

Metal·locarborans i biologia molecular: la sorprenent interacció de dos mons aparentment independents

Metallacarboranes and molecular biology: the striking interaction of two apparently independent worlds

Màrius Tarrés,¹ Elisabetta Canetta,² Clara Viñas,¹ Francesc Teixidor¹ i Adrian J. Harwood²

¹ Institut de Ciència de Materials de Barcelona (ICMAB-CSIC)

² Cardiff University. School of Biosciences

Resum: La capacitat d'autoassemblatge dels metal·locarborans ha estat molt investigada recentment. La seva habilitat per formar membranes monocapa ens induí a l'estudi de la interacció d'aquestes membranes sintètiques amb membranes biològiques. Aquest treball evidencia que l'anió cobaltabisdicarballur, $[3,3'\text{-Co}(\text{C}_2\text{B}_9\text{H}_{11})_2]^-$ (COSAN), i el seu derivat diiodat, $[3,3'\text{-Co}(8\text{-I-C}_2\text{B}_9\text{H}_{10})_2]^-$ ($\text{I}_2\text{-COSAN}$), poden interaccionar amb membranes biològiques i creuar-les, de manera que s'acumulen a l'interior de cèl·lules vives. En aplicar aquests compostos a diferents tipus de cèl·lules en cultiu, s'indueix una inhibició completa, però alhora reversible, de la proliferació cel·lular, amb una recuperació total de l'activitat de divisió cel·lular un cop extret el metal·locarborà del medi.

Paraules clau: Metal·locarborans, membranes sintètiques, autoassemblatge, divisió cel·lular, proliferació cel·lular, microscòpia Raman.

Abstract: Metallacarborane's self-assembly has been recently widely investigated. Its ability to form monolayer membranes led us to study the interaction of these synthetic membranes with biological membranes. This work evidences that the cobaltabisdicarbollide anion, $[3,3'\text{-Co}(\text{C}_2\text{B}_9\text{H}_{11})_2]^-$ (COSAN), and its di-iodinated derivative, $[3,3'\text{-Co}(8\text{-I-C}_2\text{B}_9\text{H}_{10})_2]^-$ ($\text{I}_2\text{-COSAN}$), can interact with biological membranes and cross them, accumulating inside living cells. When applying these compounds to different cells in culture, complete but reversible cell proliferation suppression is induced, with a total recovery of the cell division activity after removal of the metallacarborane from the media.

Keywords: Metallacarboranes, synthetic membranes, self-assembly, cellular division, cellular proliferation, Raman microscopy.

Introducció

Les membranes biològiques defineixen els límits de les cèl·lules i creen barreres vers l'exterior o entre compartiments cel·lulars interns. La seva integritat és essencial per al control i la distribució d'ions, biomolècules i metabòlits. Aquest comportament i/o aquesta naturalesa suposen un repte prou important pel que fa a la introducció o penetració de materials no naturals a l'interior de les cèl·lules. Totes les membranes biològiques estan formades per l'autoassemblatge de lípids, de manera que el cap polar queda exposat a l'ambient aquós tant extern com intern de la cèl·lula, mentre que les cues lipofíliques queden a la part interna de la membrana, amb la qual cosa es crea una barrera hidrofòbica (bicapa lipídica) [1]. El control del flux biomolecular a través i a l'interior de la membrana és un element fo-

namental per als processos reguladors de les mateixes cèl·lules, i aquest és assolit mitjançant canals de transport proteics (proteïnes de membrana). A més a més, la complexitat del mecanisme de funcionament de les membranes cel·lulars es veu incrementada per la presència de diversos components lipídics de membrana, que confereixen a aquesta diverses propietats fisicoquímiques, com són el gruix de membrana, la velocitat de difusió lateral, la curvatura, etc. [2].

L'habilitat de formar membranes no està limitada als lípids amb cap polar. La família de compostos inorgànics anàlegs als metal·locens, els metal·locarborans, també s'han erigit recentment com a agents capaços de formar agregats [3a, b], vesícules [3c] i membranes sintètiques [3d] en solució aquosa. Estructuralment, són molt diferents de les molècules lipídiques convencionals: estan formats per un àtom metàl·lic central amb dues semiunitats de carboranil, la qual cosa forma una molècula de tipus sandvitx. En aquest treball s'estudiaran l'anió cobaltabisdicarballur, $[\text{Co}(\text{C}_2\text{B}_9\text{H}_{11})_2]^-$, anomenat COSAN (de l'anglès *CO*lalt *SAN*dwich), i el seu derivat diiodat, $[3,3'\text{-Co}(8\text{-I-C}_2\text{B}_9\text{H}_{10})_2]^-$, anomenat $\text{I}_2\text{-COSAN}$ (figura 1) [4].

Correspondència: Francesc Teixidor
Institut de Ciència de Materials de Barcelona (ICMAB-CSIC)
Campus de la UAB, Bellaterra. 08193 Cerdanyola del Vallès
Tel.: +34 935 801 853. Fax: +34 935 805 729
A/e: teixidor@icmab.es

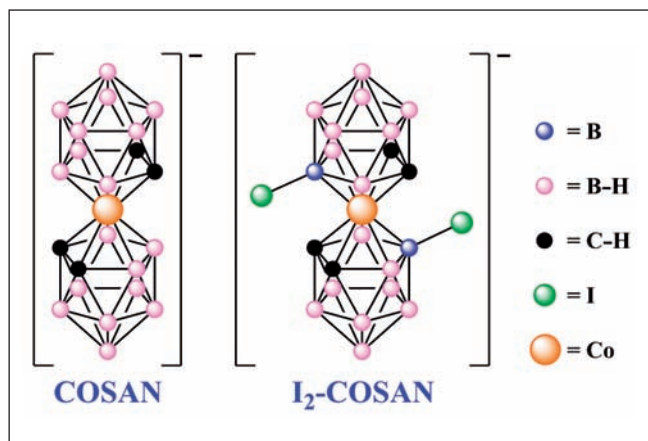


FIGURA 1. Representació esquemàtica del COSAN i el I₂-COSAN.

Cal subratllar que en tots els casos s'utilitza la sal potàssica del corresponent metal·locarborà, fet que permet solubilitzar-lo en medis aquosos. En el seu estat natural, són monoaniònics amb la càrrega dispersa per tota la molècula [5]. Els seus vèrtexs B-H i C-H lleugerament polaritzats permeten interaccions B-H...H-C intermoleculars [6], la qual cosa afavoreix l'autoassemblatge prèviament esmentat [3]. A més a més, aquests compostos presenten una gran estabilitat tant tèrmica com química.

