



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE DEL FARMACO

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN FARMACIA

TESI DI LAUREA

**STUDIO DELL'ATTIVITÀ ANTIPROLIFERATIVA E DEL
MECCANISMO D'AZIONE DI NUOVI COMPLESSI
ETEROLETTICI DI Ag(I) CON LEGANTI FOSFINICI**

RELATORE: CHIAR.MA PROF.SSA CRISTINA MARZANO

CORRELATORI: CHIAR.MA PROF.SSA VALENTINA GANDIN
DOTT. MICHELE DE FRANCO

LAUREANDA: LUDOVICA MORANDO

ANNO ACCADEMICO 2021/2022

INDICE

1	INTRODUZIONE	1
1.1	COMPLESSI METALLICI IN MEDICINA	1
1.2	COMPLESSI METALLICI COME AGENTI ANTITUMORALI: IL CISPLATINO	2
1.2.1	Farmacocinetica e farmacodinamica del cisplatino	3
1.2.2	Sviluppo di farmacoresistenza al cisplatino	7
1.2.3	Limiti della terapia con cisplatino	11
1.2.4	Sviluppo di nuovi farmaci analoghi al cisplatino	12
1.3	COMPLESSI METALLICI NON PLATINO COME POTENZIALI AGENTI ANTITUMORALI	13
1.4	L' ARGENTO	15
1.4.1	Chimica dell'argento	15
1.4.2	Chimica di coordinazione	16
1.4.3	Biochimica dell'argento	16
1.5	ARGENTO IN MEDICINA	19
1.5.1	L'argento in ambito antitumorale	21
1.6	COMPLESSI DI ARGENTO CON ATTIVITÀ ANTITUMORALE	23
1.6.1	Chimica delle fosfine	23
1.6.2	Complessi di Ag(I) con leganti fosfinici	25
1.6.3	Leganti N-N donatori	28
1.6.4	Meccanismo dell'azione antitumorale	30
1.7	IL COMPLESSO TIOREDOSSINICO	31
1.7.1	Trx e TrxR nello sviluppo del tumore	34
1.7.2	Gli inibitori della Trx e TrxR	36
2	OBIETTIVO DELLA TESI	41
3	MATERIALI, STRUMENTAZIONI E METODI	43
3.1	COMPOSTI TESTATI	43
3.1.1	Composti di Ag(I) con leganti fosfinici	43
3.2	REAGENTI	44
3.3	LINEE CELLULARI E CONDIZIONI DI CRESCITA	45
3.3.1	Cellule PSN-1	45
3.3.2	Cellule HCT-15	46
3.3.3	Cellule 2008	46
3.3.4	Cellule A431	46
3.3.5	Cellule U1285	46
3.3.6	Cellule C13*	47
3.3.7	Cellule MDA-MB-231	47
3.4	DETERMINAZIONE DEL COEFFICIENTE OTTANOLO-ACQUA	47
3.5	TEST DI VITALITÀ CELLULARE	48
3.5.1	MTT test	48
3.6	DETERMINAZIONE DELL'INTERNALIZZAZIONE CELLULARE	49
3.7	DETERMINAZIONE DELL'ATTIVITÀ DELLA TrxR	50

3.8	DETERMINAZIONE DELLE SPECIE REATTIVE DELL'OSSIGENO	51
3.9	DETERMINAZIONE DEI GRUPPI TIOLICI	52
3.10	VALUTAZIONE DEL POTENZIALE DI MEMBRANA MITOCONDRIALE	53
3.11	COLORAZIONE CON HOECHST 33258	53
4	RISULTATI E DISCUSSIONE	55
4.1	DETERMINAZIONE DEL COEFFICIENTE DI RIPARTIZIONE OTTANOLO-ACQUA	55
4.2	TEST DI VITALITÀ CELLULARE	56
4.2.1	MTT test su cellule tumorali	56
4.2.2	Studi di resistenza crociata	58
4.3	DETERMINAZIONE DELL'INTERNALIZZAZIONE CELLULARE	61
4.4	DETERMINAZIONE DELL'ATTIVITÀ DELLA TrxR	63
4.5	VALUTAZIONE DELL'EFFETTO INDOTTO DAI COMPLESSI A LIVELLO MITOCONDRIALE	65
4.5.1	Determinazione delle specie reattive dell'ossigeno (ROS)	66
4.5.2	Determinazione dei gruppi tiolici	67
4.5.3	Valutazione del potenziale di membrana mitocondriale	68
4.6	COLORAZIONE CON HOECHST 33258	69
5	CONCLUSIONI	71
6	BIBLIOGRAFIA	74

1 INTRODUZIONE

1.1 COMPLESSI METALLICI IN MEDICINA

Molti degli ioni metallici presenti nella tavola periodica sono coinvolti nella regolazione di diverse funzioni fisiologiche e patologiche all'interno dei sistemi biologici. Una proprietà chimica dei metalli è la loro capacità di perdere facilmente elettroni dal loro orbitale esterno, e passare quindi dal loro stato metallico o elementare ad una forma carica positivamente, la cosiddetta forma "ionica" che tende ad essere solubile nei fluidi biologici. È proprio in questa forma che gli ioni metallici esercitano le loro attività in biologia (Frezza et al. 2010).

Alcuni metalli come rame, ferro, zinco, selenio e magnesio sono definiti metalli essenziali in quanto oltre ad essere fisiologicamente presenti in tracce nell'organismo vivente, sono fondamentali per la sopravvivenza delle cellule in quanto coadiuvano biotrasformazioni indispensabili alla vita (Carver 2019).

Ad esempio, il ferro si trova all'intero dell'emoglobina, una proteina trasportatrice presente nel sangue che è in grado di legare le molecole di ossigeno grazie alla presenza dell'atomo di ferro allo stato di ossidazione Fe^{2+} . Un altro metallo presente nell'organismo è lo zinco, componente naturale dell'insulina, un ormone che svolge un ruolo fondamentale nella regolazione del metabolismo glucidico; il calcio è il minerale maggiormente presente nel corpo umano, infatti rappresenta la struttura fondamentale di ossa e scheletro (Orvig and Abrams 1999).

Il ruolo degli ioni metallici nei sistemi biologici è complesso, infatti squilibri delle loro concentrazioni, spesso legati a causa ambientali oppure genetiche, sono associati ad un diverso numero di patologie. Sulla base di queste osservazioni, la ricerca scientifica si è concentrata sullo studio e sviluppo di composti di coordinazione, quindi di farmaci contenenti ioni come potenziali agenti utili a fini medici (Orvig and Abrams 1999).

Infatti, una nuova importante area della medicina è la *Medicinal Inorganic Chemistry*, che si basa sul concetto che i complessi metallici avendo un centro metallico carico positivamente sono in grado di legare biomolecole cariche negativamente come i costituenti di proteine ed acidi nucleici, che sono ottimi leganti per ioni metallici. Ciò ha permesso l'introduzione di tali composti in vari ambiti clinici, terapeutici e diagnostici (Zhang and Lippard 2003).

Uno dei primi farmaci *metal-based*, contenente arsenico, fu il Salvarsan (3-ammino-4-idrossifenil-arsenico(III)), un agente antimicrobico sviluppato nel 1912 da Paul Ehrlich, efficace nel trattamento della sifilide (Mjos and Orvig 2014).

1.2 COMPLESSI METALLICI COME AGENTI ANTITUMORALI: IL CISPLATINO

La neoplasia è da sempre la diagnosi di malattia più temuta e ad oggi, XXI secolo, si sta diffondendo con continua e crescente incidenza (Roy and Saikia 2016).

Fino alla metà degli anni '60, la terapia antitumorale si basava su composti puramente organici (Makovec 2019). Nel 1845, Michele Peyrone sintetizzò il cisplatino, ma la scoperta della sua proprietà biologica citostatica, risale al 1965 e la si deve al biofisico Barnett Rosenberg. (Hausman 2019) (Dilruba and Kalayda 2016). Durante gli esperimenti che stava conducendo per analizzare l'effetto del campo elettrico sulla crescita batterica, Rosenberg osservò che la proliferazione batterica dell'*Escherichia coli* cessava e individuò la causa di questo fenomeno nell'elettrodo di platino utilizzato (Dilruba and Kalayda 2016). I risultati ottenuti hanno portato alla conclusione che i composti in grado di inibire la divisione di *E. Coli* potevano essere utili anche per il trattamento del cancro; infatti il complesso planare che conteneva lo ione Pt^{2+} con configurazione *cis*, diventato successivamente noto come cisplatino, era molto efficace nell'arrestare la crescita delle cellule di sarcoma S180 e leucemia L1210.

Questa scoperta accidentale, ha aperto la porta anche a composti di coordinazione inorganici a base di platino nella terapia antitumorale (Makovec 2019). Gli studi clinici sono stati avviati nel 1971 e dopo aver superato una serie di ostacoli, il cisplatino è stato approvato per l'uso nel cancro ai testicoli e alle ovaie dalla *Food and Drug Administration* degli Stati Uniti e in diversi paesi europei nel 1979 (Dilruba and Kalayda 2016).

Ad oggi, il cisplatino o (SP-4-2)-diamminodichloroplatino(II) è uno dei farmaci più potenti e per questo ampiamente utilizzato per il trattamento di vari tumori solidi, come il cancro ai testicoli, alle ovaie, alla vescica, ai polmoni, al collo dell'utero e allo stomaco (Hausman 2019).

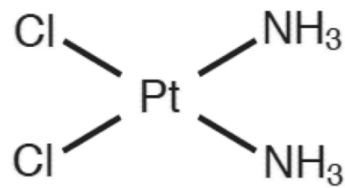


Figura 1: Struttura chimica del cisplatino.

1.2.1 Farmacocinetica e farmacodinamica del cisplatino

Il cisplatino esercita la sua attività antitumorale attraverso molteplici meccanismi, ma il principale prevede il legame al DNA, genomico (gDNA) o mitocondriale (mtDNA), tramite interazioni con le basi puriniche, per creare lesioni al DNA, bloccare la produzione di DNA, mRNA e proteine, arrestare la replicazione, attivare le vie di trasduzione che alla fine portano a necrosi o all'apoptosi (Hausman 2019).

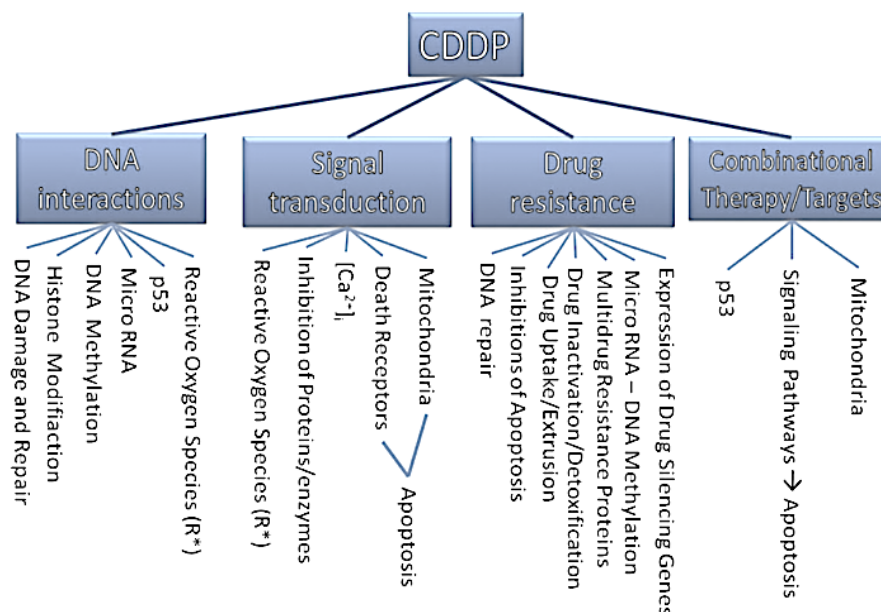


Figura 2: Target del cisplatino (Florea and Büsselberg 2011).

Gli agenti che formano legami crociati con il DNA sono elettrofili reattivi che interagiscono con due residui nucleofili appartenenti a uno o due filamenti di DNA. La formazione di legami crociati, intracatena o intercatena determina rispettivamente la distruzione del DNA e la morte cellulare (Foye 2008).

Una volta somministrato per via endovenosa, il cisplatino diffonde velocemente nei tessuti e si lega alle proteine plasmatiche, in particolar modo all'albumina (90%)

portando all'inattivazione di una grande quantità di molecole. Questo legame è il risultato della forte reattività del platino nei confronti dello zolfo contenuto nei gruppi tiolici degli amminoacidi (Cepeda et al. 2007).

Il cisplatino può essere internalizzato principalmente per tre vie:

- Diffusione passiva: accumulo intracellulare proporzionale alla sua concentrazione, il suo passaggio non è saturabile (Gately and Howell 1993).
- Trasporto attivo:
 - o Proteine transmembrana quali hCTR1 o hCTR2 (*Human copper Transporter Receptor 1 and 2*),
 - o Proteine di trasporto di cationi organici OTCs (*Organic Cation Transporter*),
 - o 2 ATPasi, denominate 7A e 7B,
 - o Proteina ABCC2 appartenente alla famiglia delle ABC (*ATP-binding cassette*) oppure MRP2 (*Multidrug Resistance Protein 2*) (Puckett, Ernst and Barton 2010, Gately and Howell 1993).

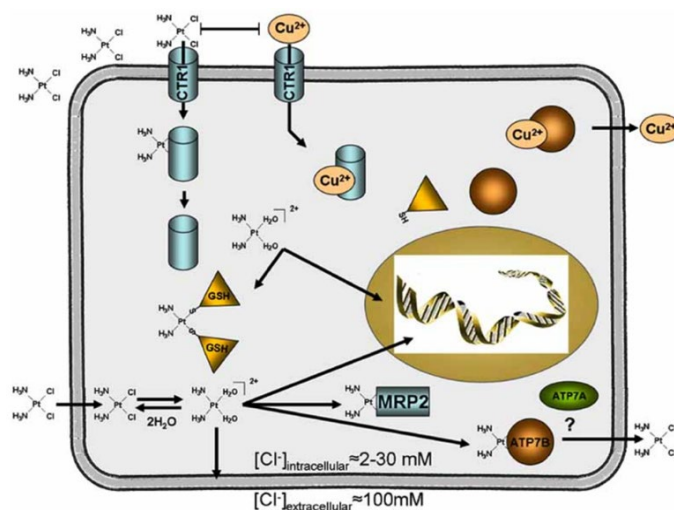


Figura 3: Rappresentazione dell'uptake, dell'efflusso e del binding del cisplatino al DNA (Wang and Lippard 2005).

Nel citoplasma, in presenza di una bassa concentrazione di ioni cloruro, il cisplatino subisce un processo di idrolisi con perdita degli ioni cloruro ed acquisizione di molecole d'acqua con la formazione dei cationi $[\text{Pt}(\text{H}_2\text{O})\text{Cl}(\text{NH}_3)_2]^+$ e $[\text{Pt}(\text{H}_2\text{O})_2(\text{NH}_3)_2]^{2+}$. Le specie acquose che si formano in questo processo sono

considerate le forme biologicamente attive del cisplatino: essendo molto elettrofile e possedendo ottimi gruppi uscenti (le molecole di acqua sono infatti migliori dei cloruri) reagiscono facilmente con i centri nucleofili delle biomolecole (Freake 1969). Per questo motivo è necessario che le soluzioni saline di cisplatino siano ricche di cloro, per evitare che la biotrasformazione si verifichi a livello del torrente circolatorio ma che avvenga solo all'interno della cellula, dove la concentrazione di ioni cloruro è inferiore (Valadez, Norton and Neary 2015).

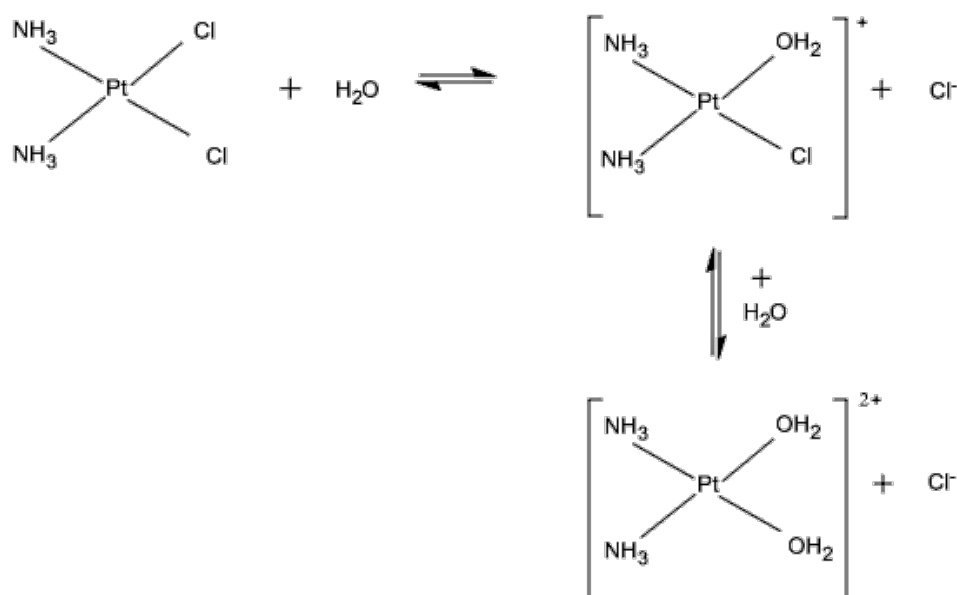


Figura 4: Meccanismo di idrolisi del cisplatino con formazione di specie monoacquo e diaquo.

La reazione di platinazione del DNA consiste nel legame dell'atomo di platino al DNA, tramite formazione di legami covalenti preferibilmente con l'azoto in posizione 7 dell'anello imidazolico della guanina (e in misura minore dell'adenina), questo perché è stericamente più esposto oltre che essere molto nucleofilo. Nella reazione del cisplatino con la guanina si forma prima un addotto monofunzionale, e poi a seguito della chiusura dell'anello imidazolico, attraverso un secondo legame, un addotto bifunzionale (Wang and Lippard 2005). Questi legami crociati possono essere *intra-strand* o *inter-strand* (Foye 2008). Si formano principalmente legami *intra-strand*: in particolare i legami 1,2-*intrastrand* ApG e GpG risultano maggiormente responsabili dell'azione citotossica del cisplatino, in quanto attivano diverse vie di trasduzione del segnale, comprese quelle che coinvolgendo ATR, p53, p73 e MAPK culminano nell'apoptosi (Siddik 2003). Infatti, gli addotti 1,2-*intrastrand* GpG e ApG disavvolgono il DNA di 13°, quindi piegano il DNA verso il

solco maggiore, esponendo una parte del solco minore a cui si legano diverse proteine, che possono avviare la riparazione del danno o segnalare l'attivazione della cascata apoptotica (Hall et al. 2006).

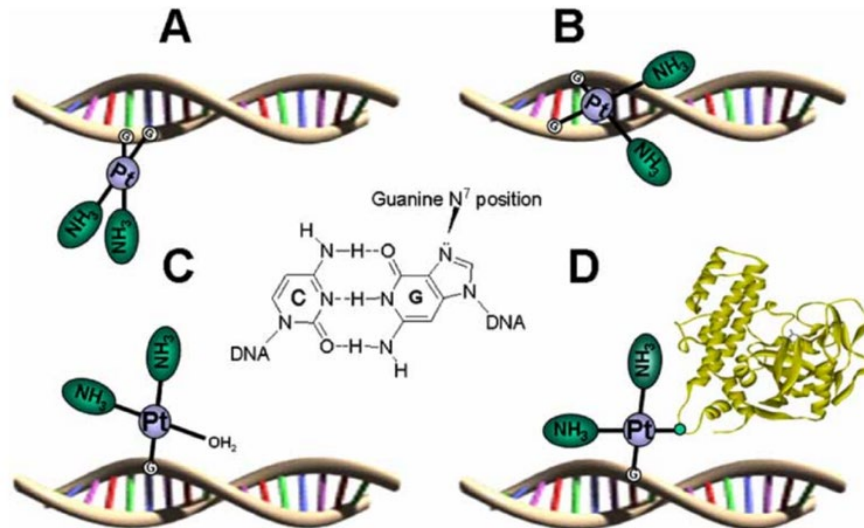


Figura 5: Principali addotti che si formano dall'interazione cisplatino e DNA: (A) reticolazione 1,2-*intra-strand*, (B) reticolazione *inter-strand*, (C) addotto monofunzionale, (D) reticolazione proteina-DNA (Cepeda et al. 2007).

Quando avviene un danno a livello del DNA, vengono attivate le vie di trasduzione del segnale, tra cui: la via di segnale AKT, proteina chinasi che promuove la sopravvivenza cellulare, la via di segnale c-ABL, tirosin-chinasi che viene sovraespressa nei tumori e stimola l'apoptosi; e la via del gene p53, un oncosoppressore che promuove la riparazione del DNA (Cepeda et al. 2007, Wang and Lippard 2005).

Per consentire la riparazione del DNA, a seguito dell'attivazione delle vie di traduzione, la cellula interrompe il ciclo cellulare. Il meccanismo principale attraverso cui si ha rimozione degli addotti DNA-cisplatino è il NER (*Nucleotide Excision Repair*) che prevede il riconoscimento della lesione, il taglio e la rimozione dei frammenti contenenti il danno, a cui segue sintesi del nuovo filamento. Altri meccanismi di riparazione sono: la MMR (*MisMatch Repair*), un sistema per riconoscere e riparare l'inserimento, la cancellazione e l'errata incorporazione di basi; la DNA-PK (*DNA Protein Kinase*), una serina/treonina chinasi nucleare la cui attività è stimolata dalle estremità del DNA a doppio filamento, è costituita da 2 subunità: una catalitica e da un componente Ku che lega l'estremità del DNA. Una funzione della DNA-PK è quella di collegare le estremità rotte per facilitare il

ricongiungimento, l'altra è quella di reclutare e attivare le proteine coinvolte nell'elaborazione e nella legatura del DNA (Burma and Chen 2004).

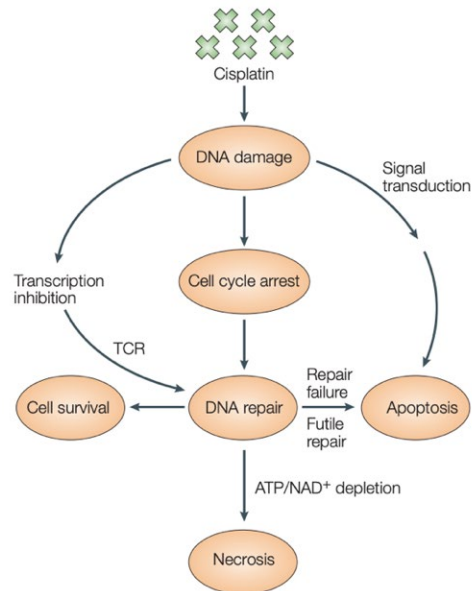


Figura 6: Cisplatino e le vie di morte cellulare: necrosi e apoptosi (Wang and Lippard 2005).

1.2.2 Sviluppo di farmacoresistenza al cisplatino

La resistenza ai farmaci è un fenomeno ampiamente diffuso ed è noto soprattutto tra i farmaci antitumorali. L'uso di farmaci come il cisplatino, fondamentale nella chemioterapia, è ostacolato dalla resistenza e ciò può portare al fallimento della terapia. La resistenza si manifesta quando le cellule neoplastiche non rispondono al trattamento, questo fenomeno può essere intrinseco, se il farmaco è inefficace sin dall'inizio della terapia, oppure acquisito, se il farmaco è attivo all'inizio ma diventa inefficace con il passare del tempo (Makovec 2019, Florea and Büsselberg 2011).

La resistenza al cisplatino è dovuta a molteplici fattori, quali ridotto accumulo intracellulare di farmaco, inattivazione mediante legame con diverse proteine (glutazione e metallotioneine), aumento della riparazione del DNA, alterazione di diverse proteine che regolano l'apoptosi (Hausman 2019).

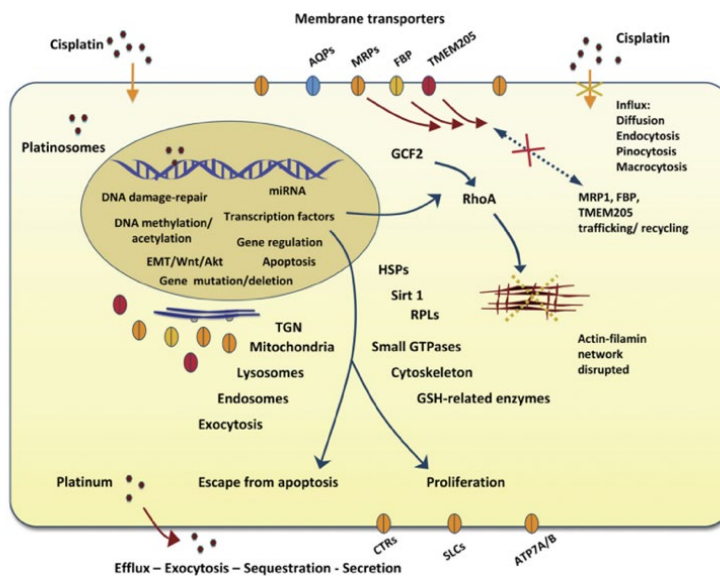


Figura 7: Illustrazione dei sistemi di autodifesa cellulare che mediano la resistenza al cisplatino (Shen et al. 2012).

Per meglio comprendere i meccanismi di resistenza, risulta più chiaro suddividerli in *pre*, *on*, *post* e *off-target*, facendo riferimento al momento in cui tali eventi vanno ad innescarsi.

