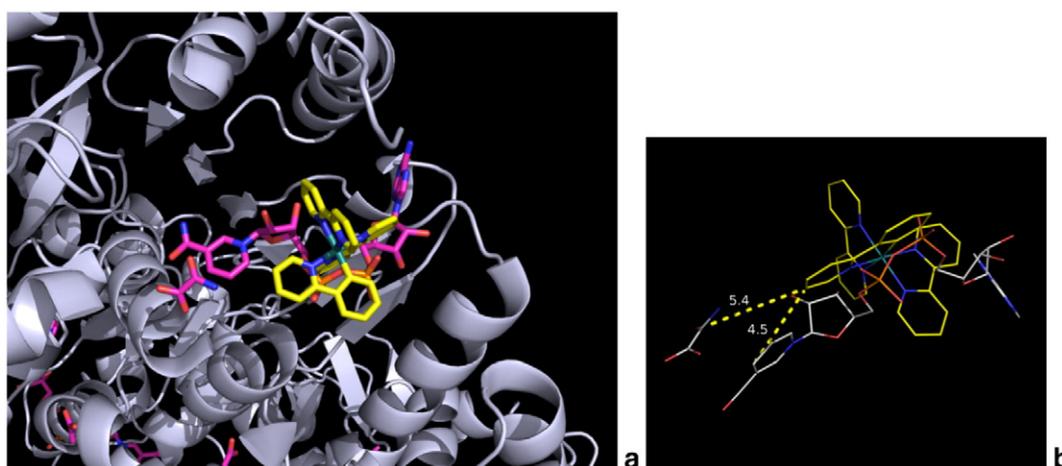


Fig. 9. (a) Major similar, most favorable binding sites for **1** and **2**, exemplified by **2** (in yellow). Bound molecules of NADH and oxamate are also shown. (b) Dash yellow lines emphasize closest separations between **2** and oxamate (5.4 Å) and between **2** and NADH (4.5 Å, see text for details).

The representative quantitative results of theoretical modeling and simulations are summarized in Table 5. In Section 4 these data will be compared with the experimental results shown in Table 4.

4. Discussion

The relationship between the biochemical properties of ruthenium compounds and their anticancer activity remains largely enigmatic. In this study we addressed this question by evaluating the impact of two closely structurally related ruthenium compounds on the activity of the redox metabolic enzyme LDH playing a role in cancer cell survival. Compound **1** has only Ru–N bonds while **2** presents one Ru–C bond. We show that this difference has a profound impact on the biological activity of the ruthenium compounds. We observed a correlation between the cytotoxicity and the inhibition of LDH activity in cancer cell and we established that at the molecular level both compounds interact and inhibit LDH differently.

4.1. Compound **2** is highly cytotoxic and inhibits LDH activity in stomach and colon cancer cells

The comparison of the biological activity of **1** and **2** in stomach and colon cancer cells showed that the presence of the Ru–C bond was critical to provide high cytotoxicity and inhibition of LDH activity. The cytotoxicity was in the low μM range independently of the

presence or not of a functional p53 protein. Inhibition of LDH activity might account for part of the cytotoxicity, although other mechanisms are likely to be involved. Indeed, even when LDH activity was inhibited by a selective LDH inhibitor (oxamate), compound **2** still further induced cytotoxicity (data not shown). Compound **2** did not change the protein level of LDH after 4 h of treatment, indicating that **2** might regulate the enzymatic activity of LDH directly or indirectly. The fact that LDH inhibition was already observed after 4 h of treatment supports also a change of LDH enzymatic activity independently of the protein level.

4.2. Noncompetitive inhibition of LDH_{rm} by **2**

The results summarized in Table 4 will be discussed in terms of the generally accepted stoichiometric mechanisms of the ordered catalysis by LDH, in general [70], and by LDH_{rm} , in particular [71,72], according to which forward and reverse reactions in Eq. (1) start with the reversible binding of NAD^+ and NADH, respectively, to the resting state of the enzyme (Scheme 1).

As it was found in this work, cyclometalated complex **2** is a noncompetitive inhibitor of LDH_{rm} in all four cases studied. The results of theoretical modeling also present evidence for the noncompetitive mechanism by revealing possible binding sites for **2** which are separated from the binding sites of substrates or their mimics, *i.e.* NADH and

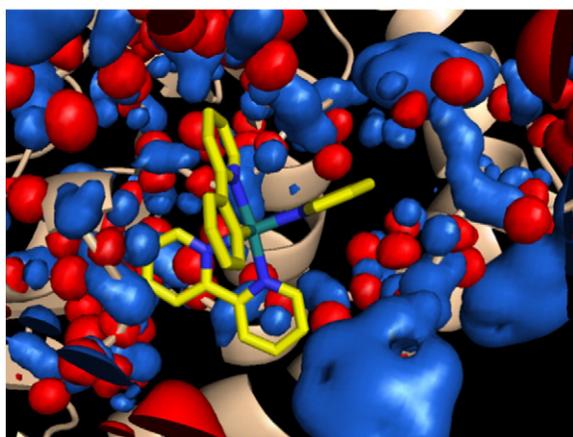


Fig. 10. Calculated electrostatic surface of binding site 1 shown with docked complex **2**. Areas with positive and negative electrostatic potentials are in red and blue, respectively (see text for details).