A diferència dels lípids, les molècules de COSAN formen nanovesícules de monocapa a baixes concentracions en solució aquosa, i per sobre d'una concentració d'agregació crítica (cac_{mic}) donen lloc a micel·les [3c]. Aquestes propietats obren un ventall de possibilitats basades en la pregunta següent: com interactuarien aquestes membranes sintètiques en presència dels seus anàlegs lipídics?

Cèl·lules estudiades

A fi de dur a terme un estudi rigorós del possible efecte dels metal·locarborans sobre cèl·lules vives, s'ha analitzat un seguit de famílies cel·lulars per poder tenir una visió més àmplia i global de la possible interacció. Per fer això, s'han emprat cèl·lules de tipus ameba, de mamífers i alguns bacteris. Cadascun d'aquests tipus cel·lulars ha estat tractat amb els seus respectius medis de cultiu cel·lular adequats, inclosos el control de la temperatura d'incubació, la humitat relativa, el percentatge de CO₂, etc., per tal de garantir la viabilitat de les cèl·lules. A continuació, es detallen els set tipus diferents de cèl·lules emprades en l'estudi, amb una breu

descripció de les seves característiques o propietats més importants:

Cèl·lules d'amebes

D'aquesta família es va analitzar la *Dictyostelium discoideum*. Es tracta d'una cèl·lula eucariota amb uns cicles vitals molt ben definits, que va d'una organització unicel·lular a una entitat multicel·lular, per acabar formant espores. Té un cicle de vida asexual consistent en quatre etapes: vegetativa, agregació, migració i culminació. Aquestes cèl·lules són capaces de moure's, comunicar-se químicament i desenvolupar-se, fets aplicables a l'estudi del càncer en humans. La simplicitat del seu cicle vital fa d'aquesta espècie cel·lular un bon model d'estudi genètic, cel·lular i de processos bioquímics en altres organismes.

Cèl·lules de mamífers

Cèl·lules eucariotes presents a tots els mamífers. Presenten un nucli cel·lular clarament diferenciat i delimitat per una bicapa lipídica porosa, que conté al seu interior tot el seu material hereditari, fonamentalment, informació genètica. Dins d'aquesta gran família cel·lular, es van estudiar quatre espècies diferents: HEK 293 (línia cel·lular de ronyó d'embrió humà, molt emprada en biologia cel·lular), HeLa (cèl·lules de càncer cervicouteri), THP1 (cèl·lules derivades de leucèmia, de tipus limfoblastoides) i 3T3 (cèl·lules de tipus fibroblasts, obtingudes a partir de teixits d'embrions de ratolins albins suïssos).

Bacteris

Els bacteris són microorganismes unicel·lulars procarïotes que presenten una grandària d'uns pocs micròmetres (generalment, 0,5-5 μm) i de diverses formes, com ara esferes, barres, llevataps o hèlixs. Com que són procarïotes, no tenen un nucli cel·lular definit o diferenciat, ni presenten orgànuls membranosos interns. Generalment, disposen d'una paret cel·lular feta de peptidoglicans. Molts bacteris són mòbils i disposen de flagels o altres sistemes de desplaçament.

D'aquesta extensa família, se n'han estudiat dues de les espècies més conegudes, com són l'*Escherichia coli* (bacteri habi-

tual dels intestins dels animals) i la *Klebsiella pneumoniae* (causant de múltiples malalties infeccioses).

Interacció entre els metal·locarborans i les cèl·lules

Un cop determinades les nostres mostres cel·lulars, ens disposem a fer els experiments de posar en contacte els metal·locarborans amb les diferents cèl·lules vives en cultiu. Les concentracions de treball són variables en funció de cada cèl·lula i es detallaran en els subapartats següents.

Alteracions morfològiques

Una de les primeres conseqüències visibles amb un microscopi és la clara delimitació i l'arrodoniment de la membrana cel·lu-

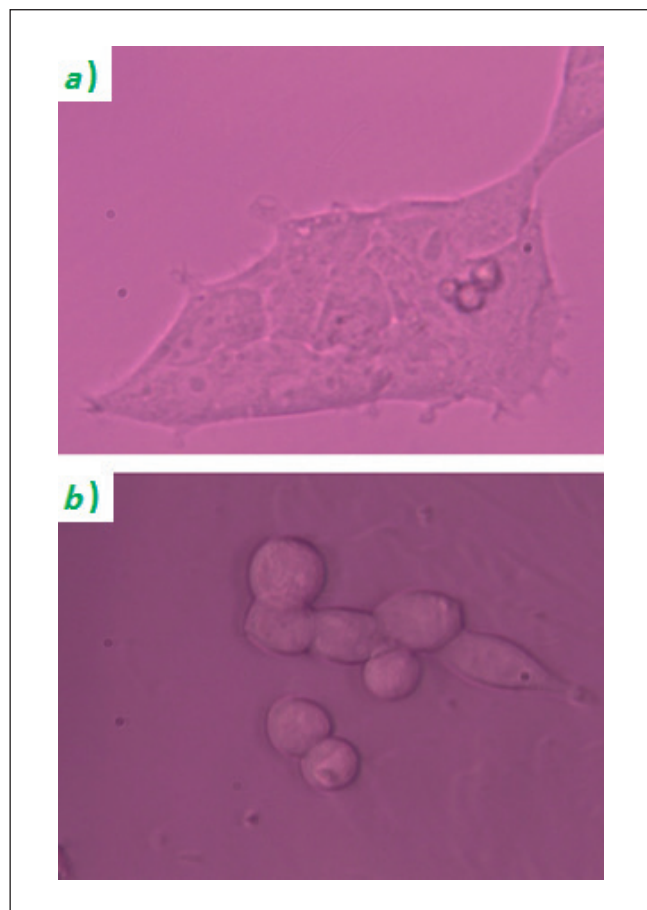


FIGURA 2. Cultiu de cèl·lules HEK 293. a) Cultiu en absència de metal·locarborà. b) Cultiu amb una concentració de 100 µM de COSAN.

lar. La figura 2 mostra una cèl·lula HEK 293 sense metal·locarborà (2a), amb un contorn irregular i no gaire ben definit, mentre que a la foto 2b es mostra el mateix tipus de cèl·lula, però amb una concentració de 100 µM de COSAN en solució. Com es pot apreciar clarament, el contorn cel·lular ara queda perfectament definit i la cèl·lula adopta una forma esfèrica/arrodonida quasi perfecta. Aquest mateix fet s'ha observat a tots els tipus de cèl·lules analitzats en aquest treball.