- Resistenza *pre-target*: riguarda prevalentemente l'alterazione dell'*uptake* cellulare di farmaco e dipende dall'espressione di proteine implicate nel trasporto del cisplatino. L'*uptake* del platino dipende dalla presenza del trasportatore hCTR1 del rame e in cellule cisplatino-resistenti si sono riscontrati livelli ridotti di mRNA destinato alla sintesi di hCTR1, il che comporta un ridotto *uptake* di rame e quindi di cisplatino (Zisowsky et al. 2007, Lee et al. 2011, Amable 2016). Altre due proteine trasportatrici implicate nei meccanismi di resistenza al cisplatino sono la glicoproteina P e le MRP (*Multidrug Resistance Proteins*), riscontrate in molte linee cellulari resistenti che impediscono l'accumulo del farmaco all'interno delle cellule. Anche due ATPasi, ATP7A e ATP7B, sono coinvolte in questi meccanismi, hanno dimostrato di avere un ruolo importante nell'efflusso del farmaco dalla cellula (Lee et al. 2011, Burger et al. 2011). Altri meccanismi di resistenza *pre-target* riguardano variazioni delle proprietà di membrana: studi *in vitro* hanno dimostrato che una minore fluidità della membrana ostacola l'accumulo del cisplatino all'interno della cellula. Per questo motivo le cellule resistenti, presentando una membrana meno fluida, accumulano molto meno principio attivo al loro interno rispetto alle cellule

non resistenti (Cohen et al. 2013). Infine, può manifestarsi inattivazione del cisplatino, in quanto viene impedita l'interazione tra il farmaco e il DNA, così, subendo un danno minore, la cellula riesce a sopravvivere. Nello specifico, avviene un'interazione tra il farmaco e le molecole ricche di residui cisteinici (glutathione e metallothioneine) che sequestrano il metallo riducendo il danno al DNA (Rabik and Dolan 2007). La coniugazione del cisplatino al glutathione ad esempio, catalizzata dalle GTs (glutathione S-transferasi), favorisce un'espulsione più rapida del complesso tramite pompe ATP-dipendenti, quali MRP1 o MRP2 (*Multidrug Resistance Protein*) (Kelland 2007).

- Resistenza *on-target*: interessa un aumento della capacità riparatrice del DNA e/o una maggiore tolleranza al danno. Come accennato in precedenza, il NER (*Nucleotide Excision Repair*) ad esempio, è un sistema che elimina i nucleotidi danneggiati mediante taglio al DNA su entrambi i lati dell'elica su cui si è verificato il danno, seguito da una nuova sintesi di DNA per sostituire la porzione lesionata e ricostituire l'integrità del genoma (Gillet and Schärer 2006).

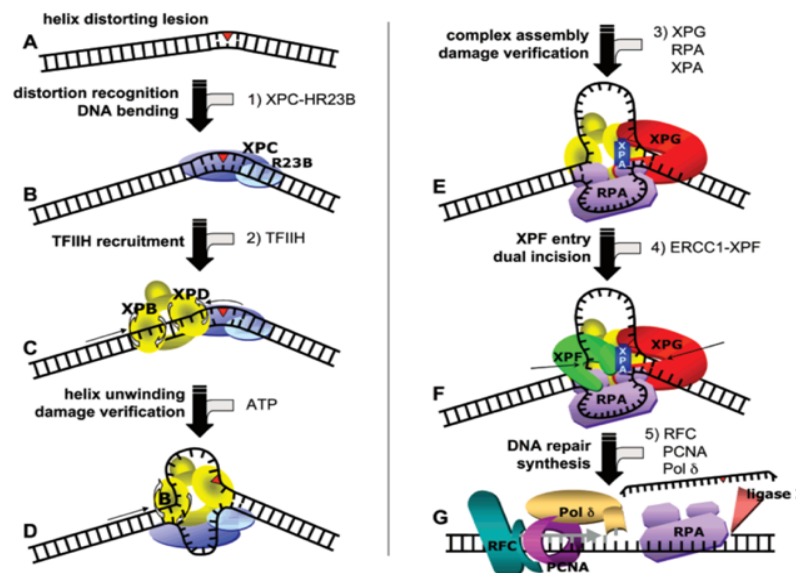


Figura 8: Illustrazione del meccanismo di NER (Nucleotide Excision Repair) (Gillet and Schärer 2006).

Un altro sistema di riparazione è rappresentato dalle MMR (*MisMatch Repair*) che riconoscono erronee inserzioni, delezioni o incorporazioni di basi che si possono verificare durante i normali processi replicativi (Galluzzi

et al. 2012). Alcuni studi hanno dimostrato che un aumento dei livelli di proteine coinvolte nella riparazione del DNA rende le cellule meno sensibili, quindi più resistenti al trattamento con il cisplatino (Florea and Büsselberg 2011).

- Resistenza *post-target*: si traduce in alterazioni del *signaling* che di norma conduce all'apoptosi della cellula in risposta a danni al DNA. La P53 è una proteina codificata da gene oncosoppressore TP53, ed è uno dei meccanismi più studiati, in quanto la sua inattivazione compare nella maggior parte delle neoplasie fino ad oggi conosciute (Galluzzi et al. 2012). Un'altra via di trasduzione coinvolta in questo tipo di resistenza è la via delle caspasi, delle proteasi responsabili dell'inizio del *signaling* cellulare che conduce all'apoptosi. In presenza di resistenza al cisplatino la cascata di segnali indotta dalle caspasi risulta alterata (Janson, Johansson and Grankvist 2010).
- Resistenza *off-target*: la resistenza al cisplatino può essere indotta anche da alterazioni di meccanismi di segnalazione non direttamente correlati ad esso. L'autofagia è un meccanismo cellulare di rimozione selettiva di componenti citoplasmatici danneggiati, per degradazione lisosomiale degli organelli citoplasmatici o dei componenti citosolici, che viene stimolata da condizioni di stress cellulare come presenza di ROS, danni al DNA o privazione di nutrienti ed è una via strettamente regolata (Kroemer, Mariño and Levine 2010). Nelle linee cellulari tumorali di ovaio e polmone, è stato registrato un aumento dell'attivazione di questo processo, il che spiega l'acquisizione di resistenza al cisplatino (Ren et al. 2010). La chinasi Mirk/Dyrk1B ha la funzione di mediare la differenziazione cellulare e di limitare l'apoptosi nei mioblasti, ma risulta sovraespressa o iperattiva in diverse linee cellulari tumorali, dove assume ruolo antiapoptotico (Friedman 2007). La deplezione di questa chinasi sembra avere effetto favorevole nell'aumentare la sensibilità al cisplatino (Hu and Friedman 2010). Analogamente la sovraespressione dell'oncogene c-erbB-2 (HER2/neu), che codifica per un recettore transmembrana tirosin-chinasico, assieme all'espressione di alcuni oncogeni, è stata associata a una prognosi sfavorevole nel cancro alle ovaie e alla mammella, e allo

sviluppo di resistenza al cisplatino in tumori polmonari (Hengstler et al. 1999).

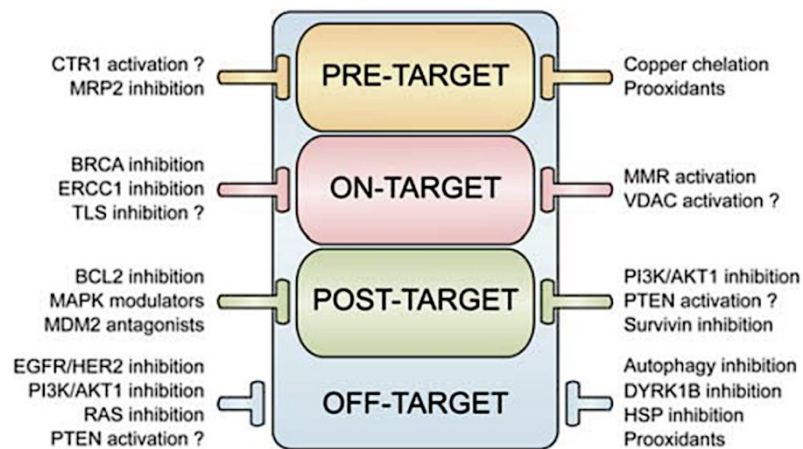


Figura 9: Multifattorialità della resistenza al cisplatino (Galluzzi et al. 2012).

1.2.3 Limiti della terapia con cisplatino

Il principale ostacolo per l'uso clinico del cisplatino è rappresentato dalla tossicità multiorgano che ne deriva (Makovec 2019). Alcuni tra i diversi limiti della terapia sono riportati di seguito:

- **Nefrotossicità:** è causata da elevate concentrazioni di cisplatino nei reni e dalla compromissione del sistema di trasporto renale dovuto a formazione di chelati fra il platino ed i residui tiolici presenti a livello delle proteine renali ed è sicuramente la più associata al cisplatino (Dedon and Borch 1987). Si stima infatti che il 28-36% dei pazienti che ricevono una dose di cisplatino sviluppano insufficienza renale acuta, che dipende da dose, durata del trattamento e co-somministrazione di aminoglicosidi. Nonostante la disfunzione non sia completamente recuperabile, può non progredire purché si eviti un ulteriore insulto. Per cercare di ridurre la tossicità è consigliata una continua e abbondante idratazione, associata a diuretici come la furosemide per favorire una maggiore velocità nell'eliminazione della molecola (Barabas et al. 2008).
- **Ipomagnesiemia:** carenza di magnesio nel sangue è manifestata da oltre la metà dei pazienti in terapia con cisplatino, come conseguenza della

nefrotossicità in quanto si ha riduzione dell'assorbimento del magnesio attraverso i tubuli renali (Barabas et al. 2008).

- Emesi: è l'effetto collaterale più comune del cisplatino, è indotta in quanto vengono attivati i chemocettori presenti nella *trigger zone*. Vengono prescritti gli antiemetici (Ondansetron) prima, durante e dopo l'infusione di cisplatino per ridurre sia la nausea che il vomito (Barabas et al. 2008).
- Mielosoppressione: è caratterizzata da una carenza della funzione emopoietica del midollo osseo. La ridotta attività del sistema immunitario può essere la causa della sospensione della terapia o addirittura la causa di morte dovuta a infezione (Friberg and Karlsson 2003).
- Ototossicità: è stata osservata nel 7 - 90% dei pazienti trattati, è dose-dipendente, progressiva e spesso irreversibile anche se non risulta essere invalidante al punto tale di richiedere un apparecchio acustico. Si manifesta come acufene acuto e alterazione dei suoni (Barabas et al. 2008).
- Neurotossicità: è descritta come una neuropatia periferica e di solito si sviluppa in pazienti che ricevono una dose cumulativa di cisplatino. Negli studi che utilizzano quest'ultimo ad alte dosi, si sono verificate parestesie, a mani e/o piedi, da lievi a moderate (Barabas et al. 2008).
- SIADH: è l'acronimo di sindrome da inappropriata secrezione dell'ormone antidiuretico, ed è stata descritta in letteratura con la somministrazione di cisplatino e altri farmaci citotossici (Barabas et al. 2008).

1.2.4 Sviluppo di nuovi farmaci analoghi al cisplatino

Lo sviluppo di farmacoresistenza al cisplatino e i problemi di tossicità hanno portato alla ricerca di altri complessi metallici. La sfida è stata quella di trovare nuove alternative di farmaci a base di platino, che avessero minori effetti collaterali e un più ampio spettro terapeutico ma con equivalente attività farmacologica (McQuitty 2014).

Sulla base di studi inerenti le SAR (relazioni struttura-attività) dei farmaci analoghi al cisplatino, è emerso che per avere attività antitumorale il composto deve

contenere: due gruppi amminici in configurazione *cis*, e non *trans*, e due gruppi uscenti sempre con configurazione *cis* uno rispetto all'altro e facilmente removibili. Il composto deve essere neutro e i sostituenti alchilici sull'ammina devono essere in forma ridotta per avere una maggiore attività (Kelland et al. 1999).

Oltre al carboplatino e all'oxaliplatino che hanno ricevuto approvazione, altri tre la stanno ottenendo nei singoli mercati: nedaplatino in Giappone, lobaplatino in Cina ed eptaplatino in Corea (Makovec 2019). Rispetto al cisplatino, il carboplatino ad esempio presenta minori effetti collaterali e meno tossicità, dovuta alla presenza di un gruppo uscente più stabile del cloruro, l'1,1 ciclobutanodicarbossilato, che determina una più lenta reazione di idrolisi (Arnesano and Natile 2009).

Nonostante l'approvazione per utilizzo clinico in terapia, per carboplatino e oxaliplatino, non si sono riscontrati importanti miglioramenti in termini di tossicità rispetto al cisplatino (Zhang and Lippard 2003).

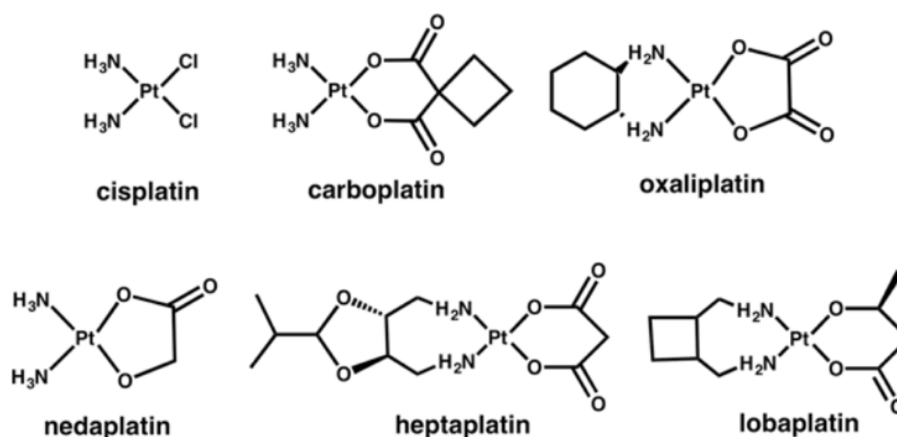


Figura 10: Nuovi farmaci a base di platino (Arnesano and Natile 2009).

1.3 COMPLESSI METALLICI NON PLATINO COME POTENZIALI AGENTI ANTITUMORALI

La ricerca, considerati gli effetti collaterali del cisplatino e la sua tossicità, ma tenendo conto dell'enorme successo riscontrato nella terapia di tumori solidi, si è rivolta verso lo studio e la progettazione di nuovi complessi *metal-based* non contenenti platino, che abbiano migliori proprietà farmacologiche ed una minore tendenza allo sviluppo di tossicità e resistenza. Attualmente gli studi sono mirati alla ricerca di *target* specifici che possano garantire un'elevata selettività nel trattamento clinico di cellule tumorali (Bruijninx and Sadler 2008).

Per quanto riguarda i complessi caratterizzati da differenti centri metallici, i complessi di rutenio hanno dimostrato di possedere un'interessante attività antitumorale, specialmente contro forme di cancro metastatiche. I complessi di oro, oltre all'utilizzo clinico nel trattamento dell'artrite reumatoide, si sono rivelati dei promettenti agenti antitumorali in particolare nei confronti di linee cellulari resistenti al cisplatino; ciò suggerisce la possibilità che tale metallo vada ad agire su un *target* differente rispetto al platino. Diversi studi, rivelano che l'attività citotossica dei complessi di oro sia mediata dalla capacità di questo metallo di alterare la funzione mitocondriale e di inibire la sintesi proteica (Zhang and Lippard 2003).

Numerosi complessi di rame hanno dimostrato una spiccata attività antitumorale nei confronti di diverse linee cellulari tumorali. In particolare, negli ultimi anni sono stati proposti come potenziali agenti antitumorali diversi complessi di Cu(I) e Cu(II), con classi di leganti come i tiosemicarbazoni (TSCs), gli imidazoli e le fosfine (Marzano et al. 2009).

Tra i diversi metalli valutati, quelli del gruppo 11 si sono rivelati essere tra i più interessanti (Santini et al. 2014). L'argento risulta essere il metallo la cui attività antiproliferativa è stata finora la meno approfondita, motivo per cui complessi contenenti tale nucleo metallico sono stati presi in considerazione per lo sviluppo della tesi in oggetto.

1.4 L' ARGENTO

1.4.1 Chimica dell'argento

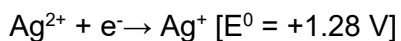
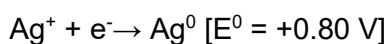
L'argento è un elemento naturale, che ha un peso atomico di 107,868 e numero atomico 47. Più comunemente lo si trova nei minerali come Argentite e Cerargirite, oppure in combinazione con altri metalli. Ha punto di fusione a 961.93°C e di ebollizione a 2212°C e peso specifico di 10.5. Possiede la maggiore conduttività elettrica e termica, ma la minore resistenza di contatto rispetto a tutti i metalli; risulta essere duttile e malleabile, per questo molto utilizzato nell'industria. La sua configurazione elettronica è $[Kr] 4d^{10}5s^1$ (Figura 11) (Marx and Barillo 2014).

47	Ag Argento 107,868 $[Kr] 4d^{10}5s^1$
----	---

Figura 11: argento nella tavola periodica.

Dal punto di vista chimico solo 2 isotopi (Ag^{107} e Ag^{109}), dei 59 conosciuti, risultano essere naturalmente presenti e stabili. L'argento presenta 4 stati di ossidazione: argento metallico (Ag^0), Ag^+ , Ag^{+2} , Ag^{+3} e di questi solo il secondo (Ag^+) è sufficientemente stabile per poter essere usato ad scopo terapeutico in quanto gli altri sono molto reattivi e hanno emivita breve (Marx and Barillo 2014).

Osservando i potenziali di riduzione:



Si vede come la coppia Ag^+/Ag^0 sia decisamente più riducente, impedendo quindi in soluzione l'esistenza della specie Ag^{2+} .

1.4.2 Chimica di coordinazione

In acqua, l'unica forma stabile dell'argento è la forma monovalente cationica Ag^+ , la quale si comporta da accettrice di elettroni formando complessi stabili con leganti sia organici che inorganici, dando origine a specie bi-, tri- e tetra-coordinate. Ag^+ tende a formare composti di coordinazione soprattutto con 2 leganti in quanto c'è una differenza di energia tra gli orbitali d occupati e l'orbitale s libero ($4d$, $5s$). Questa differenza permette la formazione di un orbitale ibrido tra d_{z^2} e s : la coppia di elettroni presente su d_{z^2} crea una regione circolare con una densità elettronica relativamente alta e regioni sopra e sotto a quest'ultimo con bassa densità di elettroni. I leganti sono attratti proprio dalla regione circolare appena descritta (Boucher 1989).

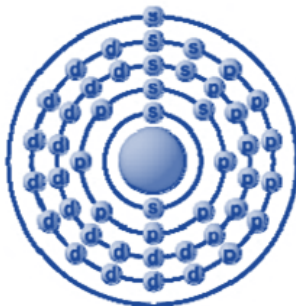


Figura 12: Configurazione elettronica dell'argento.

Con leganti monodentati possono formarsi le specie AgL^+ , AgL_2^+ , AgL_3^+ e AgL_4^+ , le corrispondenti costanti di formazione K_1 e K_2 sono elevate, mentre K_3 e K_4 sono relativamente basse. Principalmente le specie che si vengono a formare sono lineari e del tipo AgL_2^+ . Leganti con atomi donatori di elettroni, come N, P, As, S, Se portano alla formazione di diversi complessi stabili con l'Ag (Boucher 1989).

1.4.3 Biochimica dell'argento

L'argento pur non essendo un metallo presente naturalmente nell'organismo e pur non avendo un ruolo fisiologico o un valore nutrizionale, è comunque rilevabile a basse concentrazioni nell'uomo. Questo è dovuto principalmente ad esposizioni secondarie, in quanto viene rilasciato nell'aria e nell'acqua, quindi assorbito a seguito di ingestione, inalazione oppure contatto cutaneo dovuto all'uso di creme o dispositivi medici contenenti il metallo.

L'argento come metallo è insolubile in acqua, mentre è solubile nella sua forma cationica. L'argento metallico (Ag^0) e la maggior parte dei suoi composti inorganici possono ionizzare e rilasciare Ag^+ biologicamente attivo in presenza di acqua e un ossidante, condizione presente nei fluidi corporei e in altre secrezioni. La solubilità dei sali d'argento varia a seconda della natura dell'anione: il nitrato d'argento AgNO_3 ha una solubilità molto elevata in acqua, al contrario l'acetato d'argento (CH_3COOAg) ha solubilità molto bassa ($K_{ps} = 1,94 \times 10^{-3}$) mentre il cloruro d'argento AgCl ($K_{ps} = 1,8 \times 10^{-10}$), analogamente all'idrossido d'argento AgOH ($K_{ps} = 1,52 \times 10^{-8}$), è praticamente insolubile, inoltre quest'ultimo è instabile e tende a formare nel tempo ossido d'argento Ag_2O insolubile. Il fosfato d'argento (Ag_3PO_4) è meno solubile del cloruro ($K_{ps} = 2,7 \times 10^{-18}$) mentre il solfuro d'argento (Ag_2S) e il seleniuro (Ag_2Se) rispettivamente ($K_{ps} = 8,0 \times 10^{-51}$ e $K_{ps} = 1,0 \times 10^{-53}$ - $1,0 \times 10^{-59}$) sono tra i più insolubili, quindi meno reattivi e meno associati a effetti tossici (Medici et al. 2019).

La raccomandazione della US *Environmental Protection Agency* per i limiti di assunzione giornaliera di argento è di 0,005 mg/kg/die. I livelli consentiti di argento nell'acqua potabile sono 0,1 mg/L o 50 parti per miliardo. I livelli di argento negli individui normali includono una concentrazione ematica di <2,3 mg/L e un'escrezione urinaria di 2 mg/die. L'assunzione orale giornaliera di argento da fonti alimentari è stimata in 27-88 mg/die (Marx and Barillo 2014).

L'argento ingerito per via orale è per lo più assorbito attraverso l'intestino tenue ed il tratto gastrointestinale è la principale via di escrezione. L'argento sistemico, invece, viene per lo più escreto attraverso il fegato e i reni, anche la crescita di capelli e unghie fornisce una via di escrezione, seppur minore. L'accumulo del metallo si presenta maggiormente negli organi reticoloendoteliali, nel sistema gastrointestinale, nei polmoni, nella cute e nella mucosa nasale; può anche oltrepassare la barriera emato-encefalica e stazionare nei neuroni. La concentrazione ematica di argento si è rivelata piuttosto elevata nelle persone esposte al metallo per periodi prolungati dovuti a motivi di impiego. L'argento non è noto per avere un potenziale cancerogeno per l'uomo e non sembra essere un mutageno. (Medici et al. 2019)

Ad esempio, un'elevata ingestione di argento sotto forma di AgNO_3 , è molto rara ma sono stati riportati casi intenzionali oppure involontari ed è emerso che la tossicità che ne deriva è dose-dipendente. L'effetto tossico è principalmente dato dal potere corrosivo e caustico dell'argento a livello della mucosa orale, esofagea e gastrica, creando ulcere emorragiche; la situazione può aggravarsi con vomito, collasso dei polmoni e depressione respiratoria, fino al decesso della persona in casi rari. La dose letale (LD_{50}) riportata per AgNO_3 è pari a 28 mg/kg, mentre risulta più elevata per AgCl , grazie alla sua minore solubilità (Medici et al. 2019).

Gli ioni argento hanno una forte affinità per le proteine, specialmente per albumine, metallotioneine e macroglobuline, ma anche per il glutathione ridotto (GSH), quindi gli ioni Ag^+ liberi possono formare complessi stabili con queste specie non solo nel tratto gastrointestinale, ma anche nel sangue o all'interno delle cellule. Infine, possono incontrare solfuri e/o selenidi e precipitare come composti insolubili (Medici et al. 2019).

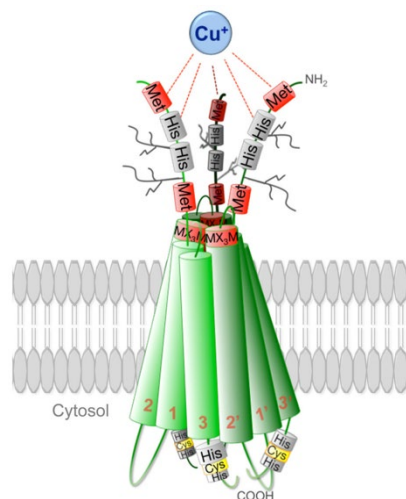


Figura 13: Struttura di hCTR1 (Dong et al. 2015).

Il sistema coinvolto nell'assorbimento dell'argento nel corpo e il suo accumulo nei tessuti è ancora poco definito. Ag^+ essendo isoelettrico viene considerato al pari del rame, infatti, gli studi suggeriscono che il suo metabolismo è dipendente dalle proteine coinvolte nel trasporto di Cu. In particolare, hCTR1 (*Human Copper Transporter Receptor 1*) è responsabile del trasporto del rame dall'ambiente extracellulare al citoplasma e diversi studi dimostrano che questo recettore è in grado di trasportare anche l'argento (Figura 13) (Bertinato et al. 2010).

Il trasportatore hCTR1 si trova nella membrana plasmatica ed è costituito da un'estremità N-terminale extracellulare, tre domini transmembrana (TMDs), un

loop intracellulare di lunghezza variabile, che unisce la prima e la seconda elica TM e un'estremità C-terminale verso il citosol (Gupta and Lutsenko 2009).

I tre domini transmembrana costituiscono un poro a forma di cono che passa attraverso il doppio strato fosfolipidico: la parte stretta funge da ingresso dall'esterno e la parte più larga verso il citoplasma (Dong et al. 2015).

La porzione N-terminale, che si presenta N- ed O-glicosilata, è ricca di metionina e presenta due sequenze dette *Met-motifs* che sono fondamentali per il *binding* con il metallo (Eisses and Kaplan 2002); inoltre, il dominio extracellulare attraverso i residui di metionina è in grado di legare cisplatino, carboplatino e nedaplatino, quindi questo sito di *binding* ha un ruolo significativo nel trasporto e nell'attivazione dei composti antitumorali a base di platino (Du et al. 2013).