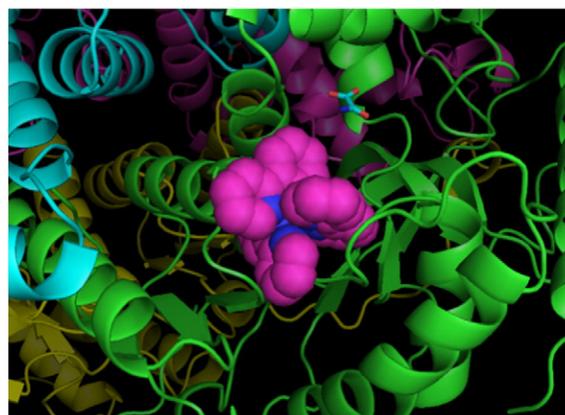


Fig. 11. Preferred binding site of **2** within enzyme-substrate complex (LDH_{rm} ,oxamate). Magenta filled sphere is the preferred binding sites for **2**.

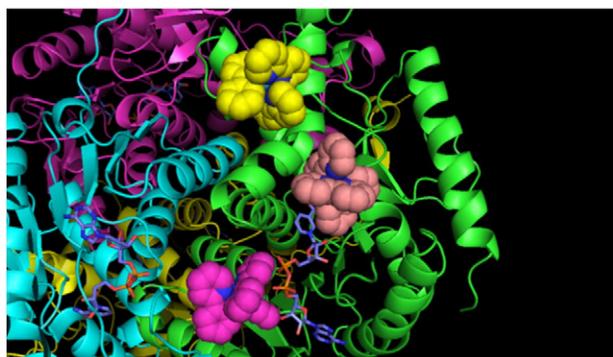


Fig. 12. Preferred binding sites of **2** within enzyme-substrate complex {LDH_{rm}, NADH} shown in pink and magenta (sites 3 and 4). Binding of **2** in site 2 in the absence of NADH is shown in yellow for comparison (see text for details).

oxamate. The noncompetitive inhibition by **2** can be quantitatively rationalized in terms of the mechanism shown in Scheme 1 by the representative example of LDH_{rm}-catalyzed oxidation of L-lactate by NAD⁺ in the presence of **2**. The following assumptions have been made: (i) inhibitor (I) has similar affinity to all forms of the enzyme (E), viz. E, E-NAD⁺ and E-NADH which is characterized by the inhibition constant K_i; (ii) the step driven by the rate constant k₋₂ is negligible because the concentration of pyruvate is very low at the early stages of lactate oxidation when the steady-state rates were measured; (iii) for the same reason as above the step driven by the rate constant k₋₃ is negligible as well. With assumptions (i)–(iii), the mass balance equation for all enzymatic forms (E_t = E + E-NAD⁺ + E-NADH + EI + EI-NAD⁺ and EI-NADH) and applying the steady-state approximation to E-NADH one arrives to Eq. (3) where L stands for L-lactate.

$$\frac{v}{E_t} = \frac{k_2 k_3 [L] [NAD^+]}{(k_2 [L] + k_3) \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)} + \frac{k_3 K_S}{k_2 [L] + k_3} + [NAD^+] \quad (3)$$

Eq. (3) is fully consistent with the non-competitive inhibition mechanism displayed in Fig. 3 because the effective catalytic constant k_{cat}^{eff} collapses to Eq. (4) with $k_{cat}^* = k_2 k_3 [L] / (k_2 [L] + k_3)$ which is consistent with the data shown in Figs. S1 and S2.

$$k_{cat}^{eff} = \frac{k_2 k_3 [L] K_i}{(k_2 [L] + k_3) (K_i + [I])} = \frac{k_{cat}^* K_i}{K_i + [I]} \quad (4)$$

Eq. (5) is Eq. (3) rewritten in the Michaelis-Menten form with respect to L-lactate. It shows that the non-competitive inhibition holds with respect to L-lactate and is consistent with data presented in Fig. 2 and the theoretical predictions.

$$\frac{v}{E_t} = \frac{\frac{k_3 [L]}{\left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)}}{k_3 (K_S + [NAD^+]) + \frac{k_2 [L]}{k_2 [NAD^+]}} + [L] \quad (5)$$