Malgrat aquest canvi morfològic tan dràstic, no s'aprecia trencament i/o perforació de la membrana cel·lular a conseqüència de l'addició del COSAN. L'estructura externa de la paret cel·lular queda intacta; únicament se n'altera la forma/morfologia [7].

El que resulta encara més sorprenent és que aquest canvi és persistent en el temps i, a més a més, provoca una supressió de l'activitat de divisió cel·lular: el nombre de cèl·lules al medi de cultiu es manté invariable, sense presentar signes o indicis de possibles processos de mitosi cel·lular.

Vist aquest efecte, el primer que s'ha de saber són les concentracions tant de COSAN com de I₂-COSAN a les quals les cèl·lules analitzades presenten aquest efecte.

ED₅₀

Per fer això, ens basem en el valor d'ED₅₀ (de l'anglès *effective dose 50 %*), que correspon a la concentració de metal·locarborà necessària per obtenir un 50 % de resposta del que s'estudia, en aquest cas, la supressió o paràlisi de l'activitat de divisió cel·lular [8].

Es preparen diversos pous de cultiu amb la mateixa densitat cel·lular per a cada tipus de cèl·lula i es fa un recompte per triplicat del nombre d'unitats cel·lulars per ml. Un cop fet això, s'afegeixen diferents concentracions de metal·locarborà (COSAN o I₂-COSAN) als diferents pous de cultiu, anant de 0 a 250 µM, en el nostre cas, i es deixen en les condicions de cultiu durant quatre dies. Al cap d'aquest temps, s'agafen els pous i es fa novament el recompte cel·lular per triplicat. Com es veu clarament a la figura 3, corresponent a cèl·lules HEK 293 tractades amb COSAN i I₂-COSAN independentment, els pous que contenen menys concentració del metal·locarborà són els que presenten un nombre de cèl·lules més gran, se-

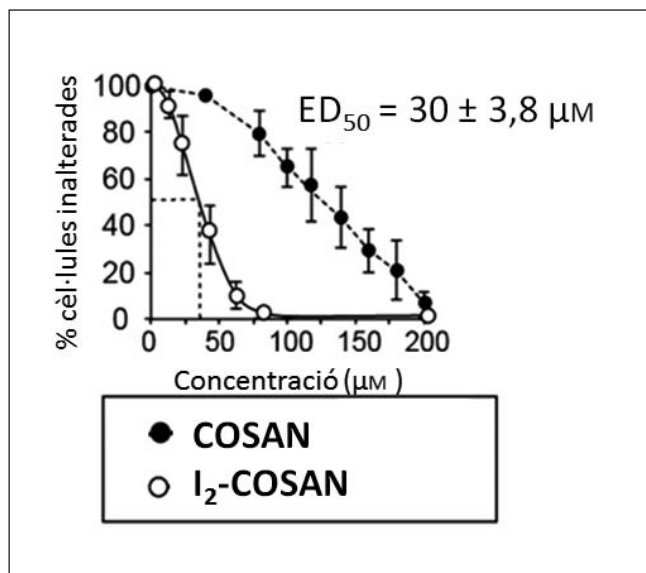


FIGURA 3. Càlcul de l'ED₅₀ del COSAN i el I₂-COSAN per a cèl·lules HEK 293.

guint un patró de divisió cel·lular normal i habitual, mentre que els que han estat en contacte amb una major concentració de metal·locarborà són els que presenten un nombre d'unitats cel·lulars menor. Un cop obtingudes les gràfiques amb les seves corresponents barres d'error, es normalitza el nombre de cèl·lules obtingudes del pou amb 0 μM de metal·locarborà al 100 %, corresponent al creixement cel·lular normal, i es refereix la resta dels pous a aquest darrer en termes percentuals. Així, com es mostra a la figura 3, s'interpola el valor del 50 % a la gràfica i s'obté la concentració a la qual hi ha un 50 % de supressió de la divisió cel·lular (ED₅₀).

D'aquesta manera, la taula 1 mostra les concentracions de metal·locarborà necessàries per a cada tipus cel·lular analitzat. És important remarcar que en tots els casos el I₂-COSAN es mostra més efectiu o potent que el COSAN, és a dir, que es

TAULA 1. Valors d'ED₅₀ per al COSAN i el I₂-COSAN, amb els seus respectius errors, respecte de cadascuna de les cèl·lules estudiades

Cèl·lules	ED ₅₀ COSAN (μM)	ED ₅₀ I ₂ -COSAN (μM)
<i>D. discoideum</i>	2,6 ± 0,3	1,8 ± 0,1
HEK 293	121 ± 3,8	30 ± 3,8
HeLa	157 ± 8,6	23 ± 2,5
THP1	154 ± 8,9	44 ± 6,0
3T3	99 ± 5,5	29 ± 0,8
<i>E. coli</i>	>250	53 ± 5,4
<i>K. pneumoniae</i>	>250	65 ± 4,1

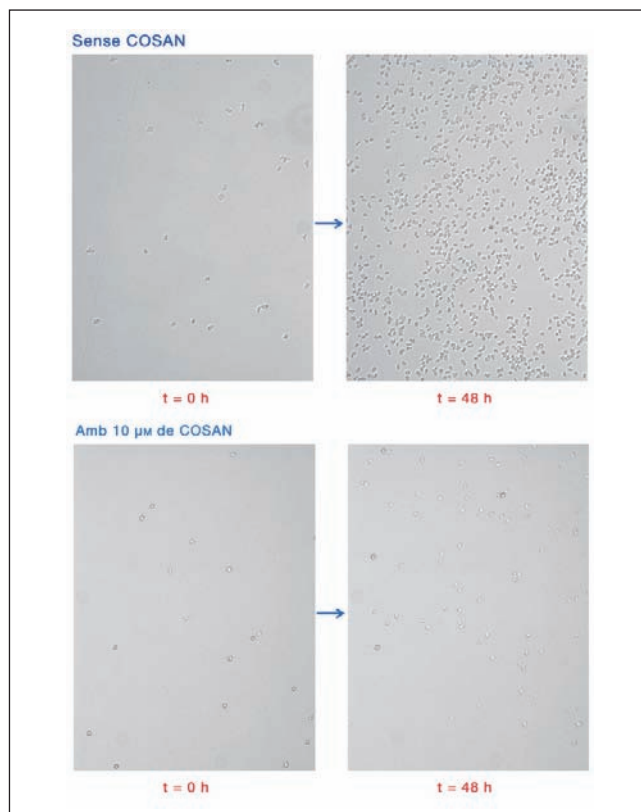


FIGURA 4. Fotografies fetes amb un microscopi de cèl·lules *D. discoideum*. A la part superior, cèl·lules en cultiu sense estar en contacte amb cap metal·locarborà, a temps 0 i al cap de 48 h. A la part inferior, les mateixes cèl·lules en cultiu que contenen una concentració de 10 μM de COSAN, a temps 0 i al cap de 48 h.