Un'ipotesi largamente accettata sul meccanismo di trasporto dell'argento, considerato paragonabile a quello del rame, si basa sul fatto che lo ione venga catturato dal sito di legame posto sul dominio N-terminale prima di entrare nel dominio transmembrana, e successivamente venga trasferito attraverso il poro formato dai TMDs verso il dominio C-terminale, dove lo ione, prima legato tramite la sequenza His-Cys-His, è poi rilasciato e trasportato negli specifici compartimenti cellulari tramite proteine trasportatrici, dette *metallochaperones* (Dong et al. 2015). Diversi esperimenti hanno dimostrato come la presenza di un eccesso di argento inibisca l'*uptake* di rame attraverso hCTR1; quindi ciò suggerisce nuovamente come il trasportatore possa favorire l'accumulo di Ag nella cellula (Bertinato et al. 2010).

1.5 ARGENTO IN MEDICINA

L'argento metallico era già conosciuto a partire dal 4000 a.C. dai Caldei, ed è stato il terzo metallo ad essere utilizzato dagli antichi dopo oro e rame. Nei millenni successivi è sempre stato usato per diversi scopi medici in maniera empirica fino a quando si è scoperto il ruolo dei microbi nelle infezioni. L'argento colloidale è diventato il cardine della terapia antimicrobica nella prima parte del XX secolo fino all'introduzione degli antibiotici. Nel tempo, le indicazioni consolidate per l'uso efficace dell'argento consistono nella purificazione dell'acqua, la medicazione delle ferite per la promozione della guarigione, la prevenzione e il trattamento delle infezioni, l'igiene dentale, le condizioni oculari e altre complicanze dell'infezione.

Introduzione

Si hanno invece prove meno chiare di efficacia dell'uso dell'argento per l'epilessia, come invece si pensava nel 1800, per disturbi del sistema nervoso centrale, per una varietà di disturbi digestivi, come tonico in età avanzata o disabilità e per il trattamento di artriti, emorroidi, forfora e verruche (Alexander 2009).

La vera e propria svolta nell'utilizzo dell'argento in medicina avvenne con la sintesi da parte del Dr. Charles L. Fox Jr. nel 1968, della sulfadiazina di argento; Fox fece reagire la sulfadiazina, una solfonammide, con l'argento nitrato (AgNO_3) permettendo così la formazione del sale di sulfadiazina argentea insolubile in acqua e caratterizzato da un'importante azione antibiotica ad ampio spettro (Marx and Barillo 2014).

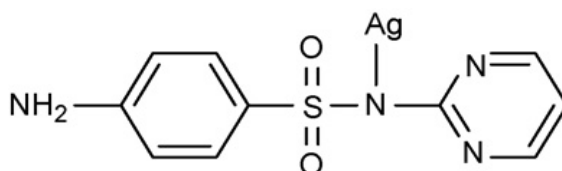


Figura 14: Sulfadiazina di argento.

Il complesso, risultando efficace nei confronti di batteri *Gram* positivi e *Gram* negativi, viene ampiamente utilizzato in creme antibiotiche per uso topico.

Ad oggi, le applicazioni in ambito medico dell'argento sono molteplici e vanno dalle creme per il trattamento di ustioni e guarigione di ferite, alle soluzioni oculari, a polimeri utilizzati come rivestimento di dispositivi medici tra cui cateteri e tubi endotracheali (Pettinari et al. 2011).

Varie ipotesi sono state fatte sul meccanismo d'azione (Figura 15): di notevole importanza ai fini dell'azione antibiotica sembra essere l'interazione dello ione Ag^+ con i gruppi sulfidrilici di enzimi e proteine; inoltre, esso sembra provocare alterazioni sia a livello della respirazione mitocondriale sia a livello degli acidi nucleici DNA e RNA (Lansdown 2002). Proprio a partire da queste considerazioni, i derivati di argento iniziarono ad essere studiati anche per la loro attività antiproliferativa, essendo nota l'importanza dei sistemi enzimatici tiolo-dipendenti e dello squilibrio redox mitocondriale nella progressione tumorale (Mijnendonckx et al. 2013).

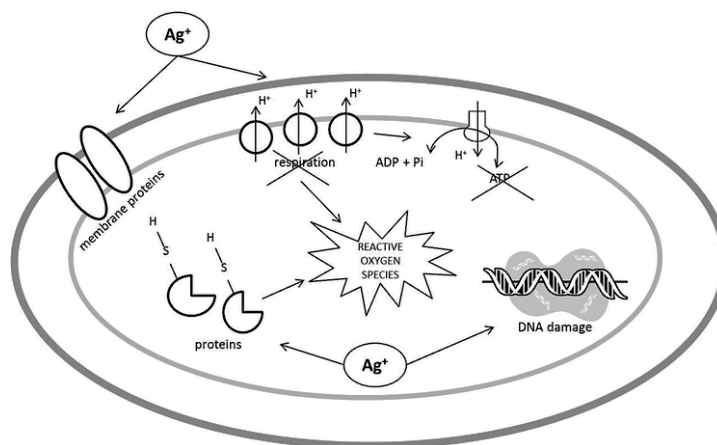


Figura 15: Effetti antimicrobici di Ag(I) (Mijnendonckx et al. 2013).

1.5.1 L'argento in ambito antitumorale

Negli ultimi anni sono stati numerosi gli studi sui complessi di argento con diversi tipi di leganti, in cui ne è stata valutata l'attività citotossica *in vitro* in differenti linee cellulari neoplastiche. In particolare, complessi in cui lo ione Ag⁺ è coordinato con leganti contenenti gruppi carbossilici, amminici, fosfinici e carbenici, hanno dimostrato di avere una notevole attività antiproliferativa. Nonostante gli studi condotti fino ad ora abbiano preso in considerazione complessi caratterizzati da leganti e geometrie di coordinazione differenti, è stato comunque possibile trarre alcune conclusioni riguardo le SARs (Banti and Hadjikakou 2013):

- il diverso bilancio idrofilo/lipofilo dei complessi influenza la loro attività
- la tipologia di leganti coordinati al metallo influenza la selettività d'azione nei confronti di diverse linee cellulari tumorali, oltre che tra linee cellulari malate e sane
- la geometria di coordinazione e il tipo di leganti influenzano l'*uptake* intracellulare dello ione metallico e la sua tossicità
- la presenza di leganti contenenti gruppi ossidrilici favorisce il *binding* al DNA

Rivelando un basso livello di tossicità nell'uomo, i complessi metallici a base di argento si sono dimostrati essere particolarmente vantaggiosi in prospettiva di futuri sviluppi di nuovi farmaci *metal-based* (Banti and Hadjikakou 2013). Inoltre, essi hanno dimostrato di avere un'attività maggiore rispetto al cisplatino in alcune linee cellulari e di esercitare azione citotossica nei confronti di cellule poco sensibili al classico chemioterapico. I risultati ottenuti hanno fatto presupporre che tali

derivati di argento esercitino la loro attività citotossica attraverso meccanismi d'azione differenti rispetto ai complessi di platino. Nonostante i numerosi studi condotti negli ultimi anni a riguardo, tali meccanismi non sono stati ancora del tutto compresi (Banti and Hadjikakou 2013, Gandin et al. 2013).

L'induzione di morte cellulare per apoptosi, consolidata per i complessi di argento, è un meccanismo comune attraverso cui molti composti ad attività citotossica, tra cui anche il cisplatino, riescono a sopprimere le cellule tumorali andando ad interagire con il loro DNA. A sostegno di ciò, diversi studi hanno confermato che svariati complessi di argento si intercalano tra le basi del DNA, causando una distorsione della doppia elica con conseguente danno all'acido nucleico e inibizione della divisione cellulare (Smoleński et al. 2013). In particolare, Ag(I) è in grado di coordinare due citosine a livello dell'azoto (N3) creando così una struttura del tipo C-Ag(I)-C molto stabile (Ono et al. 2008).

Studi più recenti volti alla ricerca di altri possibili *target*, oltre al DNA, verso i quali i complessi di Ag esplicano la loro attività antitumorale, hanno preso in considerazione la lipossigenasi (LOX), essendo un enzima sovraespresso in alcune forme neoplastiche e che svolge un ruolo chiave nell'insorgenza e progressione di alcuni tipi di tumore (Young 1999). Questi studi, che hanno valutato la diminuzione dell'attività enzimatica di LOX in presenza di particolari complessi di argento, hanno portato a risultati contrastanti (Banti et al. 2014).

La nota capacità di alcuni derivati di Ag di esercitare un effetto a livello del mitocondrio, ha supportato l'idea di una possibile interazione tra i complessi di argento e particolari enzimi redox coinvolti nella stabilità mitocondriale (Santini et al. 2011). L'ipotesi è stata in seguito confermata da alcune ricerche che hanno valutato la capacità dei complessi di argento di inibire selettivamente l'enzima tioredossina reduttasi (TrxR), dimostrando questo selenoenzima come *target* molecolare dello ione Ag^+ (Gandin et al. 2013).

In particolare, i complessi di argento, agendo come inibitori della TrxR, determinano un'alterazione dello stato redox cellulare con conseguente aumento dei livelli di ROS e successiva induzione di morte cellulare per apoptosi (Santini et al. 2011).

1.6 COMPLESSI DI ARGENTO CON ATTIVITÀ ANTITUMORALE

I complessi di argento con attività antitumorale possono essere suddivisi in base alla struttura chimica dei leganti e ai diversi gruppi funzionali a cui l'atomo di argento può essere legato, evidenziando diversi meccanismi di attività antitumorale.

1.6.1 Chimica delle fosfine

Le fosfine sono composti trivalenti del fosforo, con formula generale PR_3 , e presentano una coppia elettronica non condivisa. La fosfina più semplice, rappresentata in figura, presenta tre atomi di idrogeno come sostituenti (PH_3), mentre i derivati organofosforici sono ottenuti dalla sostituzione dei protoni con gruppi organici R (Snelders, van Koten and Klein Gebbink 2011).

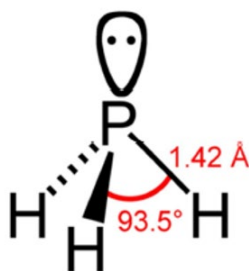


Figura 16: Rappresentazione della fosfina più semplice, PH_3 .

La geometria di legame è di tipo piramidale trigonale e, avendo carattere nucleofilo, formano sali di fosfonio $Pr_3^+X^-$, in maniera analoga alle corrispondenti ammine. A differenza delle ammine, la lunghezza e l'angolazione dei legami sono diversi, così come le proprietà acido base; infatti, le fosfine terziarie sono circa 100 volte meno basiche rispetto alle corrispondenti ammine terziarie; inoltre, le fosfine si ossidano più facilmente a fosfossidi (Snelders et al. 2011).

Una delle caratteristiche delle fosfine è quella di comportarsi come basi di Lewis, in grado quindi di donare doppietti elettronici liberi a ioni metallici con formazione di complessi organometallici. La capacità di coordinare ioni metallici è dovuta all'abilità di agire come σ -donatori, quindi di donare il doppietto elettronico disponibile sugli orbitali σ del fosforo al metallo, e di agire come π -accettori, quindi di ricevere elettroni dal metallo attraverso il legame π . Questo fenomeno è definito retrodonazione o " *π -back donation*" e consiste in un parziale trasferimento della

nuvola elettronica dal metallo, che funge da π -donatore, al legante, che funge da π -accettore; ciò consente la stabilizzazione del metallo anche nel suo stato di ossidazione più basso e di conseguenza un minor trasferimento di elettroni (Brown and Lee 1993).

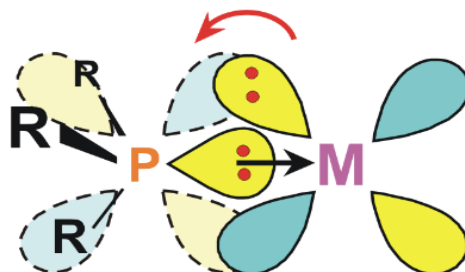


Figura 17: Rappresentazione del legame coordinativo delle fosfine, di tipo σ e retrodonazione π (Brown and Lee 1993).

Fondamentale risulta quindi la scelta del sostituito sul fosfato, in quanto oltre ad influenzare il carattere di accettore e donatore di elettroni, è determinante anche per quanto riguarda la solubilità, la formazione del complesso e l'ingombro sterico. Quest'ultimo contribuisce a stabilizzare il legame tra il fosforo e lo ione metallico, determinando l'equilibrio e la velocità delle reazioni di dissociazione (Brown and Lee 1993).

Un parametro importante da tenere in considerazione è l'angolo conico o "angolo di Tolman" (θ), ossia lo spazio occupato dal legante nella sfera di coordinazione del complesso. Esso viene definito come l'angolo apicale di un cono cilindrico, al vertice del quale si trova il metallo coordinato, con una distanza di 2,28 Å dal centro in cui si trova l'atomo di fosforo. I lati del cono toccano le superfici di van der Waals (ossia la superficie ottenuta dalla sovrapposizione degli atomi che costituiscono una molecola rappresentandoli come sfere il cui raggio corrisponde al raggio di van der Waals) degli atomi più esterni dei sostituenti organici, in tutte le orientazioni rotazionali possibili attorno al legante metallo-fosforo (Brown and Lee 1993).

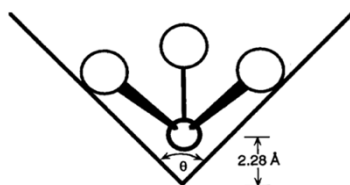


Figura 18: Geometria dell'angolo di Tolman (Brown and Lee 1993).

Le fosfine che hanno il minor angolo di Tolman risultano essere i leganti migliori in quanto ottimali per la formazione di complessi con metalli di transizione ad alto numero di coordinazione. Aumentando l'angolo di Tolman, quindi utilizzando fosfine molto ingombranti, viene invece favorita la formazione di complessi con metalli a più basso numero di ossidazione e la configurazione geometrica meno ingombrata (Britvin and Lotnyk 2015).

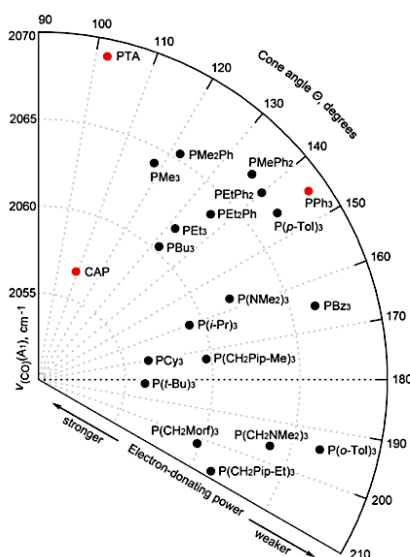


Figura 19: Angolo di Tolman di alcune fosfine (Britvin and Lotnyk 2015).

1.6.2 Complessi di Ag(I) con leganti fosfinici

Negli ultimi anni, diversi leganti fosfinici si stanno rivelando particolarmente interessanti nell'ambito della *Medicinal Inorganic Chemistry*, per le loro ottime capacità di complessazione. Tra le fosfine più studiate emerge la PTA (1,3,5-triaza-7-fosfaadamantano), una molecola idrofila che possiede proprietà chimico-fisiche che la rendono utile nella formazione di complessi metallici. In particolare, PTA presenta diversi vantaggi, quali una buona solubilità in acqua, un basso ingombro sterico e stabilità all'aria (Daigle et al. 2007). Questa fosfina risulta quindi essere particolarmente efficace nella sintesi di complessi metallici solubili in acqua nei quali esercita un'azione riducente permettendo di stabilizzare il metallo centrale al più basso stato ossidativo (Porchia et al. 2009).

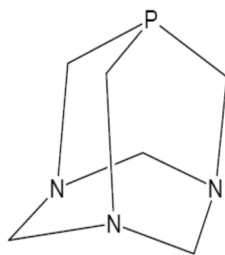


Figura 20: PTA (1,3,5-triaza-7-fosfaadamantano).

Vista la versatilità e l'efficienza della fosfina PTA in numerose catalisi in fase acquosa, sono stati effettuati diversi studi riguardanti la sintesi di derivati fosfinici analoghi alla PTA, a cui sono state apportate opportune modifiche.

A partire da una reazione di acilazione della PTA con anidride acetica è stata sintetizzata la DAPTA (3,7-diacetil-1,3,5-triaza-7-fosfaadamantano), legante fosfinico non ionico avente una spiccata solubilità in acqua e nei solventi organici più comuni.

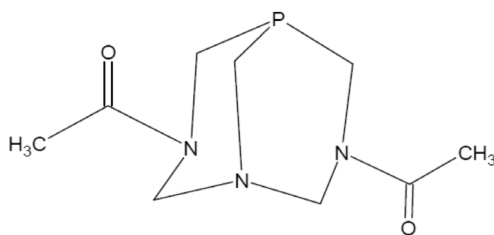


Figura 21: DAPTA (3,7-diacetil-1,3,5-triaza-7-fosfaadamantano).

La fosfina DAPTA oltre ad essere un ottimo legante per la sintesi di complessi metallici idrosolubili, dimostra inoltre delle capacità di coordinazione molto simili alla fosfina di origine PTA (Darensbourg, Ortiz and Yarbrough 2003).

Dalla sostituzione invece del ponte metilenico N-CH₂-N, che caratterizza la fosfina PTA, con il gruppo -SO₂ si ottiene un ulteriore analogo fosfinico denominato PASO₂ (2-tio-1,3,5-triaza-7-fosfaadamantano-2,2-diossido). Tale legante fosfinico e i complessi metallici da esso derivanti presentano una bassa solubilità sia in acqua che in molti solventi organici, ma risultano invece solubili in DMSO (dimetilsolfossido) e DMF (dimetiformammide).

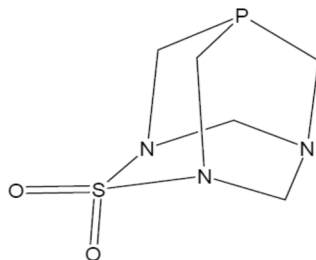


Figura 22: PASO₂ (2-tio-1,3,5-triaza-7-fosfaadamantano-2,2-diossido).

Sulla base di alcuni studi effettuati si è potuto dimostrare come PASO₂ presenti delle proprietà π -accettrici molto più marcate rispetto a PTA, nonostante ciò, tale legante, in termini di reattività chimica e capacità di coordinazione con i metalli di transizione, si comporta in maniera analoga alle altre fosfine (Sternberg, Suresh and Mohr 2010).

Il primo lavoro riguardante l'attività antitumorale di complessi fosfinici di Ag(I) risale al 1988 e negli anni successivi vennero svolte altre ricerche riguardanti tale classe di complessi (Berners-Price et al. 1988). È interessante sottolineare che la relazione struttura-attività dei complessi metallici con leganti difosfinici o fosfinopiridilici suggerisce che la loro selettività nei confronti delle cellule tumorali dipende dal tipo di metallo di transizione coordinato oltre che dall'equilibrio idro-lipofilo della molecola (Santini et al. 2011).

Uno studio riguardante l'attività antiproliferativa di complessi caratterizzati da metalli del gruppo 11, tra cui i complessi di Ag(I), coordinati a particolari difosfine e fosfine terziarie aromatiche, evidenzia che l'attività citotossica di questi derivati viene radicalmente ridotta o addirittura persa quando i sostituenti fenilici delle fosfine vengono sostituiti da un altro tipo di sostituenti (Santini et al. 2011).

Uno studio successivo in merito ai complessi [Au(dnpype)₂]₂NO₃, [Ag(dnpype)₂]₂Cl e [Cu(dnpype)₂]₂Cl, dove dnpype=1,2-bis-(di-n-piridilfosfina)etano n=2,3,4, rilevò che variando il carattere idro-lipofilo di questi composti veniva promossa la selettività verso cellule tumorali rispetto a quelle sane. Anche i complessi [Ag(Tmps)-(PPh₃)] e [Ag(Tmps)(PCy₃)], dove Tmps=tris(pirazolil)metansolfonati, PPh₃=trifenilfosfina e PCy₃=tricicloesilfosfina, hanno evidenziato un'importante attività citotossica nei confronti di cellule di melanoma maligno A375, riportando valori di IC₅₀ fino a cinque volte maggiori rispetto al controllo AgNO₃. Il meccanismo d'azione di questi composti è stato indagato attraverso ulteriori test, i quali hanno

evidenziato un'importante interazione di tali complessi di Ag(I) con il DNA (Pettinari et al. 2011).

Per altri derivati di argento coordinanti fosfine terziarie chirali si è presupposto, in seguito ad analisi dei dati raccolti, una possibile attività di tali complessi a livello del mitocondrio che spiegherebbe la loro capacità di superare la resistenza al cisplatino in alcune linee cellulari (McKeage et al. 1998).

Infine, uno studio preliminare riguardante l'attività citotossica di complessi omolettici di Au(I), Ag(I) e Cu(I) contenenti particolari alchilfosfine idrosolubili ha fornito dei risultati piuttosto interessanti: nonostante siano stati i complessi di Cu(I) a evidenziare una maggiore attività, anche complessi di Ag(I) hanno prodotto discreti valori di citotossicità (Santini et al. 2011).

1.6.3 Leganti N-N donatori

In aggiunta ai leganti fosfinici, per la produzione di complessi di Ag con attività antitumorale, diversi studi riportano evidenze di attività di complessi con leganti N-N donatori. Infatti, oggetto di studio particolarmente interessanti sono stati i complessi di Ag con derivati di fenantrolina e cumarina. La 1,10-fenantrolina (phen) e i suoi derivati di coordinazione con un metallo di transizione, hanno la capacità di alterare il funzionamento di un'ampia varietà di processi biologici coinvolti nell'omeostasi cellulare. Numerosi studi hanno dimostrato che i derivati a base di metalli di fenantrolina erano in grado di uccidere le cellule tumorali *in vitro*. Il complesso $[Ag(hnc)(phen)_2]$, formato da 1-10 fenantrolina (phen) e 4-idrossi-3-nitro-cumarina (hncH), mostrato nella Figura 23, è stato testato da Thati e collaboratori per le sue proprietà antiproliferative indagandone meccanismo d'azione, citotossicità e selettività. Al fine di evidenziare il potenziale vantaggio di questo composto, sono stati condotti studi comparativi utilizzando uno dei farmaci antitumorali più conosciuti e più utilizzati, il cisplatino. (Thati et al. 2009)

In questa struttura, Ag(I) è esacoordinato attraverso due atomi di ossigeno della 4-idrossi-3-nitro-cumarina ed i 4 atomi di azoto delle due molecole di fenantrolina: il complesso è stabile. Su tutte e quattro le linee cellulari utilizzate, A-498 (adenocarcinoma renale umano), HK-2 (adenocarcinoma prossimale tubulare umano), Chang (adenocarcinoma epatico umano) e HepG2 (carcinoma epatocellulare umano), il complesso ha mostrato un profilo antiproliferativo dipendente dalla concentrazione e dal tempo, in particolare le cellule HepG2 e

Chang si sono dimostrate le più sensibili (effetto 4 volte maggiore su HepG2 rispetto al cisplatino) (Thati et al. 2009).

Per ipotizzare un possibile meccanismo d'azione, sono stati effettuati studi morfologici su queste due linee cellulari, in cui il complesso sembra indurre la morte delle cellule tumorali con un meccanismo prevalentemente apoptotico; esso inoltre attiva la cascata delle caspasi (enzimi coinvolti nel processo apoptotico)(Thati et al. 2009).

Altro aspetto interessante è che questo complesso non è substrato della glicoproteina p170, la cui sovraespressione è spesso causa di resistenza al trattamento chemioterapico (Banti and Hadjidakou 2013).

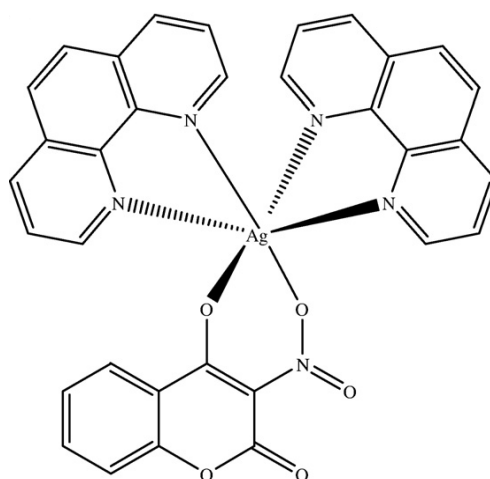


Figura 23: Complesso $[Ag(hnc)(phen)_2]$ (Thati et al. 2009).

In uno studio del 2006, è stato valutato il potenziale chemioterapico di $[Ag(phenidione)_2]ClO_4$ (phenidione=1,10-fenantrolina-5,6-dione), nei confronti di linee cellulari umane, neoplastiche: A-498, Hep-G2 e DLKP (cellule di carcinoma polmonare) e non neoplastiche: cellule CHANG e HK-2. Inoltre, per illustrare che l'effetto citotossico osservato era causato dal complesso piuttosto che dallo ione metallico libero, l'attività antitumorale è stata determinata anche nel caso del sale $AgClO_4$. Il complesso non ha mostrato un profilo citoselettivo, in quanto ha ridotto la vitalità delle cellule sia neoplastiche che non neoplastiche; tuttavia, studi sul meccanismo d'azione hanno rivelato un'inibizione della sintesi del DNA, senza intercalazione, in maniera dose-dipendente, ma tale capacità potrebbe causare tossicità anche nelle cellule sane. Gli studi di mutagenesi, mediante l'utilizzo del test di Ames, hanno però evidenziato che questo complesso non aumenta il rischio di incorrere in effetti genotossici (Banti and Hadjidakou 2013).