The inhibiting behavior of coordinative complex **1** is more complicated compared to **2**. It is manifested in diverse inhibition modes. There is a single case of the competitive inhibition which is observed in the LDH_{rm}-catalyzed reduction of pyruvate by NADH. In all other

cases the mixed inhibition dominates. Such differences between **1** and **2** were ascribed to a higher positive charge of **1**. Deeper analysis of the inhibition mechanisms registered for **1** is probably beyond the scope of this work because its main goal was to understand the cancer-related biochemistry of cyclometalated complex **2**. We may just speculate here that the competitive inhibition of LDH_{rm} by **1** with respect to NADH (see Fig. 6) may indicate that electrostatic effects lead to a binding position of **1** closer to the binding site of the NADH co-factor.

4.3. Validation of theoretical predictions

Impacts of theoretical results are much stronger when such are linked to corresponding experimental data. In this work it is challenging to compare experimental and theoretical data summarized in Tables 4 and 5, respectively. Of particular interest are the K_i values for the non-competitive inhibition LDH_{rm} by **2**. As mentioned earlier, in this case K_i characterizes the affinity of an inhibitor to an enzyme. The average value of four K_i's for **2** equals $(4.5 \pm 1.1) \times 10^{-4}$ M (K_i^{av}). It can be compared with the corresponding theoretical data in Table 5, particularly with K_d's for **2** which were calculated from the values of ΔG for different binding sites. The following deserves special attention. First, site 1 does not seem to be realistic — K_i^{av} differs by more than two orders of magnitude from the calculated K_d = 9.9×10^{-6} M. This difference rules out competitive inhibition of LDH_{rm} by **2** (which is actually not observed). Site 2, which presumes grounds for the noncompetitive inhibition, seems more probable as a binding option for **2** because this time K_d is much closer to K_i^{av}. The closest similarity is observed for sites 3 and 4 with theoretically predicted K_d of 1.7×10^{-4} and 2.6×10^{-4} M. The latter two practically match K_i^{av} giving extra proof that the bound cofactor induces the creation of novel binding sites (3 and 4) for cyclometalated complex **2**. Given the reasonable agreement between the experimental and computational docking results, no further calculations using, for example, molecular dynamics were performed.

4.4. Different impact of ruthenium compounds on LDH activity in vitro and in cancer cells

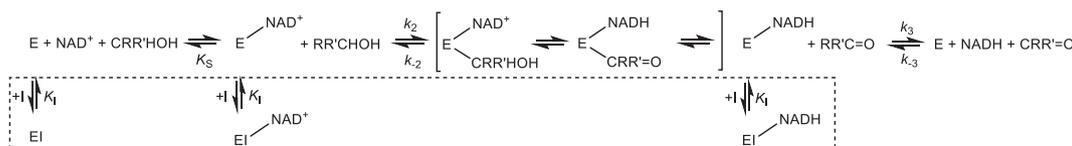
The experiments done with the purified LDH_{rm} confirmed that **2** was able to inhibit its enzymatic activity. However, this inhibition is largely weaker compared to selective LDH inhibitor actually developed. The value of K_i^{av} for **2** equals $(4.5 \pm 1.1) \times 10^{-4}$ M; i_{0.5}^{av} for **1** equals $(2.6 \pm 0.7) \times 10^{-4}$ M. Both are significantly larger than those reported for natural and synthetic inhibitors of lactate dehydrogenase which show therapeutic anticancer promise. Such, for example, are gossypol (AT-101), FX-11 (derivative of gossypol) and galloflavin with the K_i values for lactate dehydrogenase A (LDH A) of 1.9×10^{-6} , 5×10^{-8} and 5.4×10^{-6} M, respectively [34]. Note that coordinative ruthenium complex **1**, the structural analog of **2**, inhibits LDH_{rm} with similar efficacy though its anticancer activity is considerably lower. Surprisingly, in cancer cells only **2** was able to inhibit LDH activity. The basis of these differences between *in vitro* enzymatic assays performed with purified LDH and the measure of LDH activity in cells remains to be established. One possibility would be that compound **1** is somehow modified upon its entry in the cancer cells which would alter its ability to interact with LDH. Alternatively, compound **1** might have a higher affinity for other intracellular compounds, which would then diminish its interaction with LDH in cancer cells.

4.5. Medicinal anticancer implications

LDH is a redox metabolic enzyme often overexpressed in cancer cells to favor their survival in a metabolic stressful ecosystem. Targeting this enzyme, as well as other redox metabolic enzymes also selectively overexpressed in cancer, such as PKM2, represents an exciting anticancer strategy. In this respect, our observation of the ability of **2** to inhibit both *in vitro* and in cells LDH activity highlights the interest of

Table 5Summary of results of theoretical modeling of interactions of complexes **1** and **2** with LDH_{tm}: binding sites, binding energies, dissociation constants.