necessita menys quantitat/concentració de I₂-COSAN que de COSAN per inferir el mateix efecte sobre cadascuna de les cèl·lules [8]. El motiu pel qual passa això és encara desconegut, però creiem que ha de ser un efecte fisicoquímic relacionat amb les interaccions intermoleculares que es produeixen entre les diferents unitats de metal·locarborà. Sembla bastant evident que tant en l'àmbit estèric com en l'electrònic hi ha molta diferència entre el fet de tenir dos vèrtexs B-H o dos vèrtexs B-I. A més a més, la possibilitat d'interaccions B-H...H-C varia amb la presència o l'absència de vèrtex B-I.

La figura 4 mostra quatre imatges prou significatives. Les dues superiors corresponen a cèl·lules de tipus ameba sense tractar amb metal·locarborà. A la part esquerra es veu una baixa densitat cel·lular corresponent a temps 0. A la dreta es veu el mateix cultiu al cap de 48 h. S'hi pot apreciar clarament l'augment de la densitat de la població cel·lular. Les dues inferiors corresponen a les mateixes cèl·lules tractades amb una solució de 10 μM de COSAN. La de l'esquerra correspon a temps 0 (equivalent a la imatge superior esquerra), on

es veu una baixa densitat cel·lular. La de la dreta correspon a les 48 h, i hi veiem que la densitat cel·lular segueix constant, és a dir, que no hi ha hagut divisió cel·lular apreciable. Es tracta d'una visualització gràfica, així com d'una evidència experimental prou clara, del procés estudiat.

Reactivació de l'activitat de divisió cel·lular

Un cop vist l'efecte de supressió de la divisió cel·lular, dues possibles hipòtesis sorgien sobre aquests fets: o bé les cèl·lules moren, i això explicaria la manca de divisió cel·lular, o bé realment les cèl·lules queden en un estat citostàtic, amb una total manca de reproducció, però vives.

Per resoldre aquest dubte, la solució és meridiana: es tracta simplement de fer un rentatge del medi de cultiu de les cèl·lules amb metal·locarborà, afegir un medi de cultiu nou sense metal·locarborà i veure si les cèl·lules recuperen la seva activitat cel·lular normal. Aquest procés de rentatge es basa a centrifugar les cèl·lules amb el medi de cultiu i el metal·locarborà, decantar la solució (retirant així el compost de bor) i afegir medi «fresc». Aquest procés es repeteix tres vegades consecutives per tal de garantir la total eliminació de qualsevol traça de metal·locarborà al medi.

Un cop fet això, s'ha vist com en tots els casos el nombre de cèl·lules s'incrementa amb el pas del temps, la qual cosa arriba a sobresaturar la població cel·lular i forma teixits cel·lulars al cap d'uns dies. Aquest canvi brusc de comportament de-

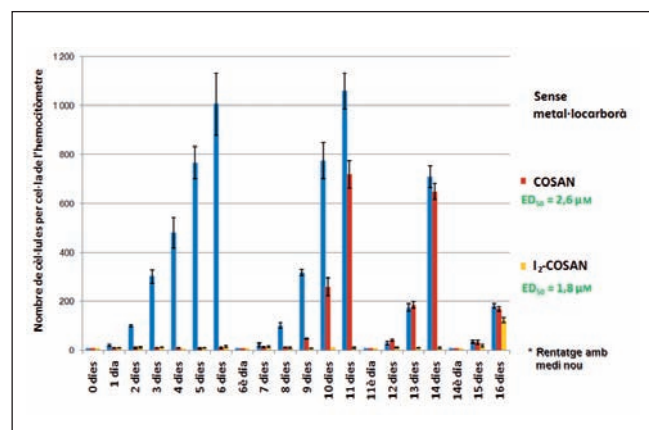


FIGURA 5. Evolució de la densitat cel·lular de tres cultius de cèl·lules d'amebes: un sense metal·locarborà (blau), un altre amb una concentració de 500 µM de COSAN (vermell) i l'últim amb una concentració de 500 µM de I₂-COSAN (groc), amb successives dilucions i rentatges del medi.

mostra que realment els metal·locarborans són els responsables de la supressió momentània de l'activitat de divisió cel·lular i que aquest procés és reversible.

Per certificar aquestes afirmacions, es van deixar les cèl·lules de tipus ameba durant trenta-set dies en medi de cultiu i amb una concentració suficient de I₂-COSAN (el més efectiu/potent) per inhibir l'activitat de divisió cel·lular (10 µM, en aquest cas, ja que l'ED₅₀ és d'1,8 µM). Al cap d'aquests trenta-set dies, la densitat cel·lular era la mateixa que el primer dia: no hi havia hagut ni creixement ni mort cel·lular (apoptosi). Es va fer el rentatge (com s'ha explicat amb anterioritat) i al cap d'un o dos dies el nombre de cèl·lules per ml va augmentar exponencialment, fins a sobresaturar la població cel·lular al cap de poc més d'una setmana. Aquest experiment demostra que, a més a més de la reversibilitat ja esmentada, aquest efecte es produeix durant períodes de temps molt llargs (fins avui dia, s'ha arribat a preservar l'efecte durant trenta-set dies, sense haver-ne trobat encara un límit temporal) sense perdre l'eficiència.

Toxicitat

Un cop demostrada la seva eficiència temporal, també és necessari demostrar la no-toxicitat dels metal·locarborans respecte a les cèl·lules. Per fer això, es fa servir novament un cultiu de cèl·lules de tipus ameba (*D. discoideum*), amb una concentració molt alta de metal·locarborà (500 µM). Sabent que els valors d'ED₅₀ per a les cèl·lules d'amebes són de 2,6 µM per al COSAN i d'1,8 µM per al I₂-COSAN, estem parlant d'una concentració unes dues-cents cinquanta vegades superior al valor d'ED₅₀, un clar excés de metal·locarborà.