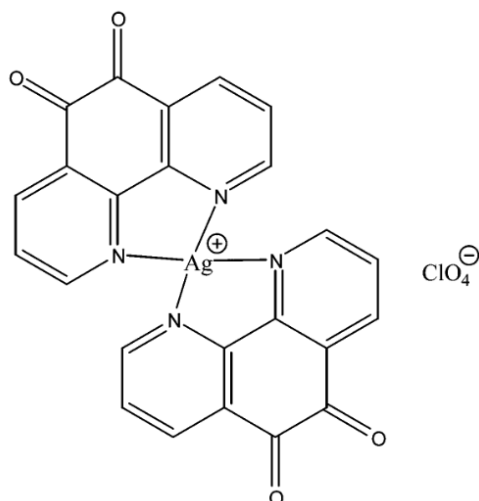


Figura 24: Complesso $[Ag(phendione)_2]ClO_4$ (Banti and Hadjikakou 2013).

1.6.4 Meccanismo dell'azione antitumorale

Al fine di scoprire nuove molecole con attività antitumorale in grado di superare i limiti delle terapie classiche, sono stati studiati e testati diversi complessi di Ag(I). Alcuni tra i molteplici meccanismi d'azione ipotizzati alla base dell'attività citotossica di questi complessi sono:

- Interazione con il DNA nucleare: diversi studi hanno evidenziato, mediante metodi spettrofotometrici, che i composti di argento sono in grado di intercalarsi o di legarsi a basi del DNA con una significativa affinità, determinando un danno al genoma con conseguente inibizione della divisione cellulare (Smoleński et al. 2013). In particolare, è stato riportato che lo ione argento è in grado di formare un legame covalente con due citosine, creando una struttura del tipo C-Ag(I)-C molto stabile (Ono et al. 2008)(Figura 25).

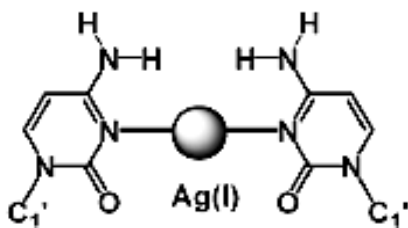


Figura 25: Meccanismo di inserimento di Ag(I) tra le basi del DNA (Ono et al. 2011).

- Interazione con gruppi tiolici di proteine e costituenti essenziali nel citoplasma: questa ipotesi è stata confermata da diverse ricerche che dimostrano come complessi di argento siano in grado di inibire la tioredossina reduttasi (TrxR), considerata il bersaglio principale; l'inibizione di questo enzima produce un'alterazione dello stato redox nell'ambiente cellulare determinando l'avvio del processo apoptotico (Gandin et al. 2013).
- Interazione con le lipossigenasi (LOX): questo enzima ed alcuni suoi metaboliti sono sovraespressi in alcune linee cellulari tumorali e svolgono un ruolo fondamentale nello sviluppo neoplastico. Negli ultimi anni, quindi si è indagato sulla possibilità che la LOX rappresenti un nuovo *target* molecolare dei composti di Ag(I) con leganti O-donatori, soprattutto derivati dall'acido benzoico. Inoltre, andando ad inibire questo sistema, è possibile ottenere anche un'azione antinfiammatoria (Banti and Hadjikakou 2013).
- Alterazione del funzionamento mitocondriale: molti complessi lipofili contenenti cationi inorganici, tra cui Ag^+ , agiscono mediante interazione con enzimi fondamentali all'interno del mitocondrio, alterando il bilancio redox e aumentando la permeabilità della membrana mitocondriale. Tutto questo porta all'attivazione del processo apoptotico e quindi alla morte delle cellule tumorali colpite (Santini et al. 2011).
- Innesco del *pathway* di segnale con attivazione delle caspasi che culmina con l'apoptosi della cellula (Banti and Hadjikakou 2013).

1.7 IL COMPLESSO TIOREDOSSINICO

Il sistema tioredossinico svolge un'importante funzione antiossidante agendo come sistema di regolazione intracellulare dei tioli e specie ossidate, comprende la tioredossina reduttasi (TrxR), la tioredossina perossidasi (TPx) e la tioredossina (Trx).

La TrxR è una flavoproteina, membro della famiglia delle piridin nucleotide disolfuro ossidoreduttasi, possiede una molecola di FAD (flavin adenin dinucleotide) come gruppo prostetico, un sito di legame per il NADPH (nicotinammide adenina dinucleotide fosfato) e un sito attivo (Cys-Val-Asn-Val-Gly-Cys) contenente una coppia ditiolo/disolfuro. A livello della porzione C-term è presente un'estensione Gly-Cys-SeCys-Gly dove con SeCys si intende un residuo

di selenocisteina, responsabile dell'attività enzimatica della tioredossina umana (Lee et al. 2013).

Il mantenimento dell'equilibrio redox nelle cellule è un aspetto fondamentale per la loro sopravvivenza e per lo svolgimento delle normali funzioni biologiche. Durante la respirazione mitocondriale, nella cellula vengono prodotte elevate concentrazioni di specie reattive dell'ossigeno (ROS) tra cui l'anione superossido (O_2^-), l'idrossile radicalico ($OH\bullet$) e il perossido di idrogeno (H_2O_2); se presenti in elevate concentrazioni, possono causare stress ossidativo con conseguente morte della cellula per attivazione dei segnali apoptotici.

L'apoptosi è una tipologia di morte cellulare programmata ed è necessaria sia per mantenere un numero costante di cellule all'interno dell'organismo, sia per liberare l'organismo stesso da quelle danneggiate (Tonissen and Di Trapani 2009).

Per difendersi dallo stress ossidativo, derivante dal metabolismo, le cellule vanno a modulare i livelli di ROS attraverso specifiche molecole antiossidanti e sistemi enzimatici riducenti (Arner and Holmgren 2006); i principali sistemi deputati a questo scopo sono quelli del glutatione e della tioredossina (Arner and Holmgren 2000).

La TrxR ha quindi un ruolo fondamentale nella difesa contro lo stress ossidativo e nel mantenimento dell'equilibrio redox nella cellula, fungendo indirettamente da donatore di elettroni per la Trx e direttamente agendo come *scavenger* radicalico. Riducendo inoltre gli enzimi ossidati, quali le perossidasi, la TrxR ristabilisce la forma attiva dell'enzima. L'inibizione della TrxR determina un incremento dei ROS, uno sbilanciamento delle condizioni redox e conduce la cellula verso l'apoptosi (Gandin et al. 2013).

Il meccanismo d'azione del sistema tioredossinico mostrato nella Figura 26 prevede:

il trasferimento di elettroni dalla Trx al substrato ossidato: la porzione cisteinica (sito attivo) N-terminale della Trx, svolge un attacco nucleofilo al ponte disolfuro del substrato, portando alla formazione di un legame disolfuro "misto" tra Trx e substrato,

un secondo attacco nucleofilo della cisteina, presente nella porzione C-terminale della Trx, al ponte disolfuro precedentemente formato, con conseguente formazione di un ponte disolfuro (S-S) nella Trx ossidata e riduzione a gruppo tiolico della proteina che era substrato dell'enzima.

La Trx deve essere ridotta dalla TrxR, la quale utilizza NADPH come donatore di elettroni prodotto dalla via dei pentoso fosfati nella cellula (Lee et al. 2013).

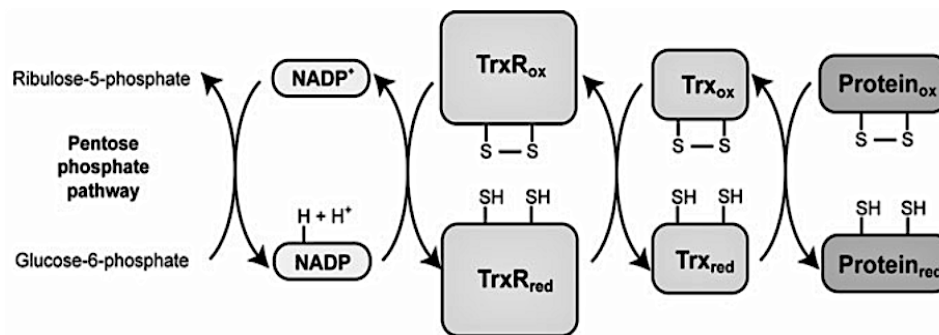


Figura 26: Cascata redox del sistema tioredossinico (Lee et al. 2013).

È stato recentemente scoperto il ruolo fondamentale che svolge la Trx nella regolazione dello stress ossidativo indotto dalle RNS (*Reactive Nitrogen Species*), che possono generare specie nitrosanti che interferiscono con alcuni *pathway* di segnale. È emerso che il monossido di azoto (NO) è coinvolto nella modifica post-traslazionale delle cisteine attraverso la formazione di un legame covalente tra NO ed il loro gruppo tiolico, con una reazione detta di S-nitrosilazione; quest'ultima, così come la reazione di fosforilazione, contribuisce alla regolazione di molte funzioni molecolari quali l'attività enzimatica, la traslocazione, le interazioni tra proteine e la loro degradazione. Una disregolazione della S-nitrosilazione può essere associata a diverse patologie, come cancro, disordini cardiovascolari e neurodegenerativi. Gli enzimi che catalizzano la denitrosilazione delle proteine sono una parte fondamentale della via di segnale regolata dalla S-nitrosilazione e tra questi enzimi è presente anche il sistema della Trx/TrxR, con un meccanismo analogo a quello descritto in precedenza (Lee et al. 2013).

Il meccanismo d'azione della TrxR necessita di entrambe le subunità (Figura 27), prevede che gli elettroni vengano ceduti dal NADPH, tramite FAD, al disolfuro del sito attivo e successivamente al selenosolfuro dell'estensione C-terminale. Il residuo di SeCys è essenziale per l'attività catalitica della TrxR, infatti sia la sua rimozione per digestione con carbossipeptidasi, sia la sua alchilazione portano all'inattivazione dell'enzima stesso (Lee et al. 2013).

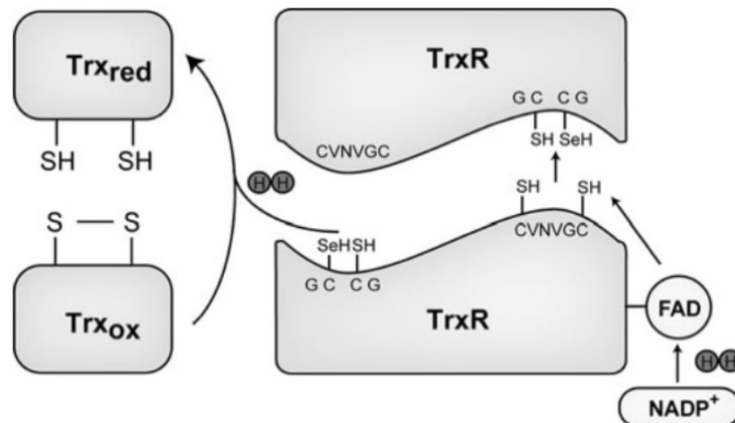


Figura 27: Reazione catalitica della TrxR (Lee, Kim and Lee 2013).

I residui cisteinici contenuti sia nella Trx che nella TrxR sono fondamentali per l'attività del sistema tioredossinico, che è principalmente influenzata dallo stato di ionizzazione dei gruppi -SH all'interno della cellula. Piccole variazioni del potenziale redox intracellulare infatti, modificando lo stato di ionizzazione dei residui solfocisteinici dell'enzima (-CH₂-SH→CH₂-S-), portano all'attivazione della cascata di eventi della TrxR (Gius et al. 1999) tra cui la traslocazione nel nucleo della Trx attivata, la quale permette la trascrizione genica di fattori implicati nella protezione cellulare e svolge in questo modo un'importante azione antiossidante (Nguyen et al. 2006).

1.7.1 Trx e TrxR nello sviluppo del tumore

Nelle cellule tumorali, che vivono in un ambiente di stress ossidativo a causa della loro crescita incontrollata e di un metabolismo accelerato, numerosi studi hanno dimostrato che l'aumento dei livelli della TrxR e della Trx è associato ad un fenomeno di protezione: nello specifico l'elevata attività della Trx stimola la proliferazione cellulare tramite attivazione di fattori di trascrizione come NF-κB, AP-1 e SP-1 (Powis and Kirkpatrick 2007).

Questa via di segnale viene attivata nel citoplasma, dove la tioredossina riduttasi, a causa dell'elevata presenza di radicali liberi, attiva la tioredossina, che a sua volta trasloca nel nucleo e stimola sintesi di componenti cellulari implicati nella difesa contro lo stress ossidativo (Nguyen et al. 2006).

Il sistema enzimatico della tioredossina risulta essere sovraespresso in numerosi tipi di cellule tumorali, in confronto ai livelli osservati nelle cellule sane corrispondenti degli stessi pazienti (Berggren et al. 1996) (Lincoln et al. 2003). Si è osservato che il sistema tioredossinico può assumere un ruolo differente a seconda dello stadio di sviluppo del tumore: inizialmente la TrxR ha un ruolo importante nella prevenzione dello sviluppo di forme tumorali grazie alla sua capacità di contrastare lo stress ossidativo provocato da agenti cancerogeni, invece quando la cellula da sana diventa neoplastica, la TrxR favorisce la crescita e la progressione del tumore stesso; ciò è dovuto alla sua attività antiapoptotica e di promozione della crescita cellulare. Negli ultimi stadi di sviluppo del tumore, invece, tale enzima è fortemente coinvolto nella promozione di metastasi e dell'angiogenesi (Tonissen and Di Trapani 2009).

L'attività del sistema tioredossinico è particolarmente importante nell'angiogenesi, ossia il processo che porta alla formazione di nuovi vasi sanguigni all'interno della massa tumorale, consentendo così il trasporto di ossigeno e nutrienti alle cellule per sostenere la loro vitalità. L'aumentata angiogenesi è spesso correlata ad una maggiore aggressività della neoplasia, in quanto pone le basi per un incremento della crescita cellulare ed eventuale sviluppo metastatico. Recenti studi hanno dimostrato un aumento nell'espressione del sistema tioredossinico in diversi tumori primari, tra cui fegato, prostata, mammella, cervice uterina e colon-retto; è stato visto infatti un aumento significativo del VEGF, il fattore principale che stimola l'angiogenesi (Welsh et al. 2002).

Tenendo conto delle considerazioni appena esposte, si presuppone che elevati livelli del sistema tioredossinico siano quindi associati a neoplasie aggressive e resistenti alle terapie standard. È stato dimostrato infatti che l'attività della TrxR è incrementata nelle cellule tumorali resistenti al cisplatino rispetto a quelle sensibili (Marzano et al. 2007). Ecco perché la Trx e la TrxR sono *target* ottimali per nuovi farmaci antitumorali (Powis and Kirkpatrick 2007), in quanto modulare l'attività di enzimi coinvolti nel ciclo redox, con l'obiettivo di incrementare i ROS, è considerato un metodo selettivo per favorire l'apoptosi nelle cellule tumorali senza causare una significativa tossicità nelle cellule sane (Gandin and Fernandes 2015).

1.7.2 Gli inibitori della Trx e TrxR

Nell'ultimo decennio, la progettazione di terapie antitumorali si è concentrata sullo studio di farmaci che mirano al sistema della Trx, in aggiunta alle terapie esistenti. L'inibizione della TrxR si traduce in un aumento dei livelli della Trx ossidata e una riduzione della Trx ridotta. Trx non è quindi in grado di attivare i substrati, il che si traduce nell'inibizione delle sue funzioni cellulari, in aggiunta alla riduzione della sintesi del DNA, della riparazione delle proteine, dell'attività dei fattori di trascrizione e dell'attività delle perossidasi. Successivamente si verifica un accumulo di H₂O₂ e radicali liberi nella cellula, portando a condizioni di stress ossidativo che promuovono l'apoptosi.

Le diverse conseguenze dovute all'inibizione della TrxR sono:

- stimolazione dell'apoptosi, tramite l'attivazione di ASK1, l'inibizione della nitrosilazione della procaspasi 3 e l'inibizione di NF- κ B.
- alcuni inibitori della TrxR, modificandola fanno sì che acquisisca una funzione ossidasi, che provoca l'accumulo di ROS (Figura 28) (Tonissen and Di Trapani 2009).

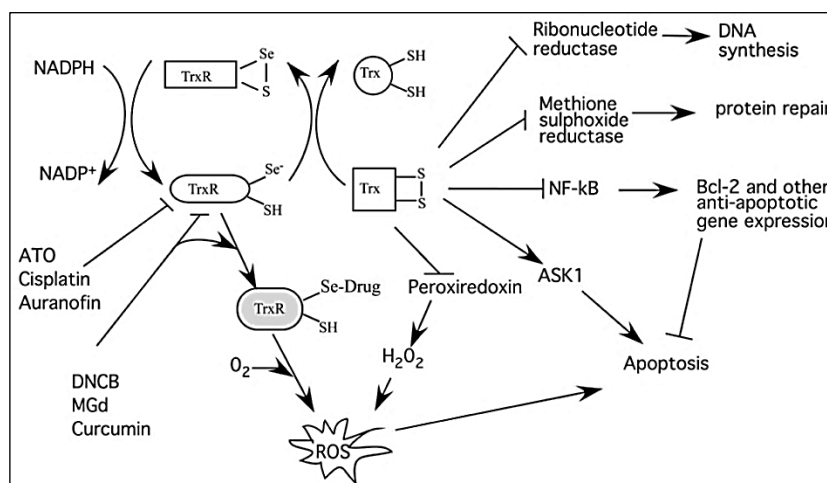


Figura 28: Conseguenze dell'inibizione della TrxR (Tonissen and Di Trapani 2009).

Una caratteristica comune degli inibitori della TrxR è il loro carattere elettrofilo, in quanto la SeCys dell'enzima a pH fisiologico risulta essere deprotonata.

Gli inibitori della TrxR presentano diversi meccanismi d'azione, tra cui:

- legame con il sito di *binding* per il NADPH sull'enzima oppure interazione con la SeCys del sito attivo;

- interazione con l'interfaccia tra le sue due subunità (Gandin and Fernandes 2015).

Il PX-12 (1-metilpropil 2-imidazolil disolfuro) è l'unico inibitore della tioredossina in fase clinica di sperimentazione. Quest'ultimo causa una rapida alchilazione irreversibile delle cisteine nel sito catalitico (Cys³² e Cys³⁵) e della Cys⁷³ che si trova esternamente al sito attivo, prevenendo anche la riduzione dell'enzima da parte della TrxR. Inoltre, PX-12 interviene nel legame tra la tioredossina e ASK1, alterandolo e indirizzando la cellula verso l'apoptosi. Gli studi dimostrano inoltre che PX-12 potenzia l'azione del cisplatino come inibitore della crescita cellulare, suggerendo quindi che questo inibitore potrebbe essere associato ad altri chemioterapici nell'ottica di una terapia combinata (Powis and Kirkpatrick 2007).

Diversi composti di oro sono stati studiati per la loro attività inibitoria nei confronti della TrxR dato che l'oro presenta una specifica reattività verso la selenocisteina. Particolarmente importante è l'Auranofin farmaco sviluppato come terapia orale per l'artrite reumatoide, ma che è stato dimostrato essere un potente agente antitumorale. Auranofin mostra una potente attività antitumorale in vari modelli tumorali *in vitro* e *in vivo*, inoltre ha un'attività inibitoria dose-dipendente contro la sintesi di DNA, RNA e proteine a concentrazioni citotossiche (Onodera et al. 2019). L'inibizione della TrxR comporta un mancato ripristino di diversi substrati nella loro forma ridotta, con un'inevitabile riduzione delle difese antiossidanti nella cellula, si configura dunque un aumento delle specie reattive dell'ossigeno particolarmente importante a livello mitocondriale, con successiva alterazione della permeabilità di membrana e rilascio di fattori pro-apoptotici quali il citocromo c (Tonissen and Di Trapani 2009, Rigobello et al. 2002).

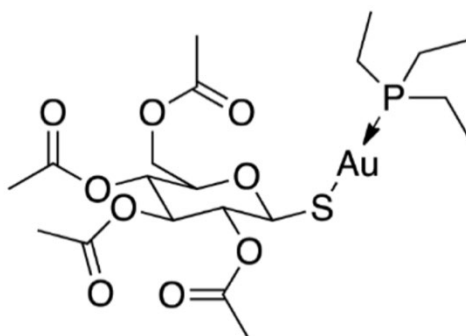


Figura 29: Struttura chimica Auranofin (Onodera, Momose and Kawada 2019).

Anche i composti contenenti arsenico, come ad esempio il triossido di arsenico (As_2O_3), hanno la capacità di legare proteine con residui cisteinici facilmente accessibili. Infatti, studi *in vitro* suggeriscono come a concentrazioni micromolari As_2O_3 sia in grado di inibire irreversibilmente la TrxR umana. Questo è stato dimostrato mediante l'utilizzo di cellule di tumore alla mammella MCF-7, osservate 48 ore dopo il trattamento: i risultati evidenziano l'inibizione della TrxR e una severa ossidazione della tioredossina (Rigobello et al. 2002).

Altre molecole hanno dimostrato di possedere questa attività inibitoria nei confronti della TrxR, tra cui molecole contenenti gadolinio come il *Motexafin Gadolinium* (MGd) e composti nitroaromatici come il DNCB (1-cloro-2,4-dinitrobenzene) (Rigobello et al. 2002, Hashemy et al. 2006).

Diversi studi negli ultimi anni hanno dimostrato che la curcumina, fitocomposto con struttura polifenolica estratto dalla pianta *Curcuma longa*, è un potente inibitore della genesi del tumore *in vivo* e possiede attività antiproliferativa contro le cellule tumorali *in vitro*. In uno studio del 2005 è stato scoperto che la TrxR può essere inibita irreversibilmente dalla curcumina formando addotti covalenti e che l'inibizione è NADPH-dipendente. Il meccanismo proposto si basa sull'alchilazione di residui Cys⁴⁹⁶ e Sec⁴⁹⁷ nel sito catalitico; a seguito della modifica, l'enzima viene inattivato, ma si ha un'attività notevolmente aumentata della NADPH ossidasi che produce ROS i quali conferiscono alla curcumina attività chemiopreventiva (Fang et al. 2005).

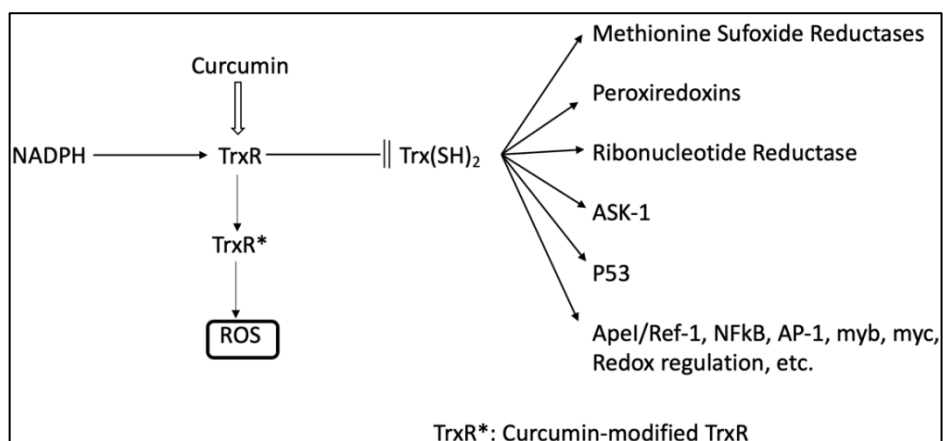


Figura 30: Effetti a cascata dopo la modifica di TrxR da parte della curcumina (Fang, Lu and Holmgren 2005).

La nota capacità di alcuni derivati di Ag di esercitare un effetto a livello del mitocondrio, ha supportato l'idea di una possibile interazione tra i complessi di argento e particolari enzimi redox coinvolti nella stabilità mitocondriale (Santini et al. 2011). L'ipotesi è stata confermata da alcune ricerche dimostranti la capacità dei complessi di argento di inibire selettivamente l'enzima TrxR, confermando questo selenoenzima come *target* molecolare dello ione Ag^+ (Gandin et al. 2013). Agendo come inibitori della TrxR, i complessi di argento determinerebbero un'alterazione dello stato redox cellulare con conseguente aumento dei livelli di ROS e successiva induzione di morte cellulare per apoptosi (Santini et al. 2011).

2 OBIETTIVO DELLA TESI

Questo lavoro di tesi sperimentale si inserisce nell'ampio contesto della ricerca di nuovi composti *metal-based* come potenziali farmaci antitumorali in alternativa al cisplatino. Lo sviluppo di nuovi complessi metallici nasce dalla necessità di trovare un'alternativa ai farmaci a base di platino esistenti in quanto, nonostante il loro ampio utilizzo in terapia per diverse tipologie di tumori, presentano numerosi limiti tra cui importanti effetti collaterali e la comparsa di resistenza, intrinseca o acquisita, che rendono sempre più frequente il fallimento della terapia.

In particolare, in questo progetto è stata valutata la potenziale attività antitumorale e il meccanismo d'azione di complessi caratterizzati dalla presenza dell'argento come centro metallico, di un gruppo pirazolilacetato come legante e di fosfine come co-leganti (PTA e PPh₃). La scelta di sintetizzare questi complessi a base di argento deriva dal fatto che questo metallo presenta un'importante attività antibatterica ed antimicrobica, legata alla capacità di ionizzare nei fluidi biologici liberando lo ione Ag⁺, specie fortemente elettrofila (Marx and Barillo 2014). A partire da queste evidenze, negli ultimi anni è stato incentivato l'impiego di questo metallo anche in ambito antitumorale. Infatti, complessi di argento con leganti carbenici, N-eterociclici, fosfinici o carbossilati, hanno dimostrato una marcata attività inibitoria nei confronti della tioredossina reduttasi (TrxR), enzima fondamentale per il mantenimento del bilancio ossidoriduttivo cellulare. Tale enzima risulta sovraespresso in molti tumori particolarmente aggressivi e refrattari alla terapia (Gandin et al. 2013); questo perché le cellule tumorali presentano un microambiente ricco di specie reattive dell'ossigeno (ROS) in quanto proliferano in maniera incontrollata con un metabolismo accelerato e per sostenere l'equilibrio redox, le cellule neoplastiche sovraesprimono enzimi con attività antiossidante, come il complesso tioredossinico. L'inibizione della TrxR comporta un mancato ripristino allo stato ridotto di molte proteine e biomolecole così da impedirne la loro attività fisiologica, e ciò che ne consegue è un aumento di ROS all'interno della cellula che provoca l'innescò della cascata di segnali che culmina con l'apoptosi. Una delle strategie per indurre apoptosi in maniera selettiva nei confronti delle cellule tumorali è quella di sviluppare molecole che possano inibire la TrxR senza alterare drasticamente il metabolismo delle cellule sane. Ciò è possibile in quanto le cellule sane, seppur anch'esse soggette ad un aumento dei livelli di specie radicaliche, possiedono un livello basale di ROS inferiore rispetto alle cellule

tumorali, caratteristica che permette di non raggiungere uno stress ossidativo dannoso.