Site	Complex	Closest separation/Å		$\Delta G/\text{kcal mol}^{-1}$	K_d/M
		C(1/2)⋯C4(NADH)	C(1/2)⋯C2(oxamate)		
1	1	4.5	5.4	−6.8	1.6×10^{-5}
	2	4.5	5.4	−7.1	9.9×10^{-6}
2	1	13.9	11.4	−5.1	2.5×10^{-4}
	2	13.9	11.4	−5.8	8.1×10^{-5}
3	1	10.5	10.9	−5.35	1.7×10^{-4}
	2	6.9	5.6	−5.08	2.6×10^{-4}

**Scheme 1.** General ordered mechanism of catalysis by lactate dehydrogenase [70]. Its simplified version as originally proposed [71] ignores the steps in square brackets. Steps in the box are added for illustrating noncompetitive inhibition of LDH_{tm} by cyclometalated complex **2** (I).

ruthenium compounds as therapeutic anticancer strategy. It might appear disappointing that **2** is not as a strong inhibitor of LDH compared to selective inhibitors already developed. However, this is rather an advantage when we take into account the high adaptive capacity of cancer cells. Indeed, it is easier for the tumor to select cancer cells that are resistant to a molecule targeting a unique enzyme, hence providing only a short-term remission followed by a relapse. Therefore, compound **2**, which seems to have multiple targets, including LDH, will more easily escape resistance mechanisms developed by cancer cells.

5. Conclusions

Cyclometalated complexes demonstrated the ability to inhibit LDH activity both *in vitro* and in cells that partly correlated with its cytotoxic activity on stomach and colon cancer cells. The K_i calculated *in vitro* with the purified enzyme and the level of inhibition observed in cells indicate that this inhibition of LDH could be a part of the mode of action of these compounds but is unlikely to account for the whole cytotoxic activity.

Acknowledgments

We thank financial support from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Project 153151 and scholarship 245377 to Hugo Rico Bautista), DGAPA (PAPIIT project IN-207316), ARC, Ligue Contre le Cancer, CNRS, and European Cooperation in Science and Technology action CM1105.

Appendix A. Supplementary data

Additional figures illustrating inhibition data. Supplementary data associated with this article can be found in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2016.07.014>.