Es preparen tres cultius diferents (figura 5), tots amb la mateixa densitat cel·lular: un en absència de metal·locarborà (es prendrà com a referència), un altre amb 500 µM de COSAN i l'últim amb 500 µM de I₂-COSAN, i es deixen créixer durant sis dies. Com era d'esperar, el cultiu sense el compost de bor evoluciona amb normalitat (hi ha divisió cel·lular), mentre que els cultius amb COSAN i I₂-COSAN no presenten creixement cel·lular.

En aquest punt, es fa un rentatge dels tres cultius (amb el mètode de tres rentatges explicat anteriorment), s'afegeix medi de cultiu «fresc» i es dilueix la densitat cel·lular fins a tenir

novament el mateix nombre inicial de cèl·lules. Lògicament, el cultiu que no tenia metal·locarborà torna a créixer amb normalitat. Al cap d'un parell de dies, el cultiu que contenia COSAN comença a presentar activitat de divisió cel·lular. Per la seva banda, el cultiu que contenia I₂-COSAN segueix sense presentar cap tipus d'activitat cel·lular.

Després de l'onzè dia (des de l'inici de l'experiment), es torna a fer un rentatge dels tres cultius i es tornen a diluir els cultius sense metal·locarborà i amb COSAN per igualar novament el nombre de cèl·lules als tres cultius. A partir d'aquest moment, els cultius que no contenien metal·locarborà i el que contenia COSAN ja van aparellats, ja que l'efecte del COSAN ha estat eliminat. El cultiu que contenia el I₂-COSAN segueix sense presentar activitat.

Al catorzè dia, es fa un últim rentatge dels tres cultius. Novament, el cultiu que no contenia metal·locarborà i el que contenia COSAN responen igual pel que fa a l'activitat cel·lular. Finalment, dos dies després del tercer rentatge (setzè dia, en

global), el cultiu que contenia I₂-COSAN comença a presentar activitat de divisió cel·lular, de manera que s'equipara amb el comportament dels altres dos cultius.

Amb aquestes proves, s'han demostrat dos fets de gran importància: a) els metal·locarborans no són tòxics vers les cèl·lules, malgrat estar presents en molt alta concentració; b) el I₂-COSAN, com ja s'ha vist a la taula 1 de valors d'ED₅₀, és més eficient/potent que el COSAN (se'n necessita menys quantitat per aconseguir el mateix efecte). Per tant, si treballem a les mateixes concentracions, és lògic que costi més eliminar la capacitat d'inhibició de divisió cel·lular del I₂-COSAN que la del COSAN, tal com s'ha comprovat experimentalment.

Alteracions químiques dels metal·locarborans

Un últim punt experimental important d'aquest estudi és la comprovació de la no-alteració o modificació química del metal·locarborà. Per fer això, s'agafa una alíquota del cultiu de cèl·lules d'amebes que han estat en contacte amb metal·locarborà durant trenta-set dies (inclosos cèl·lules, medi de cultiu i solució de metal·locarborà) i se n'adquireix l'espectre de masses. A causa de la distribució isotòpica de l'element bor, és molt senzill identificar els pics de l'espectre que corresponen al metal·locarborà, ja que aquests presenten un grup d'entre set i nou senyals intensos en forma gaussiana, amb el seu màxim corresponent al pes molecular (PM) de la mostra analitzada. D'aquesta manera, la figura 6 mostra els espectres de masses del cultiu que contenien COSAN (PM_{teòric} = 323,75 g/mol) i I₂-COSAN (PM_{teòric} = 575,54 g/mol), respectivament, on es pot veure un sol pic clar i net, corresponent al pes molecular teòric de l'aníon pur. Aquesta prova demostra que no hi ha hagut cap tipus de modificació, alteració o fragmentació de la mostra inicial, la qual cosa postula els dos metal·locarborans estudiats com a bons agents de supressió de divisió cel·lular, suficientment robusts i inerts des d'un punt de vista químic.

Penetració dels metal·locarborans a l'interior de les cèl·lules

Un cop vista la reversibilitat de l'efecte que el COSAN i el I₂-COSAN tenen sobre les diferents cèl·lules, és important saber si es tracta d'un procés físic a l'exterior de la membrana cel·lular o si, per contra, el metal·locarborà penetra a l'interior

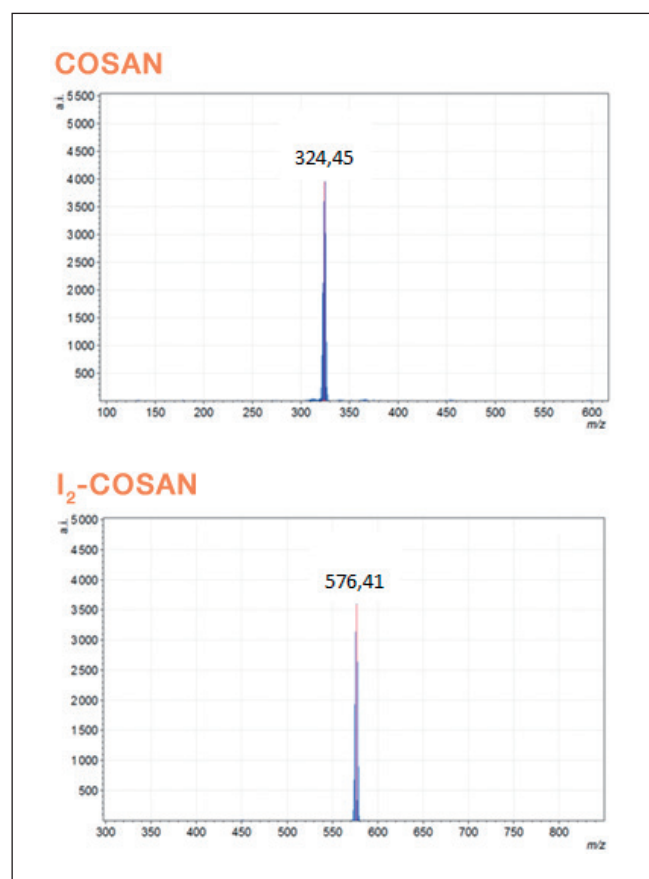


FIGURA 6. Espectre de masses (MALDI-TOF-MS) de les mostres que contenien cèl·lules d'amebes, medi de cultiu i metal·locarborà, tot en solució.