Dal punto di vista sperimentale, sulla base delle considerazioni fatte, in questo progetto di tesi, in collaborazione con l'Università di Camerino, sono stati studiati e testati dei complessi di Ag (I) **12**, **13**, e **14** e i relativi leganti come potenziali agenti antitumorali. I complessi differiscono tra loro per i diversi leganti pirazolilacetati e co-leganti fosfinici presenti, in particolare se i complessi **12** $[\text{Ag}(\text{PPh}_3)(\text{L}^{\text{OMe}})]\text{NO}_3$ e **14** $[\text{Ag}(\text{PPh}_3)(\text{L}^{2\text{OMe}})]\text{NO}_3$ presentano lo stesso co-legante fosfinico, differiscono per il legante; invece il complesso **13** $[\text{Ag}(\text{PTA})(\text{L}^{2\text{OMe}})]\text{NO}_3$ presenta un co-legante fosfinico diverso, ma presenta lo stesso legante del complesso 14.

L'attività citotossica dei complessi di argento è stata valutata nei confronti di numerose linee cellulari tumorali, sia sensibili che resistenti al cisplatino, in modelli bidimensionali. Successivamente sono stati condotti studi approfonditi volti a chiarirne il meccanismo d'azione: è stato valutato il grado di internalizzazione cellulare tramite quantificazione dell'*uptake* in cellule U1285 di carcinoma polmonare a piccole cellule, ed è stata poi eseguita un'analisi dettagliata del profilo inibitorio dei composti in esame nei confronti della TrxR *in vitro*, sia in un sistema *cell-free*, che in lisato cellulare. È stato inoltre indagato l'effetto antimitocondriale indotto dai complessi, valutato per via fluorimetrica, monitorando il potenziale di membrana mitocondriale e la produzione intracellulare di ROS in cellule tumorali trattate con i complessi di argento. Successivamente, per quantificare a pieno lo stress ossidativo indotto dall'aumento della produzione basale di ROS, è stato eseguito il saggio di Ellman per la determinazione dei gruppi tiolici, al fine di monitorare lo stato redox intracellulare. Infine, sono state condotte analisi al microscopio confocale in cellule colorate con Hoechst 33258 per valutare il fenomeno apoptotico conseguente al trattamento con i complessi di Ag oggetto di studio.

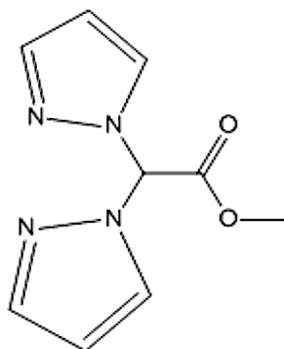
3 MATERIALI, STRUMENTAZIONI E METODI

3.1 COMPOSTI TESTATI

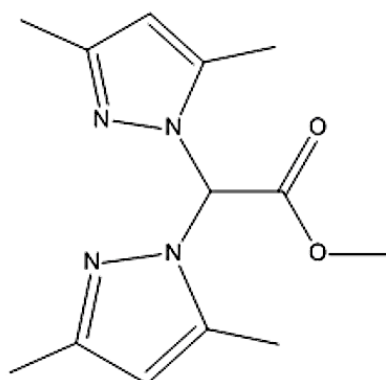
3.1.1 Composti di Ag(I) con leganti fosfinici

I complessi di Ag (I) con leganti fosfinici, oggetto di studio in questo lavoro di tesi sono 3 e sono stati sintetizzati dal gruppo di ricerca dei professori Carlo Santini e Maura Pellei dell'Università di Camerino.

Le strutture chimiche dei leganti (**1** e **2**) dei complessi (**12**, **13** e **14**) sono riportate nelle figure 31 e 32. Tutti i complessi sono stati solubilizzati in DMSO appena prima del loro utilizzo. Si è poi prelevata la quantità di soluzione prevista e si è aggiunta al terreno di coltura, così da ottenere la concentrazione di composto voluta.

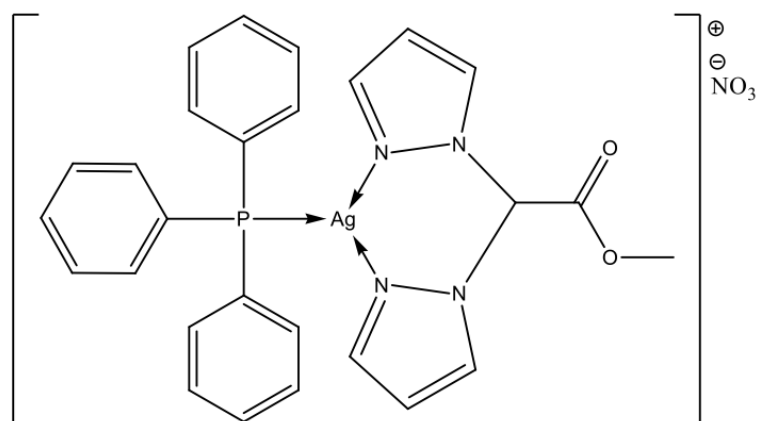


1: L^{OMe}

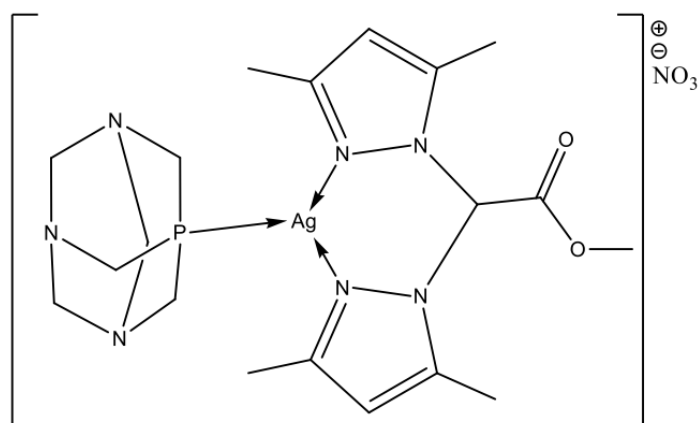


2: L^{2OMe}

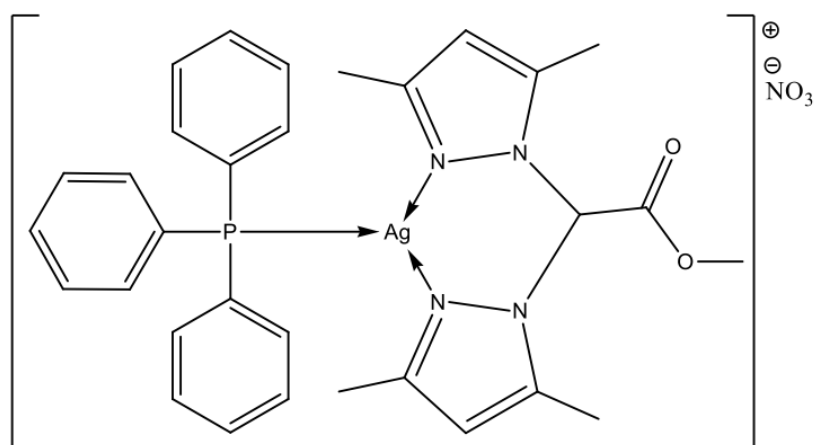
Figura 31: Strutture chimiche dei leganti *N,N*-donatori **1** (L^{OMe}) e **2** (L^{2OMe}).



12: $[\text{Ag}(\text{PPh}_3)(\text{L}^{\text{OMe}})]\text{NO}_3$



13: $[\text{Ag}(\text{PTA})(\text{L}^{2\text{OMe}})]\text{NO}_3$



14: $[\text{Ag}(\text{PPh}_3)(\text{L}^{2\text{OMe}})]\text{NO}_3$

Figura 32: Struttura chimica dei complessi di Ag(I) con co-leganti fosfinici, 12 e 14 con la fosfina lipofilica (PPh₃) e 14 con la fosfina idrofilica (PTA).

REAGENTI

Il farmaco di riferimento utilizzato nei saggi di citotossicità è il cisplatino (*Sigma Chemical* St. Louis, MO.USA). Il colorante MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio bromuro), l'SDS (sodio dodecilsolfato), l'antibiotico, (soluzione di penicillina 50 U/mL, streptomina 50 µg/mL), il DTNB (acido 2,2'-dinitro-5,5'-ditiodibenzoico) e l'NADPH provengono dalla ditta Merck KGaA (Darmstadt, Germania).

I terreni di coltura *Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium* (RPMI-1640), *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM), il siero fetale bovino, la tripsina 2,5% e la glutammina sono forniti dalla ditta Euroclone (Milano, Italia).

Il PBS (*Phosphate-Buffered Saline*) viene preparato in laboratorio utilizzando NaCl, KCl, Na₂HPO₄ e KH₂PO₄ alle rispettive concentrazioni di 137 mmol/L, 2,7 mmol/L, 10 mmol/L e 2,8 mmol/L solubilizzati in acqua, ottenendo una soluzione a pH 7,4.

3.2 LINEE CELLULARI E CONDIZIONI DI CRESCITA

Le colture cellulari sono preparate in *flasks* da 25 cm² e 75 cm² e mantenute in fase logaritmica a 37°C in stufa termostatica a flusso continuo con aria arricchita con il 5% di anidride carbonica (CO₂) ed in ambiente fortemente umidificato. I terreni di coltura utilizzati contengono: il 10% di siero fetale bovino, antibiotici (penicillina: 50 unità·mL⁻¹, streptomina: 50 µg·mL⁻¹) e glutammina 2 mM. Per l'allestimento delle subcolture e la conta delle popolazioni cellulari, i monostrati vengono staccati a 37°C con PBS+EDTA e tripsina 0,25%, neutralizzata successivamente con terreno addizionato di antibiotici e siero al 10%.

3.2.1 Cellule PSN-1

La linea cellulare PSN-1, fornita dal *National Institute for Cancer Research*, Genova, rappresenta una linea cellulare di adenocarcinoma umano pancreatico con mutazioni a livello del gene k-Ras e TP53.

Queste cellule vengono mantenute in terreno di coltura con terreno RPMI-1640 addizionato di antibiotici, glutammina e 10% di siero fetale bovino.

3.2.2 Cellule HCT-15

La linea cellulare HCT-15, fornita dall'Istituto Oncologico Veneto (IOV), rappresenta una linea cellulare di adenocarcinoma colon rettale umano avente un tempo di duplicazione di circa 21 ore. Queste cellule crescono in adesione al substrato e vengono mantenute in coltura con terreno RPMI-1640 addizionato di antibiotici, glutammina e 10% di siero fetale bovino.

3.2.3 Cellule 2008

La linea cellulare 2008, fornita dal Prof. G. Marverti del Dipartimento di Scienze Biomediche dell'Università di Modena rappresenta una linea cellulare proveniente da una paziente con adenocarcinoma ovarico non trattato. Il loro tempo di duplicazione è di circa 24 ore e crescono adese al substrato. Il terreno di coltura in cui crescono è RPMI-1640 addizionato di antibiotici, glutammina e 10% di siero fetale bovino.

3.2.4 Cellule A431

Si tratta di una linea cellulare umana di carcinoma squamoso della cervice uterina proveniente da un paziente non trattato fornita dal Prof. G. Zunino dell'Istituto Nazionale dei Tumori di Milano. Queste cellule aventi un tempo di duplicazione di 24 ore crescono in adesione al substrato e vengono mantenute in coltura con terreno RPMI-1640 addizionato di antibiotici, glutammina e 10% di siero fetale bovino.

3.2.5 Cellule U1285

La linea cellulare U-1285, acquistata dall'American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD), rappresenta una linea umana di carcinoma polmonare a piccole cellule. Le cellule crescono in adesione al substrato e hanno un tempo di duplicazione di 56 ore. Il terreno di coltura è l'RPMI-1640 addizionato di antibiotici, glutammina e 10% di siero fetale bovino.

3.2.6 Cellule C13*

La linea cellulare C13*, fornita dal Prof. G. Marventi del Dipartimento di Scienze Biomediche dell'Università di Modena, rappresenta la variante resistente al cisplatino della linea 2008, resa tale mediante progressivo incremento della concentrazione di cisplatino nel mezzo di coltura. Dopo una selezione dei cloni resistenti effettuata dopo 13 mesi, le cellule sono state sottoposte a trattamento cronico con cisplatino a concentrazione crescente da 0,25 a 5,25 μM . Gli studi che definiscono la concentrazione di cisplatino che causa il 50% di inibizione della formazione di colonie, hanno dimostrato che tali cellule sono 15 volte più resistenti al cisplatino rispetto alla variante sensibile.

L'allestimento delle colture prevede le stesse procedure seguite con la linea 2008.

3.2.7 Cellule MDA-MB-231

La linea cellulare MDA-MB-231 è una linea cellulare epiteliale di cancro al seno triplo negativo, originata da un versamento pleurico in una donna caucasica di 51 anni con adenocarcinoma mammario metastatico.

Il loro tempo di duplicazione è di 38 ore, crescono adese al substrato e vengono mantenute in coltura con terreno DMEM addizionato di antibiotici, glutammina e 10% di siero fetale bovino.

3.3 DETERMINAZIONE DEL COEFFICIENTE OTTANOLO-ACQUA

Il coefficiente di ripartizione ottanolo-acqua ($\log P$) viene utilizzato negli studi di *drug design* per determinare l'idrofobicità delle molecole. L'*N*-ottanolo, tra i possibili solventi utilizzabili, è migliore perché riproduce le condizioni che meglio mimano la ripartizione nelle biomembrane.

La lipofilia di una molecola è una proprietà chimico-fisica molto importante in quanto ne consente la permeazione attraverso le membrane biologiche. Il coefficiente di ripartizione permette di determinare la capacità di un complesso metallico di distribuirsi tra una fase non-acquosa (ottanolo) e una acquosa (acqua), e di conseguenza la sua lipofilia, esprimendo il risultato come logaritmo in base 10 del rapporto tra le concentrazioni nelle due fasi:

$$\log P_{oct/wat} = \log \left(\frac{[solute]_{octanol}}{[solute]_{water}^{un-ionized}} \right)$$

In questo lavoro di tesi il logP non è stato determinato sperimentalmente, ma ci si è avvalsi di un calcolatore digitale (molinspiration.com) per trovare il logP dei leganti liberi.

3.4 TEST DI VITALITÀ CELLULARE

3.4.1 MTT test

Il test dell'MTT è ampiamente utilizzato per la valutazione della vitalità cellulare nei protocolli di drug screening (Vistica et al. 1991).

Questo test si basa sulla capacità delle cellule di ridurre un sale di tetrazolio, 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio bromuro (MTT), a sale di formazano per opera della succinato tetrazolio reduttasi, un enzima respiratorio mitocondriale (Scudiero et al. 1988).

La riduzione comporta sia una modifica strutturale, sia un cambiamento di colore dell'indicatore, dal giallo al blu-viola; avviene solo nelle cellule vive, non in quelle morte o danneggiate nella quali la funzionalità mitocondriale risulta compromessa.

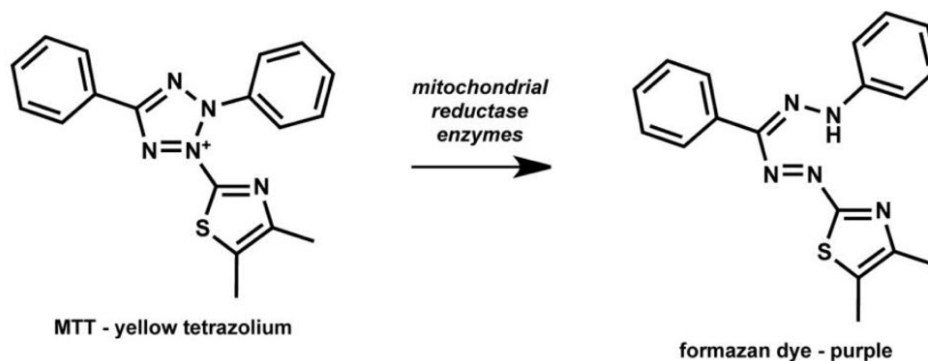


Figura 33: Reazione di riduzione dell'MTT a formazano.

Protocollo sperimentale:

A seguito di semina di $3 \cdot 5 \cdot 10^3$ cellule per pozzetto, in funzione delle caratteristiche di crescita della linea cellulare in esame, in micropiastre da 96 pozzetti in terreno di cultura (90 μ L) e incubazione a 37°C e atmosfera al 5% di CO₂ per 24 ore, si procede alla rimozione del terreno e alla sostituzione dello stesso con terreno fresco in cui è stato solubilizzato il composto in esame ad una specifica

concentrazione. Dopo 72 ore, a ciascun pozzetto vengono aggiunti 10 μL di una soluzione salina di MTT 5 mg/mL e dopo ulteriori 5 ore di incubazione vengono addizionati 100 μL di una soluzione di sodio dodecil solfato (SDS) in acido cloridrico (HCl) 0,01 M. A seguito di incubazione *overnight* viene misurata l'assorbanza di ciascun pozzetto a 570 nm con l'utilizzo di *Bio-Rad 680 microplate reader*. L'assorbanza media dei pozzetti trattati con diverse concentrazioni di composto è espressa come percentuale di assorbanza dei pozzetti di controllo non trattati. Il valore di IC_{50} rappresenta la concentrazione di composto che riduce l'assorbanza media a 570 nm del 50% rispetto ai pozzetti di controllo non trattati.

3.5 DETERMINAZIONE DELL'INTERNALIZZAZIONE CELLULARE

L'internalizzazione cellulare (*uptake*) dei complessi di argento è stata valutata mediante spettrofotometria di assorbimento atomico con fornetto di grafite (GF-AAS).

GF-AAS è una tecnica che permette di eseguire analisi di metalli, sia quantitative che qualitative, su un campione solido in soluzione. La lampada a catodo cavo a singolo elemento presente nel fornetto di grafite emette delle radiazioni luminose, che vengono specificatamente assorbite dagli atomi allo stato fondamentale. Il campione viene atomizzato e successivamente è in grado di assorbire le radiazioni. A seguito dell'assorbimento di energia elettromagnetica di intensità adeguata, elettroni dell'atomo possono abbandonare gli orbitali di appartenenza per passare ad orbitali a maggior livello energetico. Ciò determina il passaggio dell'atomo dallo stato fondamentale allo stato eccitato, in cui l'energia è maggiore e l'atomo meno stabile. In seguito, l'atomo ritorna rapidamente allo stato fondamentale restituendo l'energia assorbita all'ambiente. Questa energia emessa dall'atomo è l'energia che viene misurata permettendo una determinazione quantitativa del metallo. Poiché il numero di elettroni è specifico dell'atomo, si possono ottenere spettri di assorbimento atomico caratteristici. Infatti, ogni salto energetico avviene a lunghezze d'onda tipiche per ogni elemento e questo permette la determinazione quantitativa di specifici elementi.

Protocollo sperimentale:

Cellule U1285 sono state seminate in *flasks* da 75 cm^2 in terreno di coltura RPMI-1640 e incubate a 37°C in atmosfera controllata. Dopo 24 ore, il terreno è stato

sostituito con terreno fresco addizionato dei complessi di argento alla concentrazione di 2 μM , ad esclusione delle *flasks* contenenti le cellule che fungeranno da controllo alle quali il terreno è stato sostituito solamente con terreno fresco. Le cellule sono state incubate per ulteriori 24 ore. In seguito, il monostrato cellulare è stato raccolto con PBS + EDTA e tripsina, trasferito in provetta e centrifugato a 1000 *rpm* per 5 minuti. Al termine della centrifuga è stato eliminato il surnatante ed il *pellet* lavato con PBS senza EDTA freddo. Le cellule sono state contate e sottoposte ad un ulteriore ciclo di centrifuga a 1000 *rpm* per 7 minuti; dopodiché il surnatante è stato rimosso ed il *pellet* cellulare è stato conservato a temperatura refrigerata. Il giorno prima della lettura i *pellets* così ottenuti sono stati sottoposti a cinque cicli di shock termico di 20 minuti ciascuno ed in seguito mineralizzati con una miscela contenente una parte di perossido di idrogeno (H_2O_2) e due parti di acido nitrico (HNO_3) ultra puro TraceSELECT® (Sigma Aldrich). La determinazione della quantità di argento internalizzata, espressa in μg di Ag per 10^6 cellule, avviene mediante spettroscopia di assorbimento atomico in fornetto di grafite (GF-AAS) ad una lunghezza d'onda di 338,3 nm.

3.6 DETERMINAZIONE DELL'ATTIVITÀ DELLA TrxR

- In sistema *cell-free*:

L'inibizione della TrxR è stata valutata in un sistema *cell-free* con concentrazioni crescenti dei complessi in esame. Il saggio prevede la riduzione diretta del DTNB (acido 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzoico) da parte dell'enzima stesso: si sfrutta infatti la capacità della TrxR di ridurre il DTNB in presenza di NADPH, anche in assenza di Trx.

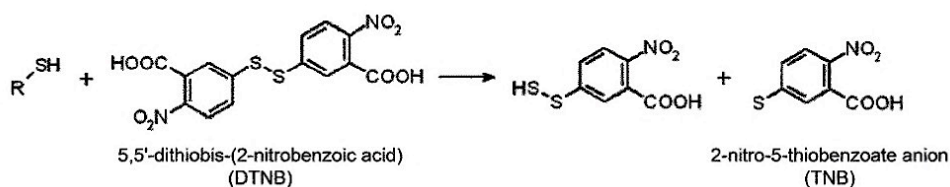


Figura 34: DTNB e TNB.

Il prodotto di questa reazione è il TNB (acido 5-tio-2-nitrobenzoico), la cui assorbanza viene determinata alla lunghezza d'onda di 415 nm. Il saggio richiede l'uso di NADPH 0,2 mM in tampone fosfato (pH 7,4) 0,1 M.

Per iniziare la reazione viene aggiunto DTNB 3 mM. La concentrazione finale di TrxR è di 0,2 U e vengono aggiunti i composti di argento alla concentrazione di 50 nM. Dopo 30 minuti, viene letta l'assorbanza a 415 nm in micropiastre da 96 pozzetti usando il lettore per micropiastre Bio-Rad 680.

- In lisato cellulare:

Per valutare gli effetti dei composti in un sistema vivente, lo stesso saggio è stato effettuato su lisato di cellule di adenocarcinoma polmonare a piccole cellule H157. Sono state seminate in flask da 25 cm² e, dopo aver raggiunto il 70% della confluenza, sono state trattate con i composti di argento in esame a concentrazioni pari all'IC50 calcolata per questi composti (0,5 µM), con Auranofin come controllo positivo. Dopo 24 ore, le cellule sono state staccate, centrifugate, lavate con PBS senza EDTA e centrifugate nuovamente. Dopo la rimozione del surnatante, ai pellet sono stati aggiunti 500 µL di RIPA buffer (Sigma-Aldrich) per ottenere il lisato. Il protocollo sperimentale seguito è lo stesso del sistema cell-free, ma al posto della TrxR pura sono stati impiegati 500 µg di proteina totale dal lisato cellulare. Per determinare la concentrazione di proteina è stato eseguito un saggio quantitativo per la determinazione delle proteine con il metodo Bradford.

3.7 DETERMINAZIONE DELLE SPECIE REATTIVE DELL'OSSIGENO

La produzione intracellulare di specie reattive dell'ossigeno (ROS) può essere osservata utilizzando particolari sonde indicatrici, strutturalmente derivate dalla fluoresceina, che diventano fluorescenti nel momento in cui si verifica un'ossidazione all'interno della cellula, cioè quando le esterasi intracellulari rimuovono i gruppi acetati. L'attività esterasica provoca quindi un cambiamento conformazionale nell'indicatore che gli permette di essere meglio trattenuto dalle cellule rispetto al composto originale. In questo metodo la sonda usata è il CM-H₂-DCFDA (5,6-clorometil-2,7-diclorodihidrofluoresceinadiacetato acetil estere).

Protocollo sperimentale:

Le cellule U1285 sono state seminate (10⁴ per pozzetto) in micropiastre da 96 wells in 90 µL di terreno RPMI-1640 senza rosso fenolo. Dopo 24 ore, le cellule sono state lavate con PBS/glucosio (10 mM) e caricate con la sonda CM-H₂-DCFDA, nello stesso tampone, alla concentrazione di 20 µM. Dopo essere state incubate

al buio per 20 minuti, le cellule sono state lavate due volte con PBS/glucosio ed incubate con i composti da testare (10 μM) al buio a 37°C. Come controllo positivo è stata usata l'antimicina (3 μM), potente inibitore del Complesso III della catena di trasporto degli elettroni. L'aumento della fluorescenza di DCFDA nel tempo è stato misurato usando come lunghezza d'onda di eccitazione 495 nm e di emissione 530 nm nel lettore VICTOR™ X *Multilabel Plate Reader*. La piastra è stata letta ogni 5 minuti per un'ora e mezza.