References

- Leyva, C. Sirlin, L. Rubio, C. Franco, R. Le Lagadec, J. Spencer, P. Bischoff, C. Gaiddon, J.-P. Loeffler, M. Pfeffer, Synthesis of cycloruthenated compounds as potential anticancer agents, *Eur. J. Inorg. Chem.* (2007) 3055–3066.
- X. Meng, M.L. Leyva, M. Jenny, I. Gross, S. Benosman, B. Fricker, S. Harlepp, P. Hébraud, A. Boos, P. Wlosik, P. Bischoff, C. Sirlin, M. Pfeffer, J.-P. Loeffler, C. Gaiddon, A ruthenium-containing organometallic compound reduces tumor growth through induction of the endoplasmic reticulum stress gene CHOP, *Cancer Res.* 69 (2009) 5458–5466.
- L. Fetzer, B. Boff, M. Ali, X. Meng, J.-P. Collin, C. Sirlin, C. Gaiddon, M. Pfeffer, Library of second-generation cycloruthenated compounds and evaluation of their biological properties as potential anticancer drugs: Passing the nanomolar barrier, *Dalton Trans.* 40 (2011) 8869–8878.
- A. Bergamo, C. Gaiddon, J.H.M. Schellens, J.H. Beijnen, G. Sava, Approaching tumor therapy beyond platinum drugs: Status of the art and perspectives of ruthenium drug candidates, *J. Inorg. Biochem.* 106 (2012) 90–99.
- H. Huang, P. Zhang, H. Chen, L. Ji, H. Chao, Comparison between polypyridyl and cyclometalated ruthenium(II) complexes: Anticancer activities against 2D and 3D cancer models, *Chem. Eur. J.* 21 (2015) 715–725.
- V. Vidimar, X. Meng, M. Klajner, C. Licon, L. Fetzer, S. Harlepp, P. Hébraud, M. Sidhoum, C. Sirlin, J.-P. Loeffler, G. Mellitzer, G. Sava, M. Pfeffer, C. Gaiddon, Induction of caspase 8 and reactive oxygen species by ruthenium-derived anticancer compounds with improved water solubility and cytotoxicity, *Biochem. Pharmacol.* 84 (2012) 1428–1436.
- A.C.G. Hotze, E.P.L. van der Geer, H. Kooijman, A.L. Spek, J.G. Haasnoot, J. Reedijk, Characterization by NMR spectroscopy, X-ray analysis and cytotoxic activity of the ruthenium(II) compounds $[\text{RuL}_3](\text{PF}_6)_2$ (L = 2-phenylazopyridine or *o*-tolylazopyridine) and $[\text{RuL}'_2\text{L}''](\text{PF}_6)_2$ (L' = 2-phenylazopyridine, 2,2'-bipyridine), *Eur. J. Inorg. Chem.* (2005) 2648–2657.
- H. Chen, J.A. Parkinson, S. Parsons, R.A. Coxall, R.O. Gould, P.J. Sadler, Organometallic ruthenium(II) diamine anticancer complexes: Arene-nucleobase stacking and stereospecific hydrogen-bonding in guanine adducts, *J. Am. Chem. Soc.* 124 (2002) 3064–3082.
- F. Wang, H. Chen, J.A. Parkinson, P.D.S. Murdoch, P.J. Sadler, Reactions of a ruthenium(II) arene antitumor complex with cysteine and methionine, *Inorg. Chem.* 41 (2002) 4509–4523.
- D. Ossipov, S. Gohil, J. Chattopadhyaya, Synthesis of the DNA-[Ru(tpy)(dppz)(CH(3)CN)](2+) conjugates and their photo cross-linking studies with the complementary DNA strand, *J. Am. Chem. Soc.* 124 (2002) 13416–13433.
- R. Cini, G. Tamasi, S. Defazio, M. Corsini, P. Zanella, L. Messori, G. Marcon, F. Piccioli, P. Orioli, Study of ruthenium(II) complexes with anticancer drugs as ligands. Design of metal-based phototherapeutic agents, *Inorg. Chem.* 42 (2003) 8038–8052.
- R. Fernandez, M. Melchart, A. Habtemariam, S. Parsons, P.J. Sadler, Use of chelating ligands to tune the reactive site of half-sandwich ruthenium(II)-arene anticancer complexes, *Chem. Eur. J.* 10 (2004) 5173–5179.
- E. Reisner, V.B. Arion, M.F.C. Guedes da Silva, R. Lichteneker, A. Eichinger, B.K. Keppler, V.Y. Kukushkin, A.J.L. Pombeiro, Tuning of redox potentials for the design of ruthenium anticancer drugs – an electrochemical study of [trans-RuCl₄(DMSO)](−) and [trans-RuCl₄L₂](−) complexes, where L = imidazole, 1,2,4-triazole, indazole, *Inorg. Chem.* 43 (2004) 7083–7093.
- A. Casini, G. Mastrobuoni, M. Terenghi, C. Gabbiani, E. Monzani, G. Moneti, L. Casella, L. Messori, Ruthenium anticancer drugs and proteins: A study of the interactions of the ruthenium(III) complex imidazolium *trans*-[tetrachloro(dimethylsulfoxide)(imidazole) ruthenate(III)] with hen egg white lysozyme and horse heart cytochrome c, *J. Biol. Inorg. Chem.* 12 (2007) 1107–1117.
- A.A. Nazarov, C.G. Hartinger, P.J. Dyson, Opening the lid on piano-stool complexes: An account of ruthenium(II)-arene complexes with medicinal applications, *J. Organomet. Chem.* 751 (2014) 251–260.
- N. Cutillas, G.S. Yellol, C. de Haro, C. Vicente, V. Rodriguez, J. Ruiz, Anticancer cyclometalated complexes of platinum group metals and gold, *Coord. Chem. Rev.* 257 (2013) 2784–2797.
- D.d.O. Silva, Perspectives for novel mixed diruthenium-organic drugs as metallopharmaceuticals in cancer therapy, *Anti Cancer Agents Med. Chem.* 10 (2010) 312–323.
- G. Süß-Fink, Arene ruthenium complexes as anticancer agents, *Dalton Trans.* 39 (2010) 1673–1688.
- A.F.A. Peacock, P.J. Sadler, Medicinal organometallic chemistry: Designing metal arene complexes as anticancer agents, *Chem. Asian. J.* 3 (2008) 1890–1899.
- A.D. Ryabov, R. Le Lagadec, H. Estevez, R.A. Toscano, S. Hernandez, L. Alexandrova, V.S. Kurova, A. Fischer, C. Sirlin, M. Pfeffer, Synthesis, characterization, and