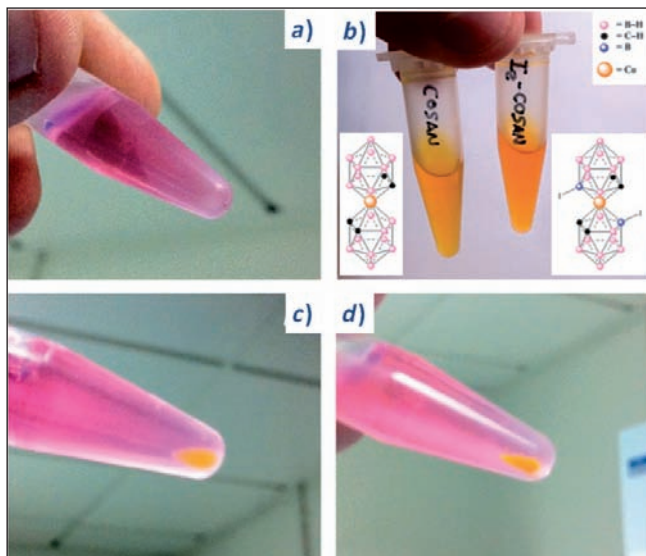


FIGURA 7. a) Cèl·lules HEK 293 en medi de cultiu DMEM. b) Solució de 25 mM de COSAN i I₂-COSAN, respectivament. c) Cèl·lules HEK 293 tractades amb una solució de 25 mM de COSAN, rentades tres vegades i afegint-hi un medi de cultiu nou sense metal·locarborà. d) Idèntic a la imatge c, però emprant una solució de 25 mM de I₂-COSAN, en lloc d'una de COSAN.

de la cèl·lula. Per poder fer aquesta determinació, s'empen les cèl·lules HEK 293.

Visualització directa

La primera prova conclouent que ens il·lustra l'entrada del metal·locarborà a l'interior de les cèl·lules és observable a simple vista (figura 7). La imatge 7a mostra cèl·lules HEK 293 sense cap tipus de tractament (taca blanca a la part inferior de l'Eppendorf) en el seu medi de cultiu comercial habitual (Dulbecco's Modified Eagle Medium, DMEM), de color rosa. La imatge 7b mostra el color taronja habitual dels derivats estudiats del COSAN (25 mM). Les dues imatges inferiors de la figura 7 mostren les mateixes cèl·lules prèviament tractades amb una solució 25 mM de COSAN i 25 mM de I₂-COSAN, respectivament. Un cop tractades, s'han rentat tres vegades mitjançant el mètode de centrifugació i, finalment, se'ls ha afegit un medi de cultiu nou sense metal·locarborà. Com es veu a les fotografies, tant les cèl·lules prèviament tractades amb COSAN (7c) com amb I₂-COSAN (7d) tenen un color taronja molt clar i visible, mentre que al medi de cultiu ja no queda rastre del taronja inicial [9].

D'aquestes imatges es poden treure dues conclusions molt clares: el metal·locarborà penetra a l'interior de les cèl·lules i,

a més a més, aquest és retintut a l'interior malgrat haver rentat les cèl·lules amb un medi de cultiu «fresc».

Microscòpia Raman confocal

L'espectroscòpia Raman ha resultat ser una eina molt útil per visualitzar i quantificar la penetració dels metal·locarborans a l'interior de les cèl·lules [9]. Com que tenen múltiples enllaços B-H, aquests compostos són fàcilment distingibles amb aquesta tècnica (banda de vibració molt intensa a 2570 cm⁻¹), ja que, a més a més, les cèl·lules no contenen aquest tipus d'enllaç ni cap altre enllaç de molècules orgàniques amb vibració en aquesta zona. Per establir les condicions i els límits de detecció de l'aparell Raman, es preparen diverses concentracions de COSAN (2-100 mM) i es mesuren els respectius espectres Raman. Com es veu a la figura 8, el senyal de la vibració B-H és observable a partir d'una concentració de 10 mM. Per assegurar la mesura, s'estableix 25 mM com a concentració suficient per ser fàcil i inequívocament detectable per l'aparell.

Un cop establerts els paràmetres de mesura, s'intenta visualitzar i quantificar la presència de COSAN i I₂-COSAN a l'interior de les cèl·lules mitjançant un microscopi confocal acoblat a un espectròmetre Raman. Aquest aparell permet mesurar l'espectre Raman en un punt concret de l'espai tridimensional, de manera que es pot focalitzar la mesura de l'espectre just a l'interior, a la membrana o a l'exterior de la cèl·lula. Així, s'agafa un nou cultiu de cèl·lules HEK 293 i es mesura l'espectre Raman de l'interior de la cèl·lula (espectre negre de la figura 9). Una bona referència per saber que estem mesurant a l'interior de la cèl·lula a partir de l'espectre de Raman obtingut és el senyal que

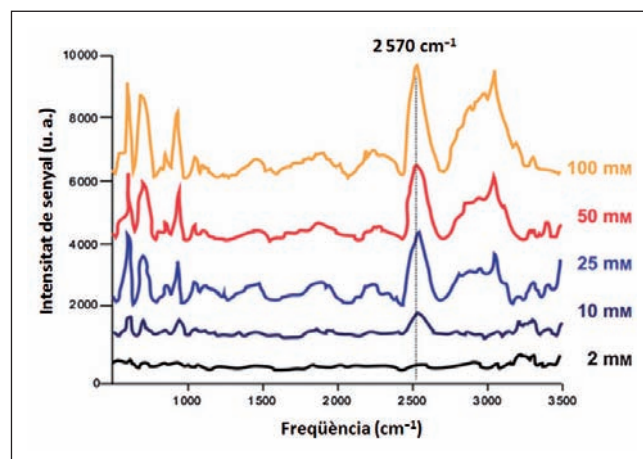


FIGURA 8. Espectre Raman del COSAN a diferents concentracions.