3.8 DETERMINAZIONE DEI GRUPPI TIOLICI

I tioli sono antiossidanti estremamente efficienti e giocano un ruolo fondamentale nel proteggere le cellule dal danno ossidativo. I gruppi sulfidrilici liberi più comuni nelle cellule sono il glutatione (GSH), la cisteina libera e i residui cisteinici delle proteine. Per la misurazione dello stato di riduzione dei tioli totali, tra i metodi più noti, il saggio di Ellman risulta essere quello maggiormente utilizzato. Quest'ultimo è un metodo colorimetrico che si basa sulla reazione tra un gruppo tiolico (-SH) e l'acido 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzoico (DTNB), che presenta un legame disolfuro reattivo, idoneo alla riduzione; dalla reazione si forma l'acido 5-tio-2-nitrobenzoico (TNB), rilevabile per la presenza del colore giallo, ed è proporzionale alla riduzione dei gruppi tiolici.

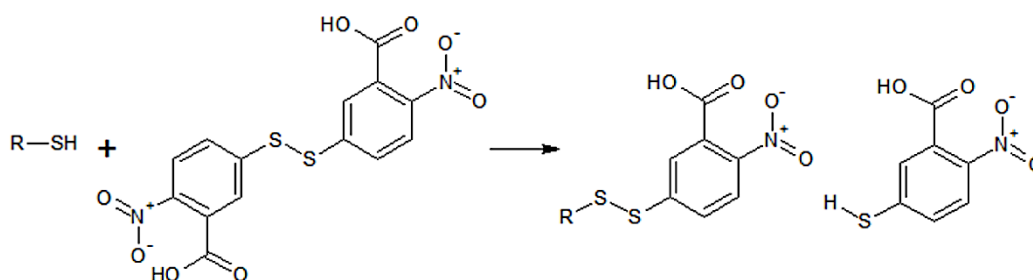


Figura 35: Reazione saggio di Ellman.

Protocollo sperimentale:

Cellule di U1285 sono state seminate in *flasks* da 25 cm². Dopo 24 ore, sono state trattate con i composti in esame a concentrazione scelta in base all'attività citotossica manifestata dal composto nella stessa linea cellulare tumorale. Il giorno successivo al trattamento, le cellule sono state staccate, contate e lavate con PBS senza EDTA. Il *pellet*, ottenuto dopo la centrifuga, è stato solubilizzato in 970 μL

di tampone Tris EDTA (TE, Tris 10mM, EDTA 1mM) con guanidina 7 M, successivamente sono stati aggiunti 30 μ L di DTNB 3mM per dare inizio alla reazione. Dopo 30 minuti di incubazione al buio e a temperatura ambiente, i campioni sono stati trasferiti in una micropiastre e la misura dell'assorbimento è stata letta a 415 nm.

3.9 VALUTAZIONE DEL POTENZIALE DI MEMBRANA MITOCONDRIALE

Per questo saggio viene utilizzato il kit *Mito-ID[®] Membrane Potential Cytotoxicity*, che consente di determinare per via fluorimetrica il potenziale di membrana mitocondriale in cellule di mammifero.

Protocollo sperimentale:

Cellule U1285 (10^4 per pozzetto) sono state seminate in micropiastre da 96 pozzetti utilizzando RPMI-1640 senza rosso fenolo ed incubate a 37°C in atmosfera controllata. Dopo 24 ore, il terreno è stato rimosso e le cellule sono state lavate due volte con PBS addizionato di glucosio (10 mM) e incubate con i composti da testare, solubilizzati in PBS/glucosio, a concentrazioni di 10 μ M per 30 minuti. Per il *CCCP control* si considera una concentrazione di 4 μ M. Successivamente si è aggiunto a ciascun pozzetto 35 μ L della soluzione di colorante costituita da *Mito-ID[®] Detection Reagent, Assay Buffer 1, Assay Buffer 2* ed acqua deionizzata. Le micropiastre sono state incubate a 37°C per 30 minuti. La lettura è stata effettuata ogni minuto con *Fluoroskan Ascent Labsystem* utilizzando come lunghezza d'onda di eccitazione 490 nm e di emissione 590 nm.

3.10 COLORAZIONE CON HOECHST 33258

Per determinare il tipo di morte cellulare a cui possono andare incontro le cellule in seguito a trattamento con i composti in esame, sono stati eseguiti degli studi di microscopia a fluorescenza, utilizzando come sonda il colorante Hoechst 33258, che permette di evidenziare il processo apoptotico (Luo and Kessel 1997). Le cellule della linea U1285 ($5 \cdot 10^5$) sono state seminate in *cultured slides* da 4 pozzetti in 1 mL di terreno ed incubate a 37°C in atmosfera controllata e il giorno seguente sono state trattate con i complessi in esame ad una concentrazione corrispondente al valore di IC_{50} per 24 ore. Trascorso il tempo di contatto, le cellule

Materiali, strumentazioni e metodi

sono state lavate con PBS. Per evidenziare il fenomeno di morte cellulare, le cellule sono state trattate con 1 mL di una soluzione di Hoechst 33258 ($5 \mu\text{g mL}^{-1}$) in PBS, lasciando a contatto al buio per 40 minuti. Infine, dopo aver lavato le cellule con 1 mL di PBS per eliminare il colorante in eccesso, si procede con l'osservazione dei campioni con il microscopio a fluorescenza Olympus BX41, equipaggiato con appropriati filtri.

4 RISULTATI E DICUSSIONE

4.1 DETERMINAZIONE DEL COEFFICIENTE DI RIPARTIZIONE OTTANOLO-ACQUA

La capacità di un composto di attraversare le membrane biologiche e, di conseguenza, di espletare la sua attività a livello intracellulare, dipende dal suo bilancio idro-lipofilo. Il coefficiente di ripartizione ottanolo-acqua, o logP, dei leganti utilizzati nella sintesi dei complessi oggetto di studio, è stato determinato, attraverso un calcolatore digitale. Trattandosi di complessi eterolettici, il valore di logP è stato calcolato sia per i leganti bidentati, contenenti il gruppo pirazolilacetato, sia per i co-leganti monodentati PTA, PPh₃.

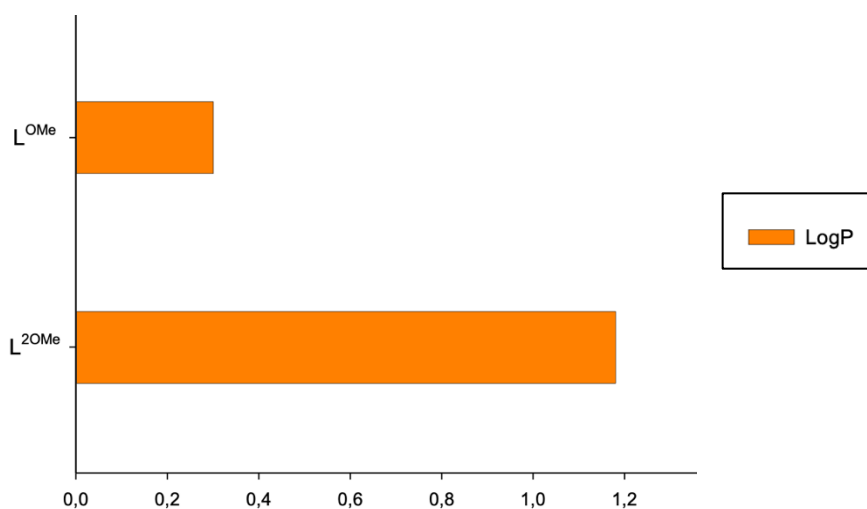


Figura 36: LogP dei leganti L^{OMe} e L^{2OMe}.

Il logP calcolato per i leganti pirazolilacetati, L^{OMe} e L^{2OMe}, risulta essere per entrambi un valore positivo, indice di spiccata lipofilia; è nettamente maggiore per L^{2OMe} (logP= 1,18) rispetto a L^{OMe} (logP=0,30) per la presenza, in posizione 2 e 4 nei gruppi *N,N*-donatori degli anelli pirazolici, di due gruppi metilici.

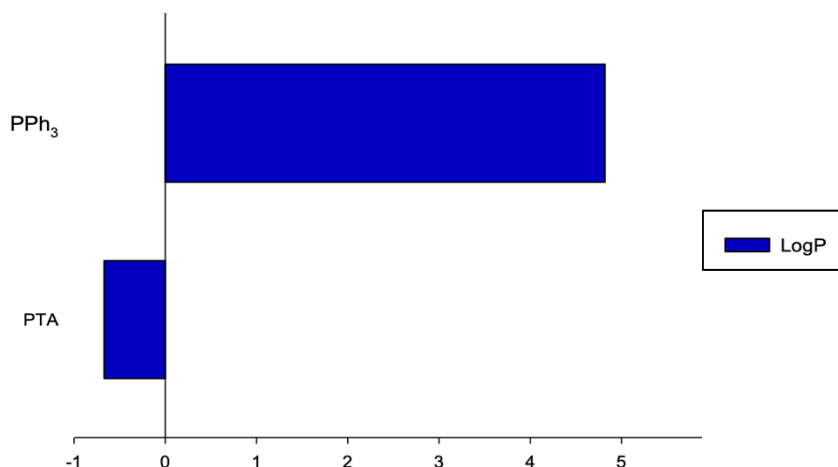


Figura 37: LogP dei co-leganti fosfinici PTA e PPh₃.

Analizzando la coppia di fosfine, è possibile notare che, contrariamente ai derivati pirazolilacetati, presentano valori di logP molto diversi tra loro: la PPh₃ risulta avere un valore nettamente positivo (logP=4,82), indice di spiccata lipofilia, dovuto alla presenza dei gruppi fenilici, mentre la PTA, che invece presenta un valore negativo (logP=-0,67), indice di moderata idrofilia.

Sulla base delle considerazioni fatte, è possibile affermare che i complessi 12 [Ag(PPh₃)(L^{OMe})]NO₃ e 14 [Ag(PPh₃)(L^{2OMe})]NO₃ contenenti la fosfina PPh₃ sono i più lipofili, mentre il complesso 13 contenente la fosfina PTA [Ag(PTA)(L^{2OMe})]NO₃ presenta una minore lipofilia.

4.2 TEST DI VITALITÀ CELLULARE

4.2.1 MTT test su cellule tumorali

L'attività citotossica dei complessi in esame è stata valutata nei confronti di numerose linee cellulari tumorali umane mediante il test dell'MTT. L'MTT test è un saggio colorimetrico largamente utilizzato in vari protocolli di *drug screening* per valutare l'attività biologica di nuovi composti. Questo test permette di valutare la vitalità cellulare in seguito al trattamento con i composti in esame, in funzione dell'attività mitocondriale delle cellule stesse. L'indicatore utilizzato è l'MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio bromuro), un sale solubile di tetrazolio che, nelle cellule vive, viene ridotto ad opera dell'enzima mitocondriale succinato deidrogenasi, formando un cristallo di formazano, di colore viola e insolubile in acqua. Nello specifico, le linee cellulari utilizzate sono state: 2008, cellule di

carcinoma ovarico, C13*, linea cellulare che rappresenta la variante resistente al cisplatino della linea 2008; HCT-15, cellule di adenocarcinoma colon rettale scarsamente sensibili al cisplatino; PSN-1, cellule di adenocarcinoma pancreatico; A431, cellule di carcinoma squamoso della cervice uterina, U1285, cellule di carcinoma polmonare a piccole cellule; MDA-MB-231, cellule di carcinoma mammario. Le cellule, in terreno e condizioni di crescita esponenziale, sono state seminate a diverse densità, a seconda del tipo, e trattate dopo 24 ore con concentrazioni crescenti dei complessi in esame. Al termine dell'esposizione, durata 72 ore, le cellule sono state trattate con l'MTT per 5 ore e poi lisate *overnight* con SDS (sodio dodecil solfato). Le concentrazioni del formazano sono state determinate mediante lettura spettrofotometrica a 570 nm.

I dati, elaborati mediante regressione non lineare logistica a quattro parametri ed espressi in termini di valori di IC₅₀, sono riportati in **Tabella 1**.

	IC ₅₀ (μM) ± D.S.					
	2008	HCT-15	PSN-1	A431	U1285	MDA-MB-231
L^{OMe}	>50	>50	>50	>50	>50	-
L^{2OMe}	>50	>50	>50	>50	>50	-
PPh₃	-	>50	-	47,53 ± 1,14	>50	-
PTA	>100	>100	>100	>100	>100	>100
12	1,51 ± 0,32	8,54 ± 0,96	4,28 ± 0,43	1,63 ± 0,39	1,60 ± 0,24	3,23 ± 0,42
13	6,11 ± 1,18	5,81 ± 0,48	21,78 ± 0,85	4,28 ± 1,84	1,89 ± 0,27	4,78 ± 0,92
14	1,31 ± 0,22	9,23 ± 2,96	1,24 ± 0,38	0,71 ± 0,21	0,90 ± 0,09	10,55 ± 1,95
Cis-Pt	2,22 ± 1,02	15,28 ± 2,63	18,25 ± 3,11	2,10 ± 0,87	2,12 ± 0,89	30,51 ± 2,60

Tabella 1: le cellule sono state incubate per 72 ore con concentrazioni crescenti dei composti in esame. La citotossicità è stata valutata mediante MTT test. I valori di IC₅₀ sono stati calcolati mediante regressione lineare non logistica a quattro parametri (P<0,05). D.S.=deviazione standard.

Sono stati testati i complessi di Ag(I) in esame, ma anche i relativi leganti *N,N*-donatori e fosfinici, per valutare in quale misura possano contribuire all'attività citotossica del complesso risultante. Dai dati riportati nella Tabella 1 risulta evidente che entrambi i leganti pirazolilacetato 1 (L^{OMe}) e 2 (L^{2OMe}) non risultano attivi nei confronti di tutte le linee cellulari considerate, rivelando un valore di IC₅₀ superiore a 50 µM.

Per quanto riguarda i complessi di Ag(I) possono essere suddivisi in base al legante fosfinico in:

- Complessi con trifetilfosfina (PPh₃):
 - 12 [Ag(PPh₃)(L^{OMe})]NO₃
 - 14 [Ag(PPh₃)(L^{2OMe})]NO₃
- Complessi con 1,3,5-triaza-7-fosfaadamantano (PTA)
 - 13 [Ag(PTA)(L^{2OMe})]NO₃

Dai risultati ottenuti è possibile constatare che tutti i complessi di Ag(I) dimostrano una spiccata attività citotossica in tutte le linee cellulari analizzate, con valori di IC₅₀ nell'ordine di grandezza del micromolare e, in alcuni casi, del sub-micromolare. Complessivamente l'azione antiproliferativa dei complessi risulta maggiore rispetto al cisplatino, usato come farmaco di riferimento, in tutte le linee cellulari prese in considerazione.

Tra i complessi testati, quello meno attivo risulta essere il complesso 13, con un valore medio di IC₅₀ media pari a 7,44 µM, mentre i complessi 12 e 14 risultano più attivi su tutte le linee cellulari testate. Infatti, analizzando i valori di IC₅₀ medi calcolati per questi ultimi, rispettivamente di 3,46 µM e 3,99 µM, è possibile notare un'attività citotossica equiparabile.

È interessante notare come il composto 14, nelle linee cellulari A431 e U1285 sia risultato estremamente attivo, con valori di IC₅₀ nell'ordine di grandezza del submicromolare (0,71 µM e 0,90 µM rispettivamente). Quest'ultima linea cellulare è risultata inoltre la più sensibile al trattamento con tutti i complessi in esame e per questo motivo è stata scelta per i successivi studi riguardanti il meccanismo d'azione.

4.2.2 Studi di resistenza crociata

La valutazione delle proprietà antiproliferative dei composti di Ag(I) è stata svolta anche in linee cellulari selezionate per la loro caratteristica resistenza al cisplatino.

I test di chemiosensibilità sono stati infatti svolti su due linee cellulari umane di carcinoma ovarico: 2008, variante sensibile e C13*, la corrispettiva variante resistente ottenuta in vitro mediante progressivo aumento della concentrazione di cisplatino nel terreno di coltura e successiva selezione dei cloni divenuti resistenti. Lo scopo degli studi di resistenza crociata è stato quello di verificare la capacità dei composti in esame di superare la resistenza acquisita alla terapia. Le cellule sono state seminate in micropiastre da 96 pozzetti, trattate dopo 24 ore con concentrazioni crescenti dei composti in esame per 72 ore e al termine di ciò è stata determinata la vitalità cellulare mediante MTT test, considerando anche in questo caso il cis-platino come farmaco di riferimento. A seguito della determinazione dei valori di IC₅₀ per i vari composti nelle linee cellulari in esame è stato definito il Fattore di Resistenza (FR), ossia il rapporto tra il valore di IC₅₀ nelle cellule resistenti e il valore di IC₅₀ nelle cellule sensibili.

$$FR = \frac{(IC_{50} \text{ cellule resistenti})}{(IC_{50} \text{ cellule sensibili})} \quad (1)$$

IC ₅₀ (µM) ± D.S.			
	2008	C13*	FR
12	1,51 ± 0,32	0,62 ± 0,05	0,41
13	6,11 ± 1,18	5,04 ± 0,28	0,82
14	1,31 ± 0,22	0,15 ± 0,01	0,11
Cis-Pt	2,22 ± 1,02	24,11 ± 3,02	10,86

Tabella 2: Profili di resistenza crociata valutati mediante MTT test. I valori di IC₅₀ sono stati determinati mediante regressione non lineare logistica a quattro parametri (P<0.05). Le cellule sono state incubate per 72 ore con concentrazioni crescenti dei complessi in esame e del riferimento. D.S.= deviazione standard, FR= fattore di resistenza.

Nella Tabella 2 sono riportati i profili di resistenza crociata in termini di IC₅₀, utilizzati poi per il calcolo del Fattore di Resistenza (FR), calcolato secondo l'equazione (1).

Anche nei confronti della linea cellulare C13* resistente al cisplatino, i complessi dimostrano una buona attività citotossica; in particolare, i composti 12 e 14 risultano nuovamente quelli più attivi con valori di IC₅₀ nel *range* del submicromolare. Inoltre, tutti i complessi si sono dimostrati più attivi rispetto al

Risultati e discussione

chemioterapico di riferimento con valori di IC_{50} medi dalle 4,8 alle 160 volte più bassi rispetto a quelli del cisplatino.

Tutti i complessi mostrano infine un valore di FR inferiore a 2, valore che in letteratura viene considerato come indice di superamento del fenomeno della farmacoresistenza.

I risultati ottenuti suggeriscono quindi che il meccanismo d'azione alla base dell'inibizione della crescita cellulare da parte di questi complessi possa essere diverso da quello identificato per il cisplatino.

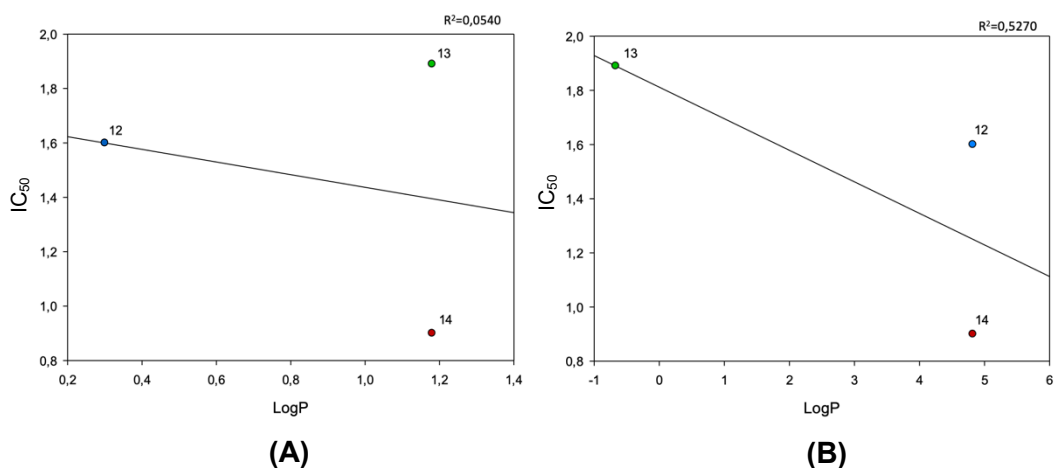


Figura 38: Confronto tra i valori di IC_{50} dei complessi di Ag in cellule U1285 e i valori di $logP$ calcolati rispettivamente per leganti liberi (A) e co-leganti liberi (B).

La Figura 38 riporta i grafici in cui vengono correlati i valori di citotossicità dei complessi di Ag in esame, rispettivamente con i valori di $logP$ calcolati dei leganti *N,N*-donatori (A) e i valori di $logP$ calcolati dei co-leganti fosfinici (B).

È possibile notare come per quanto riguarda il grafico (A) non vi sia una correlazione lineare tra i valori di IC_{50} e il grado di lipofilia dei leganti ($R^2=0,0540$). Contrariamente, nel grafico (B) emerge una parziale correlazione tra i valori di citotossicità e i valori di lipofilia dei co-leganti fosfinici ($R^2=0,5270$).

4.3 DETERMINAZIONE DELL'INTERNALIZZAZIONE CELLULARE

Un aspetto importante della caratterizzazione dell'attività biologica dei complessi metallici a potenziale attività antitumorale è rappresentato dalla valutazione dell'internalizzazione (*uptake*) cellulare, primo *step* dell'azione di un potenziale farmaco nelle cellule tumorali. Il contenuto di argento è stato monitorato nella linea cellulare di carcinoma polmonare a piccole cellule U1285, nei confronti delle quali i composti sono risultati particolarmente attivi.

La quantità totale di argento rilevata, che rappresenta il valore risultante tra la quantità di metallo che entra nelle cellule e quella che viene eliminata dai sistemi di estrusione, viene espressa in μg di $\text{Ag}/10^6$ cellule, ed è stata determinata mediante spettroscopia di assorbimento atomico in fornetto di grafite (GF-AAS).

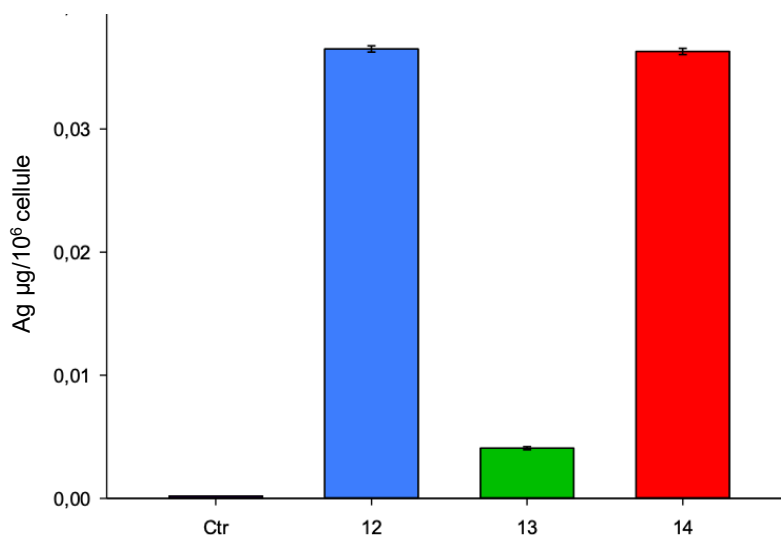


Figura 39: Determinazione dell'accumulo intracellulare di argento in cellule U1285 di carcinoma polmonare a piccole cellule. Le cellule sono state incubate per 24 ore con concentrazioni dei composti di Ag pari a $2 \mu\text{M}$; la quantità del metallo è stata determinata con spettroscopia di assorbimento atomico in fornetto di grafite (GF-AAS) ed è stata espressa in $\mu\text{g Ag}/10^6$ cellule.

Dalla Figura 39, che riporta i risultati ottenuti relativi all'accumulo intracellulare di argento, si può osservare come i complessi 12 e 14 risultino essere quelli maggiormente internalizzati rispetto al complesso 13, meno efficacemente internalizzato. Dalla differenza in termini di efficacia di internalizzazione tra i complessi, si può dedurre che la differente struttura dei complessi sia in grado di influenzare il grado di *uptake* cellulare: infatti, i complessi 12 e 14, che risultano essere quelli internalizzati con maggiore efficacia, contengono come co-legante la fosfina PPh_3 che, conferendo loro una maggiore lipofilia, probabilmente agevola il processo di *uptake*.

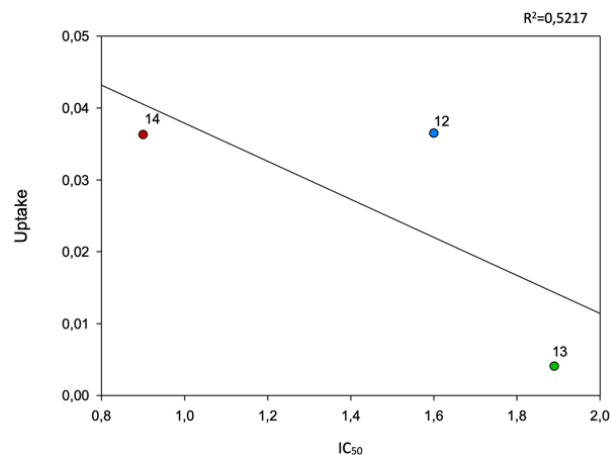


Figura 40: Confronto tra valori di IC₅₀ dei complessi di Ag e l'*uptake* (Ag µg/10⁶ cellule) dopo 24 ore a concentrazioni equimolari (2 µM).

Correlando i risultati di *uptake* con i dati di citotossicità (Figura 40), appare evidente che ci sia, seppur parzialmente, una certa correlazione tra i valori di IC₅₀ e quelli relativi all'accumulo intracellulare di metallo ($R^2=0,5217$). È interessante notare che a parità di internalizzazione tra il complesso 12 e il complesso 14, quest'ultimo risulta essere il più citotossico, mentre il complesso 13 che presenta il minore grado di internalizzazione è anche dotato di minore attività citotossica.