- electrochemistry of biorelevant photosensitive low-potential orthometalated ruthenium complexes, *Inorg. Chem.* 44 (2005) 1626–1634.
- [21] B. Boff, M. Ali, L. Alexandrova, N.A. Espinosa-Jalapa, R.O. Saavedra-Díaz, R. Le Lagadec, M. Pfeffer, Rational synthesis of heteroleptic tris(chelate) ruthenium complexes $[\text{Ru}^{\text{II}}(2\text{-ph-2'-py})(\text{L}'^{\text{L}})(\text{L}'^{\text{L}})]\text{PF}_6$ by selective substitution of the ligand trans to the ruthenated phenyl ring, *Organometallics* 32 (2013) 5092–5097.
- [22] A. Vergara, G. D'Errico, D. Montesarchio, G. Mangiapia, L. Paduano, A. Merlino, Interaction of anticancer ruthenium compounds with proteins: High-resolution X-ray structures and raman microscopy studies of the adduct between hen egg white lysozyme and AziRu, *Inorg. Chem.* 52 (2013) 4157–4159.
- [23] L. Messori, A. Merlino, Ruthenium metalation of proteins: The X-ray structure of the complex formed between NAMI-A and hen egg white lysozyme, *Dalton Trans.* 43 (2014) 6128–6131.
- [24] M. Klajner, P. Hebraud, C. Sirlin, C. Gaiddon, S. Harlepp, DNA binding to an anticancer organo-ruthenium complex, *J. Phys. Chem. B* 114 (2010) 14041–14047.
- [25] S. Despax, F. Jia, M. Pfeffer, P. Hebraud, Complexation of DNA with ruthenium organometallic compounds: The high complexation ratio limit, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 16 (2014) 10491–10502.
- [26] A. Chantziis, T. Vey, S. Despax, J.-T. Issenhuth, A. Boeglin, P. Hébraud, M. Pfeffer, A. Monari, X. Assfeld, UV–Vis absorption spectrum of a novel Ru(II) complex intercalated in DNA: $[\text{Ru}(2,2'\text{-bipy})(\text{dppz})(2,2'\text{-ArPy})]^{2+}$, *J. Mol. Model.* 20 (2014) 2082.
- [27] M. Klajner, C. Licona, L. Fetzer, P. Hebraud, G. Mellitzer, M. Pfeffer, S. Harlepp, C. Gaiddon, Subcellular localization and transport kinetics of ruthenium organometallic anticancer compounds in living cells: A dose-dependent role for amino acid and iron transporters, *Inorg. Chem.* 53 (2014) 5150–5158.
- [28] M.J. Chow, C. Licona, G. Pastorin, G. Mellitzer, W.H. Ang, C. Gaiddon, Structural tuning of organoruthenium compounds allows oxidative switch to control ER stress pathways and bypass multidrug resistance, *Chem. Sci.* (2016), <http://dx.doi.org/10.1039/c6sc00268d>.
- [29] C.V. Dang, Links between metabolism and cancer, *Genes Dev.* 26 (2012) 877–890.
- [30] H. Taguchi, Lactate Dehydrogenase, in: J.R. Whitaker, A.G.J. Voragen, D.W.S. Wong (Eds.), *Handbook of Food Enzymology*, Marcel Dekker, Inc., 2003.
- [31] K. Augoff, A. Hryniewicz-Jankowska, R. Tabola, Lactate dehydrogenase 5: An old friend and a new hope in the war on cancer, *Cancer Lett.* 358 (2014) 1–7.
- [32] S.L. Sheng, J.J. Liu, Y.H. Dai, X.G. Sun, X.P. Xiong, G. Huang, Knockdown of lactate dehydrogenase suppresses tumor growth and metastasis of human hepatocellular carcinoma, *FEBS J.* 279 (2012) 3898–3910.
- [33] P. Singh, A. Bhardwaj, Mechanism of action of key enzymes associated with cancer propagation and their inhibition by various chemotherapeutic agents, *Mini-Rev. Med. Chem.* 8 (2008) 388–398.
- [34] J.R. Doherty, J.L. Cleveland, Targeting lactate metabolism for cancer therapeutics, *J. Clin. Investig.* 123 (2013) 3685–3692.
- [35] A. Le, C.R. Cooper, A.M. Gouw, R. Dinavahi, A. Maitra, L.M. Deck, R.E. Royer, D.L. Vander Jagt, G.L. Semenza, C.V. Dang, Inhibition of lactate dehydrogenase induces oxidative stress and inhibits tumor progression, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107 (2010) 2037–2042.
- [36] A. Kohlmann, S.G. Zech, F. Li, T. Zhou, R.M. Squillace, L. Commodore, M.T. Greenfield, X. Lu, D.P. Miller, W.-S. Huang, J. Qi, R.M. Thomas, Y. Wang, S. Zhang, R. Dodd, S. Liu, R. Xu, Y. Xu, J.J. Miret, V. Rivera, T. Clackson, W.C. Shakespeare, X. Zhu, D.C. Dalgarno, Fragment growing and linking lead to novel nanomolar lactate dehydrogenase inhibitors, *J. Med. Chem.* 56 (2013) 1023–1040.