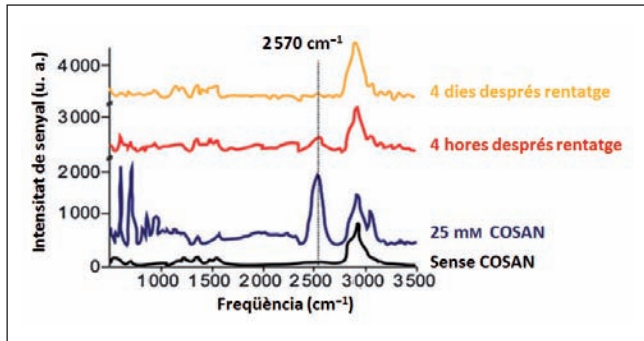


FIGURA 9. Espectres Raman de l'interior d'una cèl·lula HEK: sense COSAN (negre); amb una concentració de 25 mM de COSAN en solució (blau); després de rentar les cèl·lules i deixant-les en un medi de cultiu comercial 4 h (vermell); després de rentar-les per segona vegada i tornant a deixar-les en medi de cultiu durant quatre dies (groc).

apareix a 2950 cm^{-1} , corresponent a la vibració C–H de carbonis amb hibridació sp^3 , molt abundants en membranes i orgànuls interns de les cèl·lules, sovint a causa de les llargues cadenes lipídiques que contenen. Evidentment, l'exterior de la cèl·lula no conté cap tipus de vibració en aquesta zona.

Feta aquesta mesura, les mateixes cèl·lules es deixen en una solució de 25 mM de COSAN o I_2 -COSAN i es mesura novament l'espectre Raman amb el microscopi confocal. Com es veu a l'espectre blau, el pic de 2950 cm^{-1} es manté i un nou pic de gran intensitat a 2570 cm^{-1} apareix (ν B–H).

Finalment, aquestes cèl·lules són rentades tres vegades pel mètode de centrifugació i incubades novament en un medi de cultiu «fresc». A les 4 h d'incubació, es mesura l'espectre novament (espectre vermell) i es veu una clara davallada del pic de 2570 cm^{-1} , conseqüent amb el procés de rentatge, però encara detectable per l'aparell, conseqüentment amb la visualització que s'aprecia a les imatges 7c i 7d, explicades amb anterioritat (s'ha eliminat parcialment el metal·locarborà de l'interior de la cèl·lula). Finalment, es fa un segon rentatge de les cèl·lules seguint el mateix procediment que anteriorment, es deixen les cèl·lules en cultiu durant quatre dies i s'observa que l'espectre Raman de l'interior de la cèl·lula (espectre groc) ja no presenta el senyal de la vibració B–H, cosa que indica la total eliminació del metal·locarborà de l'interior cel·lular (tenint en compte el límit de detecció de l'aparell), la qual cosa demostra novament la reversibilitat del trànsit a través de la membrana cel·lular per part dels metal·locarborans.

Un cop demostrada la penetració i acumulació dels metal·locarborans a l'interior de les cèl·lules i l'efecte citostàtic que

aquells li confereixen, es pot pensar en els possibles efectes terapèutics que poden tenir, com pot ser la teràpia per capturar de neutrons de bor (BNCT) contra el càncer [10].

Distribució del metal·locarborà a l'interior de la cèl·lula

Un cop demostrat que els metal·locarborans penetren a les cèl·lules i són parcialment retinguts a l'interior, malgrat acabar sortint-ne, resulta capital saber quina distribució segueix el metal·locarborà a l'interior de la cèl·lula (homogènia, centrada al nucli, als orgànuls del citoplasma, etc.). Tenint present que el microscopi confocal acoblat a un detector Raman és capaç de mesurar l'espectre Raman d'un punt concret de l'espai, es decideix fer un escombratge (o *mapping*) d'un pla transversal imaginari d'una cèl·lula per tal d'obtenir múltiples espectres de múltiples punts del pla imaginari de la cèl·lula.

A la figura 10 es pot veure, en primer lloc (part esquerra), la imatge de la cèl·lula en contrast de fase (cosa que es veu pel microscopi a simple vista). Les dues imatges del costat corresponen a la mateixa cèl·lula, però irradiant la mostra amb les freqüències de vibració dels enllaços B–H i C–H, 2570 i 2950 cm^{-1} , respectivament. En ambdós casos, les zones de color rosa corresponen a les regions amb una alta concentració de l'enllaç en qüestió, mentre que les zones lila correspo-

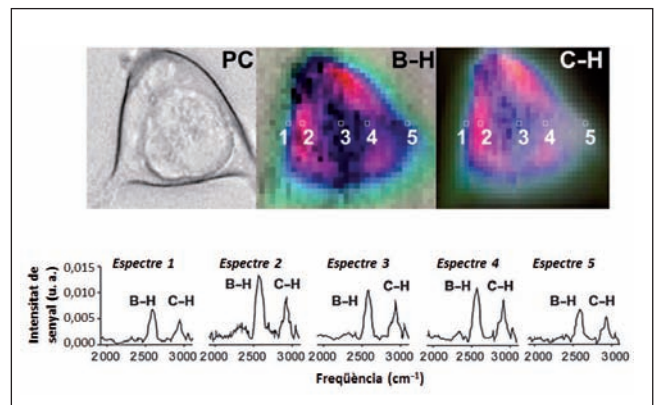


FIGURA 10. A l'esquerra, fotografia de contrast de fase d'una cèl·lula HEK 293, vista des d'un microscopi. Al centre i a la dreta, imatges obtingudes de l'escombratge lineal irradiant a les freqüències de les vibracions B–H i C–H, 2570 i 2950 cm^{-1} , respectivament. Les zones de color rosa corresponen a una alta densitat del senyal buscat, mentre que les zones de color lila corresponen a localitzacions de baixa concentració de la vibració estudiada. A la part inferior, els espectres Raman dels cinc punts del pla de la cèl·lula estudiats.

nen a regions amb una baixa intensitat de l'enllaç. A la part inferior es mostren els espectres de cinc punts concrets de la cèl·lula (als dos extrems de la membrana i tres punts de l'interior de la cèl·lula) per poder veure les intensitats relatives dels pics corresponents als enllaços B–H i C–H.

Com es pot veure, la distribució és completament heterogènia, focalitzada en zones concretes de la cèl·lula. Curiosament, les zones amb més concentració de metal·locarborà (B–H) es correlacionen perfectament amb les zones amb més densitat d'enllaços C–H, fet que ens fa pensar que probablement el metal·locarborà és atret o interactua amb possibles membranes internes de la cèl·lula, o bé amb orgànuls que continguin una certa quantitat d'enllaços C–H (com podrien ser les cadenes lipídiques de les membranes).