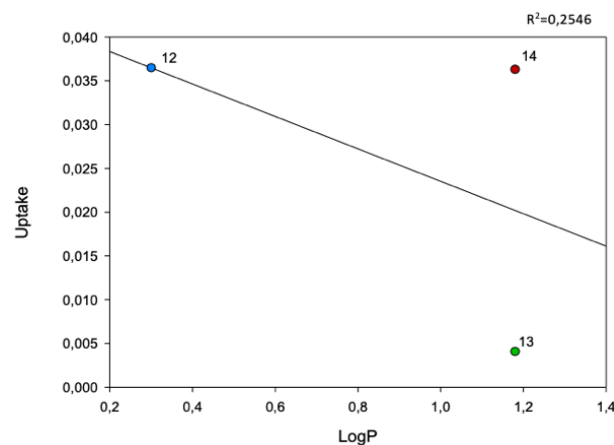


Figura 41: Confronto tra i valori di logP calcolato dei leganti e l'*uptake* su cellule U1285 dei rispettivi complessi dopo 24 ore a concentrazioni equimolari (2 µM).

Confrontando infine i risultati mostrati in Figura 41, è possibile notare una scarsa correlazione ($R^2=0,2546$) tra i valori di *uptake* e i valori di logP calcolati, questo perché il complesso 12 presentando il maggior grado di internalizzazione, contiene co-legante (L^{OMe}) caratterizzato da minore lipofilia. Invece, i complessi 13 e 14, nonostante posseggano lo stesso legante (L^{2OMe}) caratterizzato da maggiore lipofilia, in realtà vengono internalizzati in maniera molto diversa, ciò a sottolineare la scarsa correlazione.

4.4 DETERMINAZIONE DELL'ATTIVITÀ DELLA TrxR

Sulla base dei numerosi studi con cui è stato ampiamente dimostrato che i complessi di argento hanno come *target* molecolare la TrxR (Gandin et al. 2013), è stata valutata la capacità dei complessi di argento di inibire il sistema tioredossinico, sia in un sistema *cell-free* che in cellule di carcinoma polmonare a piccole cellule U1285. Il sistema tioredossinico, costituito dalla tioredossina riduttasi (TrxR) e dalla tioredossina (Trx), è fondamentale per mantenere l'equilibrio redox all'interno della cellula. Come descritto in precedenza, il *target* d'elezione dei complessi di argento ad azione antiproliferativa è la TrxR. È un enzima appartenente alla classe delle selenoproteine, con struttura omodimerica: possiede un residuo di selenocisteina (SeCys) nell'estremità C-terminale, necessario per l'attività catalitica dell'enzima stesso. La SeCys a pH fisiologico si presenta deprotonata, grazie alla sua pKa di circa 5,2, e questa caratteristica rende il residuo un sito nucleofilo che può essere bersaglio di composti elettrofili: a seguito dell'interazione con la selenocisteina, la TrxR viene bloccata e non può più svolgere la sua attività.

Valutazione dell'attività enzimatica della TrxR in sistema *cell-free*

Il saggio ha previsto l'incubazione dell'enzima isolato con i complessi in studio alle concentrazioni di 50 nM, 25 nM e 12,5 nM. I risultati riportati, sono espressi come percentuale di attività residua dell'enzima rispetto al controllo; come il controllo positivo è stato utilizzato Auranofin, noto inibitore della TrxR (Onodera et al. 2019).

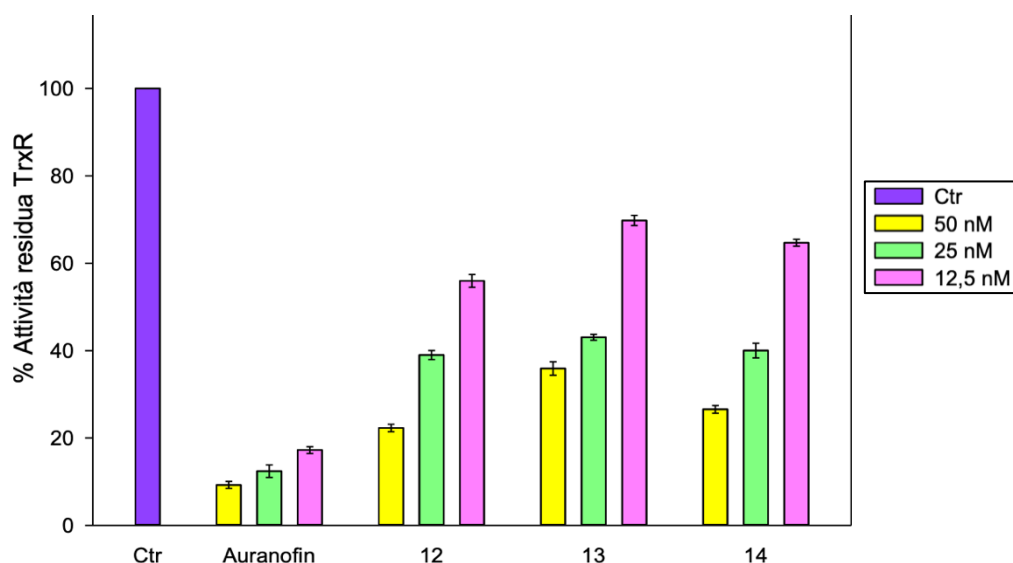


Figura 42: Valutazione dell'attività residua della TrxR in sistema *cell-free*.

Dal grafico si può notare come tutti i complessi oggetto di studio siano in grado di ridurre l'attività della TrxR in maniera minore rispetto ad Auranofin, utilizzato come controllo positivo. È inoltre evidente come l'attività residua dell'enzima sia proporzionale alla concentrazione di complesso ad indicare che i composti in esame siano in grado di inibire la funzionalità enzimatica in maniera concentrazione-dipendente.

	IC₅₀ (nM) ± D.S.
Auranofin	0,8 ± 0,1
AgNO₃	2,4 ± 0,3
12	16,45 ± 1,11
13	28,63 ± 1,11
14	22,58 ± 1,12

Tabella 3: Valori di IC₅₀ di inibizione per l'enzima isolato calcolati per tutti i complessi in esame e relativi valori dei riferimenti.

Dai dati di attività residua dell'enzima tioredossina reductasi è stata calcolata l'IC₅₀ di inibizione per l'enzima isolato per tutti i complessi al fine di confrontarla con quella di Auranofin e di un sale di Ag di riferimento, AgNO₃ (Tabella 3).

Dalla tabella è possibile notare che il complesso 12 è quello che possiede una capacità inibitoria migliore rispetto agli altri mentre il composto 13 è quello che presenta un valore di IC₅₀ più elevato. Tuttavia, Auranofin e AgNO₃ si sono dimostrati dei migliori inibitori dell'enzima isolato rispetto ai complessi di Ag.

Valutazione dell'attività enzimatica della TrxR in lisato cellulare

Dopo aver effettuato il saggio in sistema *cell-free*, è stata valutata la capacità dei complessi di argento di inibire la TrxR in cellule di carcinoma polmonare a piccole cellule U1285. Le cellule sono state trattate per 24 ore con i composti in esame alla concentrazione di 2 μM, utilizzando come controllo positivo Auranofin alla concentrazione di 0,5 μM. I lisati cellulari sono stati poi sottoposti al saggio spettrofotometrico di riduzione del DTNB a 415 nm, al fine di valutare l'attività residua della TrxR.

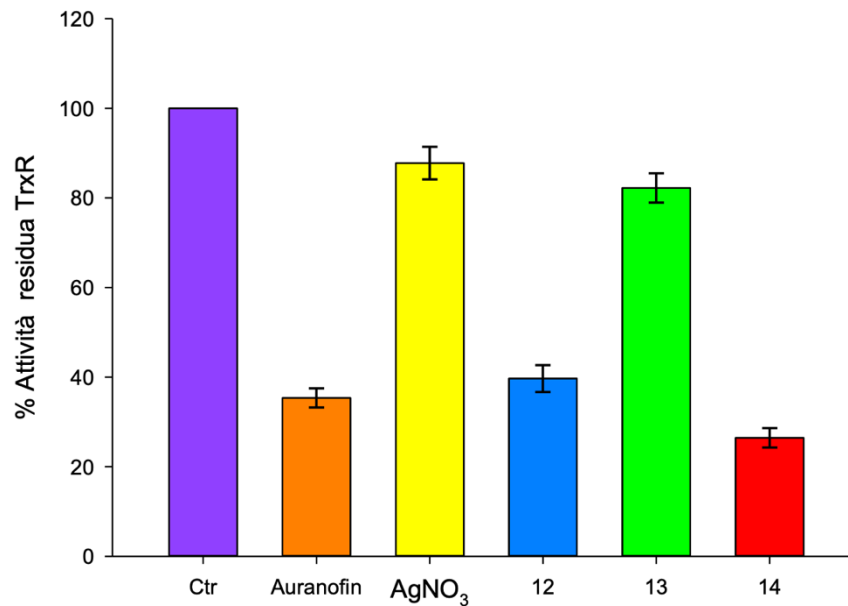


Figura 43: Valutazione dell'attività residua della TrxR in cellule U1285.

Dal grafico si può notare come i complessi 12 e 14 siano in grado di inibire marcatamente l'enzima in lisato cellulare, in particolare, il complesso 14 causa una inibizione enzimatica maggiore rispetto ad Auranofin. Contrariamente, il complesso 13, come anche già visto precedentemente valutando l'attività enzimatica in sistema *cell-free*, risulta essere quello meno attivo.

4.5 VALUTAZIONE DELL'EFFETTO INDOTTO DAI COMPLESSI A LIVELLO MITOCONDRIALE

I complessi di argento oggetto di questo lavoro di tesi hanno dimostrato negli studi precedenti la loro capacità di modulare il funzionamento di enzimi deputati alla regolazione del bilancio redox nell'ambiente intracellulare. Tenendo conto di questa evidenza, è stato valutato se i complessi fossero in grado di alterare la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) valutando anche lo stato redox dei gruppi tiolici cellulari, e causare la deplezione del potenziale di membrana mitocondriale nella linea U1285 di carcinoma polmonare a piccole cellule.

4.5.1 Determinazione delle specie reattive dell'ossigeno (ROS)

La variazione dei livelli cellulari di ROS è stata monitorata mediante l'utilizzo della sonda CM-H₂-DCFDA, specifica per la produzione di perossido di idrogeno. Come controllo positivo è stata impiegata l'Antimicina, antibiotico in grado di bloccare la catena respiratoria mitocondriale a livello del complesso III. Le cellule U1285 sono state incubate in atmosfera controllata con la sonda CM-H₂-DCFDA, che una volta entrata nelle cellule, viene idrolizzata e successivamente ossidata dai ROS a DCF che risulta fluorescente. Le cellule sono state trattate con i composti in esame alle concentrazioni di 12,5 μ M e 6,25 μ M i complessi 12 e 13, invece alle concentrazioni di 12,5 μ M, 6,25 μ M e 3,125 μ M il complesso 14; la produzione di H₂O₂ è stata valutata mediante lettura fluorimetrica ogni 5 minuti per un'ora e mezza.

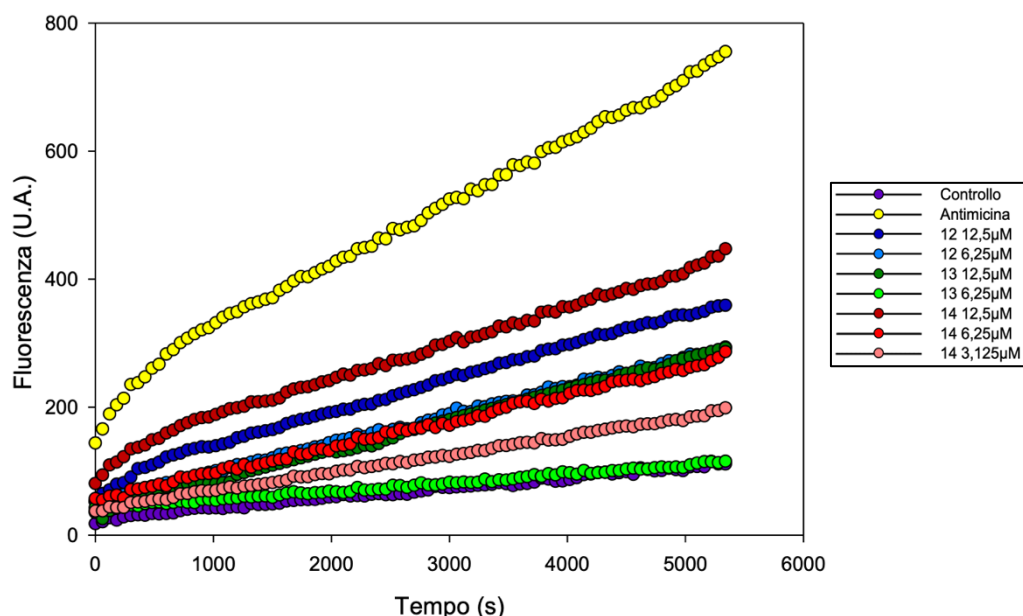


Figura 44: Produzione di ROS in cellule U1285. Le cellule sono state pre-incubate in PBS/10 mM glucosio per 20 minuti a 37°C e 5% CO₂ in presenza della sonda CM-H₂-DCFDA (20 μ M). In seguito le cellule sono state trattate con i composti alle diverse concentrazioni di 12,5 μ M, 6,25 μ M e 3,125 μ M. È stata poi misurata la fluorescenza di DCF.

Dalla Figura 44, si può notare come tutti i complessi di argento a tutte le concentrazioni utilizzate, siano in grado di produrre ROS nella linea di carcinoma polmonare a piccole cellule U1285, seppur in misura minore all'Antimicina, utilizzata come controllo positivo.

Tra tutti i complessi, il complesso 13 è stato quello che ha prodotto la minore quantità di ROS; infatti, alla concentrazione di 6,25 μ M, la più bassa testata, la

produzione di specie radicaliche è stata comparabile a quella del controllo non trattato. Diversamente, il complesso 14 è in grado di aumentare la produzione di ROS a tutte le concentrazioni testate (12,5 μ M, 6,25 μ M e 3,125 μ M).

4.5.2 Determinazione dei gruppi tiolici

Numerose evidenze scientifiche suggeriscono che i complessi di Ag, inibendo il sistema TrxR, siano in grado di esercitare la loro azione citotossica grazie all'induzione di un aumento della produzione basale di ROS. Questo, a sua volta, si riflette sull'equilibrio redox cellulare, andando a determinare un conseguente stress ossidativo. Quest'ultimo può essere valutato monitorando lo stato redox dei gruppi tiolici cellulari.

Per tale motivo, è stata effettuata la determinazione dei gruppi sulfidrilici (SH) totali in cellule U1285 trattate con i complessi in esame mediante protocollo di Ellman.

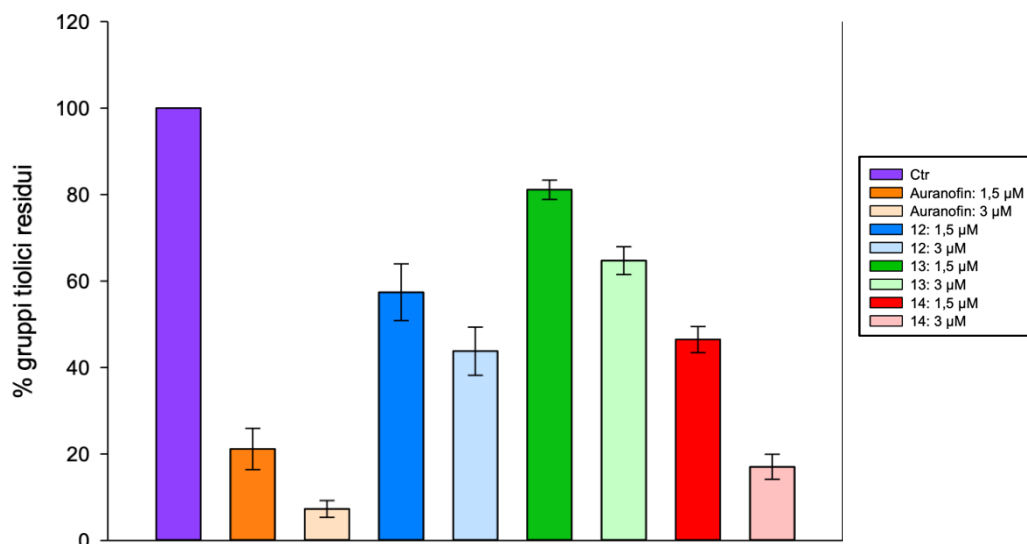


Figura 45: Determinazione dei tioli liberi attraverso l'utilizzo del DTNB assay. Le cellule sono state incubate per 24 ore con i composti in esame alle concentrazioni di 1,5 μ M e 3 μ M. Il livello di gruppi sulfidrilici liberi è stato valutato per via spettrofotometria a 415 nm.

Nella Figura 45 è riportata la percentuale dei gruppi tiolici residui in cellule di carcinoma polmonare a piccole cellule U1285 dopo trattamento con i complessi in esame, alle concentrazioni di 1,5 μ M e 3 μ M.

Dal grafico si può notare come tutti i complessi alle concentrazioni utilizzate causino una riduzione della presenza di gruppi tiolici ridotti nelle proteine cellulari, indice quindi di una condizione di stress ossidativo. Tuttavia, questo effetto è stato inferiore a quello generato da Auranofin, utilizzato come controllo positivo.

Tra i complessi utilizzati, a confermare i risultati ottenuti in precedenza, quelli a trattamento, con attività maggiore si sono dimostrati i complessi 12 e 14. In particolare, il trattamento con il complesso 14 promuove una riduzione dei gruppi tiolici di circa il 54% e 83% quando testato a 1,5 μM e 3 μM , rispettivamente. Per quanto riguarda invece il complesso 13, si è osservato un effetto minore a tutte le concentrazioni testate.

4.5.3 Valutazione del potenziale di membrana mitocondriale

Il kit *Mito-ID[®] Membrane Potential Cytotoxicity* è in grado di misurare il potenziale elettrico a livello della membrana mitocondriale tramite una tecnica a fluorescenza. Il kit prevede l'utilizzo di un colorante cationico che fluoresce nel verde oppure nell'arancione a seconda dello stato del potenziale di membrana.

Cellule U1285 sono state incubate per 30 minuti con i composti in esame alle concentrazioni di 12,5 μM e 6,25 μM per i complessi 12 e 13, e alle concentrazioni di 12,5 μM , 6,25 μM e 3,125 μM per il complesso 14. Successivamente si è aggiunto a ciascun pozzetto 35 μL della soluzione di colorante costituita da *Mito-ID[®] Detection Reagent*, *Assay Buffer 1*, *Assay Buffer 2* ed acqua deionizzata. Le micropiastre sono state incubate a 37°C per 30 minuti. La lettura è stata effettuata ogni minuto con *Fluoroskan Ascent Labsystem* utilizzando come lunghezza d'onda di eccitazione 490 nm e di emissione 590 nm.

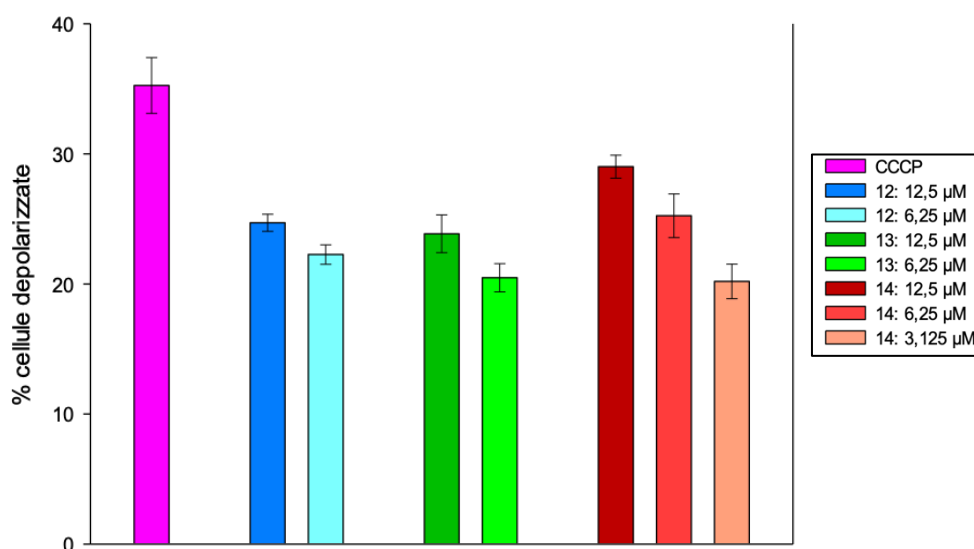


Figura 46: Cellule U1285 sono state seminate e dopo 24 ore trattate con i composti in esame per 30 minuti; successivamente è stata aggiunta una soluzione di colorante. Le micropiastre sono state incubate per 30 minuti e poi è stata letta la fluorescenza.

Come si può notare dalla Figura 46, tutti i complessi di argento sono in grado di generare una depolarizzazione della membrana mitocondriale, in maniera paragonabile al *CCCP Control*. L'insieme dei risultati ottenuti monitorando la produzione di specie reattive dell'ossigeno e valutando lo stato del potenziale di membrana mitocondriale permette di affermare che l'effetto di inibizione svolto sulla TrxR si traduce in uno sbilancio ossidoriduttivo cellulare. Infatti, il complesso 14, in particolare alla concentrazione più alta di 12,5 μM , causa una rilevante deplezione del potenziale di membrana, in accordo con la spiccata produzione di specie reattive dell'ossigeno indotta dal trattamento delle cellule U1285 con questo composto. Per i complessi 12 e 13, la deplezione del potenziale di membrana risulta invece tra loro paragonabile.

Si conferma quindi una correlazione tra la produzione di ROS e la deplezione del potenziale di membrana mitocondriale; in entrambi i casi il complesso 14 si è dimostrato quello maggiormente capace di indurre una condizione di stress ossidativo e un effetto antimitocondriale.

4.6 COLORAZIONE CON HOECHST 33258

L'induzione di apoptosi in cellule di carcinoma polmonare a piccole cellule U1285, è stata valutata mediante microscopia a fluorescenza utilizzando il colorante Hoechst 33258 in cellule trattate per 24 ore con i complessi in esame. L'apoptosi è un meccanismo di morte cellulare programmato e multistadio caratterizzato da una serie di eventi biochimici e di cambiamenti morfologici che avvengono principalmente a carico del nucleo e del citoplasma (Wyllie, Kerr and Currie 1980). Infatti, nelle cellule apoptotiche si possono osservare la condensazione e l'aggregazione della cromatina alla periferia della membrana nucleare, la contrazione del citoplasma con successiva diminuzione del volume cellulare e la formazione di corpi apoptotici, vescicole di frammenti citoplasmatici e nucleari. La membrana citoplasmatica rimane integra, ma presenta numerose invaginazioni ed estroflessioni che sono caratteristiche del fenomeno. La condensazione e frammentazione della cromatina possono essere rilevate mediante microscopia a fluorescenza usando il colorante di Hoescht 33258, una sonda fluorescente in grado di intercalarsi tra le basi del DNA colorandolo di blu. Quindi, in presenza di un processo apoptotico, la cellula all'analisi microscopica appare intensamente fluorescente (Luo and Kessel 1997).

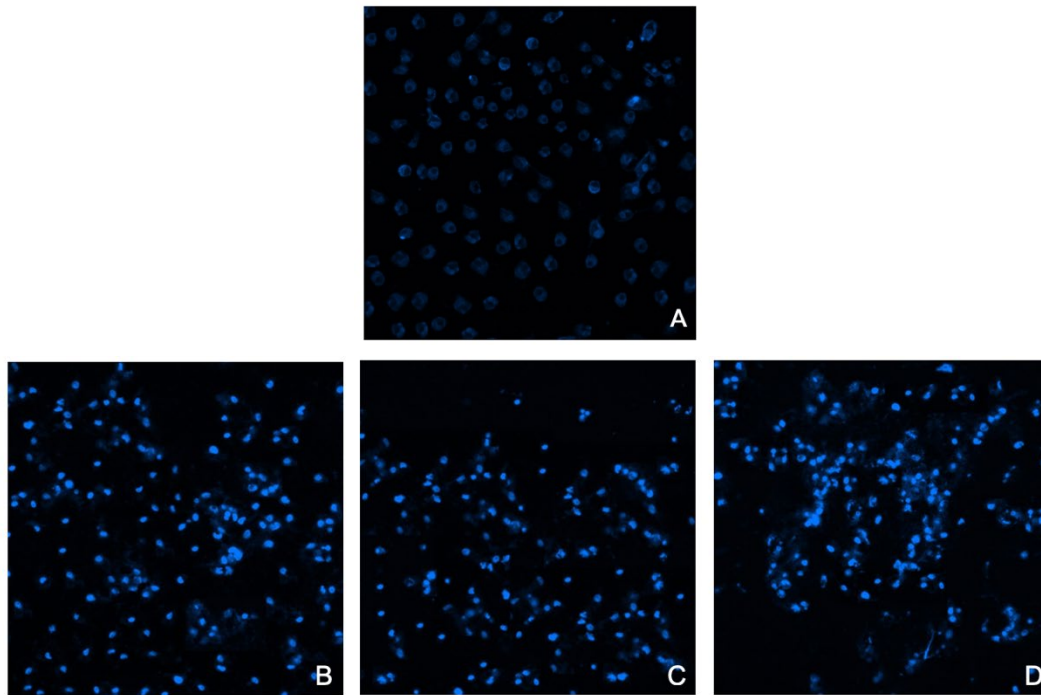


Figura 47: Immagini ottenute al microscopio a fluorescenza (20X) di cellule di carcinoma polmonare non a piccole cellule U1285; **(A)** cellule di controllo; **(B)** complesso 12, 2 μM per 24h; **(C)** complesso 13, 2 μM per 24h; **(D)** complesso 14, 2 μM per 24h.

Come si può osservare dalle immagini riportate in Figura 47, in tutte le cellule trattate con i complessi in esame, per 24 ore ad una concentrazione pari a 2 μM (B, C, D), è possibile osservare un significativo aumento della fluorescenza rispetto al controllo non trattato (A), ad indicare la presenza del fenomeno apoptotico.