- [37] H.Z. Geyer, Inhibition of lactate dehydrogenase by adenosine phosphate, *Physiol. Chem.* 348 (1967) 823–828.
- [38] J.H. Griffin, R.S. Criddle, Substrate-inhibited lactate dehydrogenase. Reaction mechanism and essential role of dissociated subunits, *Biochemistry* 9 (1970) 1195–1205.
- [39] G.M. Rothe, Inhibition of plant lactate dehydrogenase isoenzymes by benzoic acid and cinnamic acid derivatives, *Z. Pflanzenphysiol.* 79 (1976) 384–391.
- [40] C.M. Hendrickson, J.A. Bowden, In vitro inhibition of lactate dehydrogenase by insecticidal polychlorinated hydrocarbons. I. Mechanism of inhibition: Possible association of reduced nicotinamide adenine dinucleotide with Mirex, *J. Agric. Food Chem.* 24 (1976) 241–244.
- [41] N.M.J. Vermeulen, G.J. Lourens, D.J.J. Potgieter, N-substituted oxamates as inhibitors of lactate dehydrogenase, *S. Afr. J. Sci.* 77 (1981) 566–569.
- [42] S. Yamamoto, H4-isozyme of lactate dehydrogenase in the solution of sodium chloride-4. Inhibition by oxalate and oxamate, *Int. J. Biochem.* 15 (1983) 355–360.
- [43] C.B. Colen, N. Seraji-Bozorgzad, B. Marples, M.P. Galloway, A.E. Sloan, S.P. Mathupala, Metabolic remodeling of malignant gliomas for enhanced sensitization during radiotherapy: An in vitro study, *Neurosurgery* 59 (2006) 1313–1324.
- [44] M.A. Bunni, K.T. Douglas, Arylthallium(III) reagents for protein modification. Inhibition of lactate dehydrogenase from various sources by *o*-carboxyphenylthallium(III) bistrifluoroacetate, *Biochem. J.* 217 (1984) 383–390.
- [45] J. Hannemann, K. Baumann, Inhibition of lactate-dehydrogenase by cisplatin and other platinum-compounds: Enzyme leakage of LDH is not a suitable method to measure platinum-compound-induced kidney cell damage in vitro, *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* 60 (1988) 371–379.
- [46] H.D. Gaisser, J. De Vries, H. Van der Goot, H. Timmerman, Inhibition of NADH oxidase and lactate dehydrogenase of mycoplasma gallisepticum by copper complexes of 2,2'-bipyridyl analogues, *Biochem. Pharmacol.* 36 (1987) 3237–3241.
- [47] E.S. Ryabova, V.N. Goral, E. Csöregi, B. Mattiasson, A.D. Ryabov, Coordinative approach to mediated electron transfer: Ruthenium complexed to native glucose oxidase, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 38 (1999) 804–807.
- [48] A.D. Ryabov, V.S. Kurova, E.V. Ivanova, R. Le Lagadec, L. Alexandrova, Redox mediation and photomechanical oscillations involving photosensitive cyclometalated Ru(II) complexes, glucose oxidase, and peroxidase, *Anal. Chem.* 77 (2005) 1132–1139.
- [49] S.K. Trigun, R.K. Koiri, L. Mishra, S.K. Dubey, S. Singh, P. Pandey, Ruthenium complex as enzyme modulator: Modulation of lactate dehydrogenase by a novel ruthenium(II) complex containing 4-carboxy *N*-ethylbenzamide as a ligand, *Curr. Enzym. Inhib.* 3 (2007) 243–253.
- [50] R.O. Saavedra Diaz, R. Le Lagadec, A.D. Ryabov, 2-Phenylpyridine ruthenacycles as effectors of glucose oxidase activity: Inhibition by Ru(II) and activation by Ru(III), *J. Biol. Inorg. Chem.* 18 (2013) 547–555.
- [51] K. Swiderek, A. Panczakiewicz, A. Bujacz, G. Bujacz, P. Paneth, Modeling of isotope effects on binding oxamate to lactic dehydrogenase, *J. Phys. Chem. B* 113 (2009) 12782–12789.
- [52] B.L. Hauenstein, M. Krishnagopal, J.N. Demas, B.A. DeGraff, Electron-transfer quenching of ruthenium(II) photosensitizers by mercury(II) chlorides. 1. Reactions in aqueous solution, *Inorg. Chem.* 23 (1984) 1101–1107.
- [53] S. Benosman, X. Meng, Y. Von Grabowieccki, L. Palamiuc, L. Hritcu, I. Gross, G. Mellitzer, G. Taya, J.P. Loeffler, C. Gaiddon, Complex regulation of p73 isoforms after alteration of amyloid precursor polypeptide (APP) function and DNA damage in neuron, *J. Biol. Chem.* 286 (2011) 43013–43025.
- [54] F. Chan, K. Moriwaki, M.J. De Rosa, Detection of necrosis by release of lactate dehydrogenase (LDH) activity, *Methods Mol. Biol.* 979 (2013) 65–70.
- [55] D.P. Rillema, D.S. Jones, C. Woods, H.A. Levy, Comparison of the crystal structures of tris heterocyclic ligand complexes of ruthenium(II), *Inorg. Chem.* 31 (1992) 2935–2938.
- [56] E.V. Ivanova, I.V. Kurnikov, A. Fischer, L. Alexandrova, A.D. Ryabov, Enantioselectivity of resolved Δ and Λ orthoruthenated 2-phenylpyridine complexes $[\text{Ru}(o\text{-C}_6\text{H}_4\text{-2-py})(\text{LL})_2]\text{PF}_6$ (LL = bpy and phen) toward glucose oxidase, *J. Mol. Catal. B Enzym.* 41 (2006) 110–116.
- [57] M.J. Frisch, G.W. Trucks, H.B. Schlegel, G.E. Scuseria, M.A. Robb, J.R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, B. Mennucci, G.A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Caricato, X. Li, H.P. Hratchian, A.F. Izmaylov, J. Bloino, G. Zheng, J.L. Sonnenberg, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, J.A. Montgomery, J.E. Peralta, F. Ogliaro, M. Bearpark, J.J. Heyd, E. Brothers, K.N. Kudin, V.N. Staroverov, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. Rendell, J.C. Burant, S.S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, N. Rega, J.M. Millam, M. Klene, J.E. Knox, J.B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R.E. Stratmann, O. Yazyev, A.J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J.W. Ochterski, R.L. Martin, K. Morokuma, V.G. Zakrzewski, G.A. Voth, P. Salvador, J.J. Dannenberg, S. Dapprich, A.D. Daniels, O. Farkas, J.B. Foresman, J.V. Ortiz, J. Cioslowski, D.J. Fox, *Gaussian 09*, Revision B.01, 2009.
- [58] A.D. Becke, Density-functional exchange-energy approximation with correct asymptotic behavior, *Phys. Rev. A* 38 (1988) 3098–3100.
- [59] A.D. Becke, Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange, *J. Chem. Phys.* 98 (1993) 5648.
- [60] C. Lee, W. Yang, R.G. Parr, Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density, *Phys. Rev. B Condens. Matter* 37 (1988) 785–789.
- [61] P.J. Hay, W.R. Wadt, Ab initio effective core potentials for molecular calculations. Potentials for the transition metal atoms Sc to Hg, *J. Chem. Phys.* 82 (1985) 270–283.
- [62] W.R. Wadt, P.J. Hay, Ab initio effective core potentials for molecular calculations. Potentials for K to Au including the outermost core orbitals, *J. Chem. Phys.* 82 (1985) 299–310.
- [63] P.J. Hay, W.R. Wadt, Ab initio effective core potentials for molecular calculations. Potentials for main group elements Na to Bi, *J. Chem. Phys.* 82 (1985) 284–298.
- [64] G.M. Morris, R. Huey, W. Lindstrom, M.F. Sanner, R.K. Belew, D.S. Goodsell, A.J. Olson, *AutoDock4* and *AutoDockTools4*: Automated docking with selective receptor flexibility, *J. Comput. Chem.* 16 (2009) 2785–2791.
- [65] The PyMOL molecular graphics system, Version 1.8, LLC, Schrödinger, 2015.
- [66] C. Gaiddon, M. Lokshin, A.T. Zhang, C. Prives, A subset of tumor-derived mutant forms of p53 down-regulate p63 and p73 through a direct interaction with the p53 core domain, *Mol. Cell. Biol.* 21 (2001) 1874–1887.
- [67] A. Fersht, *Enzyme Structure and Mechanism*, second ed. Freeman, New York, 1985.
- [68] A. Cortés, M. Cascante, M.L. Cárdenas, A. Cornish-Bowden, Relationships between inhibition constants, inhibitor concentrations for 50% inhibition and types of inhibition: New ways of analysing data, *Biochem. J.* 357 (2001) 263–268.
- [69] W.B. Novoa, A.D. Winer, A.J. Glaid, G.W. Schwert, Lactic dehydrogenase. V. Inhibition by oxamate and by oxalate, *J. Biol. Chem.* 234 (1959) 1143–1148.
- [70] J.J. Holbrook, H. Gutfreund, Approaches to the study of enzyme mechanisms lactate dehydrogenase, *FEBS Lett.* 31 (1973) 157–169.
- [71] V. Zewe, H.J. Fromm, Kinetic studies of rabbit muscle lactate dehydrogenase, *J. Biol. Chem.* 237 (1962) 1668–1675.
- [72] V. Zewe, H.J. Fromm, Kinetic studies of rabbit muscle lactate dehydrogenase. II. Mechanism of the reaction, *Biochemistry* 4 (1965) 782–792.