5 CONCLUSIONI

Nel presente lavoro di tesi sperimentale sono stati studiati nuovi complessi di argento (I) con leganti fosfinici e *N,N*-donatori. I complessi 12 e 14 presentano lo stesso co-legante fosfinico lipofilo, la trifenilfosfina (PPh₃), ma differiscono per il legante pirazolilacetato; invece, il complesso 13 presenta come co-legante fosfinico molto più idrofilo, l'1,3,5-triaza-7-fosfaadamantano (PTA), mentre presenta lo stesso legante pirazolilacetato del complesso 14.

Tutti i complessi in esame hanno dimostrato, nei saggi di vitalità su modelli bidimensionali *in vitro*, una significativa attività citotossica nelle diverse linee tumorali umane, dimostrando di possedere valori medi di IC₅₀ che si collocano nel *range* del micromolare e sub-micromolare.

Tra i complessi testati, quello meno attivo risulta essere il complesso 13, mentre i complessi 12 e 14, risultano più attivi su tutte le linee cellulari testate. È interessante notare come tutti i complessi siano risultati estremamente attivi nella linea cellulare di carcinoma polmonare a piccole cellule U1285, e per questo motivo è stata scelta per i successivi studi riguardanti il meccanismo d'azione.

Dato che i fenomeni di farmacoresistenza rappresentano uno dei più grandi limiti della classica chemioterapia, si è deciso di testare i complessi in esame anche nella linea cellulare C13* che rappresenta la variante resistente al cisplatino della linea 2008 di adenocarcinoma ovarico.

Tutti i complessi hanno dimostrato di superare il fenomeno della farmacoresistenza (FR<2), suggerendo quindi che il meccanismo d'azione alla base dell'inibizione della crescita cellulare da parte di questi derivati possa essere diverso da quello identificato per il cisplatino.

Al fine di correlare l'attività citotossica dei complessi con la loro capacità di essere internalizzati a livello cellulare, è stato monitorato il loro accumulo cellulare nella linea U1285, considerata interessante, non solo per i risultati ottenuti nei test di citotossicità, ma anche per la sua peculiare caratteristica di sovraesprimere la tioredossina riduttasi, che di recente è stata individuata come il bersaglio molecolare di molte classi di complessi a base di argento. Dai dati ricavati si evince che esiste una correlazione tra tipo di legante e grado di internalizzazione dei complessi, infatti il 12 e il 14, contenenti leganti a maggiore lipofilia, risultano

Conclusioni

essere maggiormente internalizzati rispetto al complesso 13 contenete la fosfina idrofilica PTA, e che viene internalizzato meno efficacemente e ciò potrebbe giustificare, almeno in parte, la minore attività antiproliferativa.

In precedenti studi è stato dimostrato come i complessi a base di argento esercitino il loro effetto antiproliferativo andando a modificare lo stato redox cellulare, per questo motivo si è studiata la capacità dei complessi in esame di interferire con il funzionamento di enzimi deputati al mantenimento dell'equilibrio redox cellulare (Gandin et al. 2013).

L'attività inibitoria nei confronti della tioredossina riduttasi è stata valutata sia in sistema *cell-free*, che in lisato cellulare; in entrambi i casi, tutti i complessi si sono dimostrati capaci di ridurre l'attività enzimatica confermando che anche per questa classe di complessi di Ag il sistema tioredossinico rappresenta il principale *target* molecolare. Di particolare interesse è il trattamento delle cellule U1285 con il complesso 14 che, in lisato cellulare ed in condizioni equitossiche, ha promosso un'inibizione della TrxR in misura maggiore (74%) rispetto ad Auranofin (65%), noto inibitore a base metallica di questo enzima.

Lo studio degli effetti conseguenti all'inibizione della TrxR ha attestato che, l'azione dei complessi di argento sull'enzima ha comportato un danno mitocondriale come conseguenza di uno sbilanciamento dello stato redox cellulare; infatti, tutti i complessi alle concentrazioni utilizzate, si sono dimostrati in grado di favorire un aumento dei livelli basali di specie reattive dell'ossigeno che è stato confermato dall'osservazione di una significativa riduzione dei gruppi tiolici ridotti cellulari, e di una marcata deplezione del potenziale di membrana mitocondriale.

Infine, da osservazioni al microscopio a fluorescenza dopo colorazione con Hoechst 33258, è emerso che il trattamento con i complessi in esame promuove l'attivazione di un processo di morte cellulare programmato per apoptosi. Ciò è dovuto al fatto che, l'inibizione della TrxR, alterando lo stato redox cellulare e alterando la permeabilità di membrana porta al rilascio di fattori pro-apoptotici, quali il citocromo c, che attivano le caspasi.

Alla luce dei risultati ottenuti, sarebbe interessante approfondire gli studi su colture cellulari tridimensionali *in vitro* in quanto risultano più predittive dell'attività

antitumorale perché permettono di mimare la crescita fisiologica *in vivo* del tumore. Inoltre, per determinare l'indice di selettività dei vari complessi di Ag(I), sarebbe importante valutare la citotossicità su linee cellulari non tumorali.

Dato che i risultati ottenuti in questo lavoro di tesi indicano che anche per questa classe di complessi eterolettici di Ag la TrxR rappresenta il principale target molecolare, sarà importante valutare la loro capacità di interferire con l'attività di altri enzimi coinvolti nel bilancio redox cellulare, come la glutatione reduttasi (GR) e la glutatione perossidasi (GPx) al fine di indagarne il grado di selettività verso la TrxR.

L'inibizione selettiva della TrxR risulta essere un aspetto fondamentale in quanto, essendo sovraespressa in diverse forme tumorali, permette di generare una notevole diminuzione delle difese antiossidanti, esponendo la cellula ad un maggiore stress ossidativo.

6 BIBLIOGRAFIA

Alexander, J. W. (2009) History of the medical use of silver. *Surg Infect (Larchmt)*, 10, 289-92.

Amable, L. (2016) Cisplatin resistance and opportunities for precision medicine. *Pharmacol Res*, 106, 27-36.

Arner, E. S. & A. Holmgren. 2006. The thioredoxin system in cancer. In *Seminars in cancer biology*, 420-426. Elsevier.

Arnesano, F. & G. Natile (2009) Mechanistic insight into the cellular uptake and processing of cisplatin 30 years after its approval by FDA. *Coordination Chemistry Reviews*, 253, 2070-2081.

Arner, E. S. & A. Holmgren (2000) Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. *European journal of biochemistry*, 267, 6102-6109.

Banti, C. N. & S. K. Hadjikakou (2013) Anti-proliferative and anti-tumor activity of silver(i) compounds. *Metallomics*, 5, 569-596.

Banti, C. N., L. Kyros, G. D. Geromichalos, N. Kourkoumelis, M. Kubicki & S. K. Hadjikakou (2014) A novel silver iodide metallo-drug: experimental and computational modelling assessment of its interaction with intracellular DNA, lipoxygenase and glutathione. *Eur J Med Chem*, 77, 388-99.

Barabas, K., R. Milner, D. Lurie & C. Adin (2008) Cisplatin: a review of toxicities and therapeutic applications. *Vet Comp Oncol*, 6, 1-18.

Berggren, M., A. Gallegos, J. R. Gasdaska, P. Y. Gasdaska, J. Warneke & G. Powis (1996) Thioredoxin and thioredoxin reductase gene expression in human tumors and cell lines, and the effects of serum stimulation and hypoxia. *Anticancer Res*, 16, 3459-66.

Berners-Price, S. J., R. K. Johnson, A. J. Giovenella, L. F. Faucette, C. K. Mirabelli & P. J. Sadler (1988) Antimicrobial and anticancer activity of tetrahedral, chelated, diphosphine silver(I) complexes: comparison with copper and gold. *J Inorg Biochem*, 33, 285-95.

Bertinato, J., L. Cheung, R. Hoque & L. J. Plouffe (2010) Ctr1 transports silver into mammalian cells. *J Trace Elem Med Biol*, 24, 178-84.

Boucher, L. J. (1989) Advanced Inorganic Chemistry, Fifth Edition (Cotton, Albert F.; Wilkinson, Geoffrey). *Journal of Chemical Education*, 66, A104.

Bibliografia

Britvin, S. N. & A. Lotnyk (2015) Water-Soluble Phosphine Capable of Dissolving Elemental Gold: The Missing Link between 1,3,5-Triaza-7-phosphaadamantane (PTA) and Verkade's Ephemeral Ligand. *J Am Chem Soc*, 137, 5526-35.

Brown, T. L. & K. J. Lee (1993) Ligand steric properties. *Coordination Chemistry Reviews*, 128, 89-116.

Bruijninx, P. C. & P. J. Sadler (2008) New trends for metal complexes with anticancer activity. *Curr Opin Chem Biol*, 12, 197-206.

Burger, H., W. J. Loos, K. Eechoute, J. Verweij, R. H. Mathijssen & E. A. Wiemer (2011) Drug transporters of platinum-based anticancer agents and their clinical significance. *Drug Resist Updat*, 14, 22-34.

Burma, S. & D. J. Chen (2004) Role of DNA-PK in the cellular response to DNA double-strand breaks. *DNA Repair (Amst)*, 3, 909-18.

Carver, P. L. (2019) Metals in Medicine: The Therapeutic Use of Metal Ions in the Clinic. *Met Ions Life Sci*, 19.

Cepeda, V., M. A. Fuertes, J. Castilla, C. Alonso, C. Quevedo & J. M. Pérez (2007) Biochemical mechanisms of cisplatin cytotoxicity. *Anticancer Agents Med Chem*, 7, 3-18.

Cohen, S., I. Bruchim, D. Graiver, Z. Evron, V. Oron-Karni, M. Pasmanik-Chor, R. Eitan, J. Bernheim, H. Levavi, A. Fishman & E. Flescher (2013) Platinum-resistance in ovarian cancer cells is mediated by IL-6 secretion via the increased expression of its target cIAP-2. *J Mol Med (Berl)*, 91, 357-68.

Daigle, D., T. Decuir, J. Robertson & D. Darensbourg. 2007. Inorganic Syntheses, Volume 32. 40-45.

Darensbourg, D. J., C. G. Ortiz & J. C. Yarbrough (2003) Synthesis and Structures of Nickel and Palladium Salicylaldiminato 1,3,5-Triaza-7-phosphaadamantane (PTA) Complexes. *Inorganic Chemistry*, 42, 6915-6922.

Dedon, P. C. & R. F. Borch (1987) Characterization of the reactions of platinum antitumor agents with biologic and nonbiologic sulfur-containing nucleophiles. *Biochem Pharmacol*, 36, 1955-64.

Dilruba, S. & G. V. Kalayda (2016) Platinum-based drugs: past, present and future. *Cancer Chemother Pharmacol*, 77, 1103-24.

Dong, Z., Y. Wang, C. Wang, H. Xu, L. Guan, Z. Li & F. Li (2015) Self-Assembly of the Second Transmembrane Domain of hCtr1 in Micelles and Interaction with Silver Ion. *J Phys Chem B*, 119, 8302-12.

Du, X., H. Li, X. Wang, Q. Liu, J. Ni & H. Sun (2013) Kinetics and thermodynamics of metal binding to the N-terminus of a human copper transporter, hCTR1. *Chem Commun (Camb)*, 49, 9134-6.

Eisses, J. F. & J. H. Kaplan (2002) Molecular characterization of hCTR1, the human copper uptake protein. *J Biol Chem*, 277, 29162-71.

Fang, J., J. Lu & A. Holmgren (2005) Thioredoxin reductase is irreversibly modified by curcumin: a novel molecular mechanism for its anticancer activity. *J Biol Chem*, 280, 25284-90.

Florea, A. M. & D. Büsselberg (2011) Cisplatin as an anti-tumor drug: cellular mechanisms of activity, drug resistance and induced side effects. *Cancers (Basel)*, 3, 1351-71.

Foye, W. O. 2008. *Foye's principles of medicinal chemistry*. Lippincott williams & wilkins.

Freake, R. (1969) Should time and temperature be quality controlled? *Am J Med Technol*, 35, 345-52.

Frezza, M., S. Hindo, D. Chen, A. Davenport, S. Schmitt, D. Tomco & Q. P. Dou (2010) Novel metals and metal complexes as platforms for cancer therapy. *Curr Pharm Des*, 16, 1813-25.

Friberg, L. E. & M. O. Karlsson (2003) Mechanistic models for myelosuppression. *Invest New Drugs*, 21, 183-94.

Friedman, E. (2007) Mirk/Dyrk1B in cancer. *J Cell Biochem*, 102, 274-9.

Galluzzi, L., L. Senovilla, I. Vitale, J. Michels, I. Martins, O. Kepp, M. Castedo & G. Kroemer (2012) Molecular mechanisms of cisplatin resistance. *Oncogene*, 31, 1869-83.

Gandin, V. & A. P. Fernandes (2015) Metal- and Semimetal-Containing Inhibitors of Thioredoxin Reductase as Anticancer Agents. *Molecules*, 20, 12732-56.

Gandin, V., M. Pellei, M. Marinelli, C. Marzano, A. Dolmella, M. Giorgetti & C. Santini (2013) Synthesis and in vitro antitumor activity of water soluble

Bibliografia

sulfonate- and ester-functionalized silver(I) N-heterocyclic carbene complexes. *J Inorg Biochem*, 129, 135-44.

Gately, D. P. & S. B. Howell (1993) Cellular accumulation of the anticancer agent cisplatin: a review. *Br J Cancer*, 67, 1171-6.

Gillet, L. C. & O. D. Schärer (2006) Molecular mechanisms of mammalian global genome nucleotide excision repair. *Chem Rev*, 106, 253-76.

Gius, D., A. Botero, S. Shah & H. A. Curry (1999) Intracellular oxidation/reduction status in the regulation of transcription factors NF-kappaB and AP-1. *Toxicol Lett*, 106, 93-106.

Gupta, A. & S. Lutsenko (2009) Human copper transporters: mechanism, role in human diseases and therapeutic potential. *Future Med Chem*, 1, 1125-42.

Hall, M. D., R. A. Alderden, M. Zhang, P. J. Beale, Z. Cai, B. Lai, A. P. Stampfl & T. W. Hambley (2006) The fate of platinum(II) and platinum(IV) anti-cancer agents in cancer cells and tumours. *J Struct Biol*, 155, 38-44.

Hashemy, S. I., J. S. Ungerstedt, F. Zahedi Avval & A. Holmgren (2006) Motexafin gadolinium, a tumor-selective drug targeting thioredoxin reductase and ribonucleotide reductase. *J Biol Chem*, 281, 10691-7.

Hausman, D. M. (2019) What Is Cancer? *Perspect Biol Med*, 62, 778-784.

Hengstler, J. G., J. Lange, A. Kett, N. Dornhöfer, R. Meinert, M. Arand, P. G. Knapstein, R. Becker, F. Oesch & B. Tanner (1999) Contribution of c-erbB-2 and topoisomerase II α to chemoresistance in ovarian cancer. *Cancer research*, 59, 3206-3214.

Hu, J. & E. Friedman (2010) Depleting Mirk Kinase Increases Cisplatin Toxicity in Ovarian Cancer Cells. *Genes Cancer*, 1, 803-811.

Janson, V., A. Johansson & K. Grankvist (2010) Resistance to caspase-8 and -9 fragments in a malignant pleural mesothelioma cell line with acquired cisplatin-resistance. *Cell Death Dis*, 1, e78.

Kelland, L. (2007) The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nat Rev Cancer*, 7, 573-84.

Kelland, L. R., S. Y. Sharp, C. F. O'Neill, F. I. Raynaud, P. J. Beale & I. R. Judson (1999) Mini-review: discovery and development of platinum

complexes designed to circumvent cisplatin resistance. *J Inorg Biochem*, 77, 111-5.

Kroemer, G., G. Mariño & B. Levine (2010) Autophagy and the integrated stress response. *Mol Cell*, 40, 280-93.

Lansdown, A. B. (2002) Silver. I: Its antibacterial properties and mechanism of action. *J Wound Care*, 11, 125-30.

Lee, S., S. M. Kim & R. T. Lee (2013) Thioredoxin and thioredoxin target proteins: from molecular mechanisms to functional significance. *Antioxid Redox Signal*, 18, 1165-207.

Lee, Y. Y., C. H. Choi, I. G. Do, S. Y. Song, W. Lee, H. S. Park, T. J. Song, M. K. Kim, T. J. Kim, J. W. Lee, D. S. Bae & B. G. Kim (2011) Prognostic value of the copper transporters, CTR1 and CTR2, in patients with ovarian carcinoma receiving platinum-based chemotherapy. *Gynecol Oncol*, 122, 361-5.

Lincoln, D. T., E. M. Ali Emadi, K. F. Tonissen & F. M. Clarke (2003) The thioredoxin-thioredoxin reductase system: over-expression in human cancer. *Anticancer Res*, 23, 2425-33.

Luo, Y. & D. Kessel (1997) Initiation of apoptosis versus necrosis by photodynamic therapy with chloroaluminum phthalocyanine. *Photochem Photobiol*, 66, 479-83.

Makovec, T. (2019) Cisplatin and beyond: molecular mechanisms of action and drug resistance development in cancer chemotherapy. *Radiol Oncol*, 53, 148-158.

Marx, D. E. & D. J. Barillo (2014) Silver in medicine: the basic science. *Burns*, 40 Suppl 1, S9-S18.

Marzano, C., V. Gandin, A. Folda, G. Scutari, A. Bindoli & M. P. Rigobello (2007) Inhibition of thioredoxin reductase by auranofin induces apoptosis in cisplatin-resistant human ovarian cancer cells. *Free Radic Biol Med*, 42, 872-81.

Marzano, C., M. Pellei, F. Tisato & C. Santini (2009) Copper complexes as anticancer agents. *Anticancer Agents Med Chem*, 9, 185-211.

McKeage, M. J., P. Papathanasiou, G. Salem, A. Sjaarda, G. F. Swiegers, P. Waring & S. B. Wild (1998) Antitumor activity of gold(i), silver(i) and

Bibliografia

copper(i) complexes containing chiral tertiary phosphines. *Met Based Drugs*, 5, 217-23.

McQuitty, R. J. (2014) Metal-based drugs. *Sci Prog*, 97, 1-19.

Medici, S., M. Peana, V. M. Nurchi & M. A. Zoroddu (2019) Medical Uses of Silver: History, Myths, and Scientific Evidence. *J Med Chem*, 62, 5923-5943.

Mijnendonckx, K., N. Leys, J. Mahillon, S. Silver & R. Van Houdt (2013) Antimicrobial silver: uses, toxicity and potential for resistance. *Biometals*, 26, 609-21.

Mjos, K. D. & C. Orvig (2014) Metallodrugs in medicinal inorganic chemistry. *Chem Rev*, 114, 4540-63.

Nguyen, P., R. T. Awwad, D. D. Smart, D. R. Spitz & D. Gius (2006) Thioredoxin reductase as a novel molecular target for cancer therapy. *Cancer Lett*, 236, 164-74.

Ono, A., S. Cao, H. Togashi, M. Tashiro, T. Fujimoto, T. Machinami, S. Oda, Y. Miyake, I. Okamoto & Y. Tanaka (2008) Specific interactions between silver(I) ions and cytosine-cytosine pairs in DNA duplexes. *Chem Commun (Camb)*, 4825-7.

Ono, A., H. Torigoe, Y. Tanaka & I. Okamoto (2011) Binding of metal ions by pyrimidine base pairs in DNA duplexes. *Chem Soc Rev*, 40, 5855-66.

Onodera, T., I. Momose & M. Kawada (2019) Potential Anticancer Activity of Auranofin. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 67, 186-191.

Orvig, C. & M. J. Abrams (1999) Medicinal inorganic chemistry: introduction. *Chem Rev*, 99, 2201-4.

Pettinari, C., F. Marchetti, G. Lupidi, L. Quassinti, M. Bramucci, D. Petrelli, L. A. Vitali, M. F. C. Guedes da Silva, L. M. D. R. S. Martins, P. Smoleński & A. J. L. Pombeiro (2011) Synthesis, Antimicrobial and Antiproliferative Activity of Novel Silver(I) Tris(pyrazolyl)methanesulfonate and 1,3,5-Triaza-7-phosphadamantane Complexes. *Inorganic Chemistry*, 50, 11173-11183.

Porchia, M., F. Benetollo, F. Refosco, F. Tisato, C. Marzano & V. Gandin (2009) Synthesis and structural characterization of copper(I) complexes bearing N-methyl-1,3,5-triaza-7-phosphadamantane (mPTA): cytotoxic activity evaluation of a series of water soluble Cu(I) derivatives containing PTA, PTAH and mPTA ligands. *J Inorg Biochem*, 103, 1644-51.

Powis, G. & D. Kirkpatrick (2007) Thioredoxin signaling as a target for cancer therapy. *Current opinion in pharmacology*, 7, 392-7.

Puckett, C. A., R. J. Ernst & J. K. Barton (2010) Exploring the cellular accumulation of metal complexes. *Dalton Trans*, 39, 1159-70.

Rabik, C. A. & M. E. Dolan (2007) Molecular mechanisms of resistance and toxicity associated with platinating agents. *Cancer Treat Rev*, 33, 9-23.

Ren, J. H., W. S. He, L. Nong, Q. Y. Zhu, K. Hu, R. G. Zhang, L. L. Huang, F. Zhu & G. Wu (2010) Acquired cisplatin resistance in human lung adenocarcinoma cells is associated with enhanced autophagy. *Cancer Biother Radiopharm*, 25, 75-80.

Rigobello, M. P., G. Scutari, R. Boscolo & A. Bindoli (2002) Induction of mitochondrial permeability transition by auranofin, a gold(I)-phosphine derivative. *Br J Pharmacol*, 136, 1162-8.

Roy, P. S. & B. J. Saikia (2016) Cancer and cure: A critical analysis. *Indian J Cancer*, 53, 441-442.

Santini, C., M. Pellei, V. Gandin, M. Porchia, F. Tisato & C. Marzano (2014) Advances in copper complexes as anticancer agents. *Chem Rev*, 114, 815-62.

Santini, C., M. Pellei, G. Papini, B. Morresi, R. Galassi, S. Ricci, F. Tisato, M. Porchia, M. P. Rigobello, V. Gandin & C. Marzano (2011) In vitro antitumour activity of water soluble Cu(I), Ag(I) and Au(I) complexes supported by hydrophilic alkyl phosphine ligands. *J Inorg Biochem*, 105, 232-40.

Scudiero, D. A., R. H. Shoemaker, K. D. Paull, A. Monks, S. Tierney, T. H. Nofziger, M. J. Currens, D. Seniff & M. R. Boyd (1988) Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer Res*, 48, 4827-33.

Shen, D. W., L. M. Pouliot, M. D. Hall & M. M. Gottesman (2012) Cisplatin resistance: a cellular self-defense mechanism resulting from multiple epigenetic and genetic changes. *Pharmacol Rev*, 64, 706-21.

Siddik, Z. H. (2003) Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene*, 22, 7265-79.

Smoleński, P., S. W. Jaros, C. Pettinari, G. Lupidi, L. Quassinti, M. Bramucci, L. A. Vitali, D. Petrelli, A. Kochel & A. M. Kirillov (2013) New

Bibliografia

water-soluble polypyridine silver(I) derivatives of 1,3,5-triaza-7-phosphaadamantane (PTA) with significant antimicrobial and antiproliferative activities. *Dalton Trans*, 42, 6572-81.

Snelders, D. J., G. van Koten & R. J. Klein Gebbink (2011) Steric, electronic, and secondary effects on the coordination chemistry of ionic phosphine ligands and the catalytic behavior of their metal complexes. *Chemistry*, 17, 42-57.

Sternberg, M., C. H. Suresh & F. Mohr (2010) 2-Thia-1,3,5-triaza-7-phosphaadamantane-2,2-dioxide Revisited: Computational and Experimental Studies of a Neglected Phosphine. *Organometallics*, 29, 3922-3929.

Thati, B., A. Noble, B. S. Creaven, M. Walsh, M. McCann, M. Devereux, K. Kavanagh & D. A. Egan (2009) Role of cell cycle events and apoptosis in mediating the anti-cancer activity of a silver(I) complex of 4-hydroxy-3-nitrocoumarin-bis(phenanthroline) in human malignant cancer cells. *Eur J Pharmacol*, 602, 203-14.

Tonissen, K. F. & G. Di Trapani (2009) Thioredoxin system inhibitors as mediators of apoptosis for cancer therapy. *Mol Nutr Food Res*, 53, 87-103.

Valadez, T. N., J. R. Norton & M. C. Neary (2015) Reaction of Cp*(Cl)M(Diene) (M = Ti, Hf) with Isonitriles. *J Am Chem Soc*, 137, 10152-5.

Vistica, D. T., P. Skehan, D. Scudiero, A. Monks, A. Pittman & M. R. Boyd (1991) Tetrazolium-based assays for cellular viability: a critical examination of selected parameters affecting formazan production. *Cancer Res*, 51, 2515-20.

Wang, D. & S. J. Lippard (2005) Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nat Rev Drug Discov*, 4, 307-20.

Welsh, S. J., W. T. Bellamy, M. M. Briehl & G. Powis (2002) The redox protein thioredoxin-1 (Trx-1) increases hypoxia-inducible factor 1 α protein expression: Trx-1 overexpression results in increased vascular endothelial growth factor production and enhanced tumor angiogenesis. *Cancer Res*, 62, 5089-95.

Wyllie, A. H., J. F. Kerr & A. R. Currie (1980) Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol*, 68, 251-306.

Young, R. N. (1999) Inhibitors of 5-lipoxygenase: a therapeutic potential yet to be fully realized? *European Journal of Medicinal Chemistry*, 34, 671-685.

Zhang, C. X. & S. J. Lippard (2003) New metal complexes as potential therapeutics. *Curr Opin Chem Biol*, 7, 481-9.

Zisowsky, J., S. Koegel, S. Leyers, K. Devarakonda, M. U. Kassack, M. Osmak & U. Jaehde (2007) Relevance of drug uptake and efflux for cisplatin sensitivity of tumor cells. *Biochem Pharmacol*, 73, 298-307.