Conclusions

Les molècules de COSAN i I₂-COSAN són capaces de travessar la bicapa lipídica de les membranes cel·lulars penetrant a l'interior de les cèl·lules sense alterar-ne la integritat. Un cop a l'interior, s'ha demostrat que ambdues no són citotòxiques, però sí citostàtiques, de manera que produeixen una supressió de l'activitat de divisió cel·lular. La distribució d'aquests metal·locarborans a l'interior de les cèl·lules no és homogènia. Un cop tret el compost del medi cel·lular, s'ha vist com les cèl·lules recuperen la seva activitat reproductiva habitual. S'ha vist també que la concentració necessària de COSAN i I₂-COSAN varia, amb la qual cosa es pot modular l'eficiència del metal·locarborà mitjançant modificacions químiques prèvies.

Els diferents valors d'ED₅₀ per a cada tipus de cèl·lula fan pensar que el mecanisme biològic d'actuació és força complex, amb possibles interaccions entre els metal·locarborans amb components cel·lulars interns encara desconeguts. Aquests fets revelen un nou tipus de biologia a la interfase entre membranes biològiques i sintètiques.

Amb aquests resultats al cap, hom pot pensar en la possible utilització d'aquesta família de compostos en teràpies anti-cancerígenes [10,11], com a possible additiu per al transport i la conservació cel·lular [11], com a possibles fàrmacs o com a base per a sistemes de transport molecular d'altres fàrmacs a l'interior de les cèl·lules.

Agraïments

Aquest treball ha estat finançat pel Ministeri d'Educació i Ciència (MEC) (beca MAT2006-05339) i per la Generalitat de Catalunya (2005/SGR/00709). Màrius Tarrés agraeix també al MEC la beca FPU rebuda per fer el doctorat.

Referències

- [1] SINGER, S. J.; NICOLSON, G. L. «The fluid mosaic model of the structure of cell membranes». *Science*, núm. 175 (1972), p. 720-731.
- [2] a) McMAHON, H. T.; GALLOP, J. L. «Membrane curvature and mechanisms of dynamic cell membrane remodelling». *Nature*, núm. 438 (2005), p. 590-596. b) ANTONNY, B. «Mechanisms of membrane curvature sensing». *Annu. Rev. Biochem.*, núm. 80 (2011), p. 101-123.
- [3] a) MATĚJČEK, P.; CÍGLER, P.; PROCHÁZKA, K.; KRÁL, V. «Molecular assembly of metallacarboranes in water: light scattering and microscopy study». *Langmuir*, núm. 22 (2006), 575-581. b) TARRÉS, M.; VIÑAS, C.; GONZÁLEZ-CARDOSO, P.; HÄNNINEN, M. M.; SILLANPÄÄ, R.; ĐORĐOVIČ, V.; UCHMAN, M.; TEIXIDOR, F.; MATĚJČEK, P. «Aqueous self-assembly and cation selectivity of cobaltabisdicarbollide dianionic dumbbells». *Chem. Eur. J.*, núm. 20 (2014), p. 6786-6794. c) BAUDUIN, P.; PREVOST, S.; FARRÀS, P.; TEIXIDOR, F.; DIAT, O.; ZEMB, T. «A theta-shaped amphiphilic cobalt dicarbollide anion: transition from monolayer vesicles to micelles». *Angew. Chem. Int. Ed.*, núm. 50 (2011), p. 5298-5300. d) BRUSSELLE, D.; BAUDUIN, P.; GIRARD, L.; ZAULET, A.; VIÑAS, C.; TEIXIDOR, F.; LY, I.; DIAT, O. «Lyotropic lamellar phase formed from monolayered θ -shaped carborane-cage amphiphiles». *Angew. Chem. Int. Ed.*, núm. 52 (2013), p. 12114-12118.
- [4] a) HAWTHORNE, M. F.; YOUNG, D. C.; ANDREWS, T. D.; HOWE, D. V.; PILLING, R. L.; PITTS, A. D.; REINTJES, M.; WARREN, L. F.; WEGNER, P. A. « π -dicarbollyl derivatives of the transition metals. Metallocene analogs». *J. Am. Chem. Soc.*, núm. 90 (1968), p. 879-896. b) ROJO, I.; TEIXIDOR, F.; KIVEKÁS, R.; SILLANPÄÄ, R.; VIÑAS, C. «Methylation and dimethylation in cobaltabis(dicarbollide) derivatives». *Organometallics*, núm. 22 (2003), p. 4642-4646. c) HOUSECROFT, C. E. *Encyclopaedia of Inorganic Chemistry*. Nova York: John Wiley & Sons, 2008. d) GRIMES, R. N. *Carboranes*. Burlington: Academic Press, 2011.
- [5] MASSALLES, C.; LLOP, J.; VIÑAS, C.; TEIXIDOR, T. «Extraordinary overoxidation resistance increase in self-doped polypyrroles

by using non-conventional low charge-density anions». *Adv. Mater.*, núm. 14 (2002), p. 826-829.

[6] a) JUÁREZ-PÉREZ, E. J.; NÚÑEZ, R.; VIÑAS, C.; SILLANPÄÄ, R.; TEIXIDOR, F. «The role of C-H...H-B interaction in establishing rotamers configurations in metallabis(dicarbollide) systems». *Eur. J. Inorg. Chem.*, núm. 16 (2010), p. 2385-2392. b) HARDIE, M. J.; RASTON, C. L. «Solid state supramolecular assemblies of charged supermolecules (Na[2.2.2]cryptate)⁺ and anionic carboranes with host cyclotrimeratrylene». *Chem. Commun.*, núm. 10 (2001), p. 905-906. c) VIÑAS, C.; TARRÉS, M.; GONZÁLEZ-CARDOSO, P.; FARRÁS, P.; BAUDUIN, P.; TEIXIDOR, F. «Surfactant behaviour of metallacarboranes. A study based on the electrolysis of water». *Dalton Trans.*, núm. 43 (2014), p. 5062-5068.

[7] BERDIÁ-BÁGUENA, C.; ALCARAZ, A.; AGUILLELLA, V. M.; CIORAN, A. M.; TACHIKAWA, S.; NAKAMURA, H.; TEIXIDOR, F.; VIÑAS, C. «Amphiphilic COSAN and I₂-COSAN crossing synthetic lipid membranes: planar bilayers and liposomes». *Chem. Commun.*, núm. 50 (2014), p. 6700-6703.

[8] TARRÉS, M.; CANETTA, E.; PAUL, E.; FORBES, J.; AZZOUNI, K.; VIÑAS, C.; TEIXIDOR, F.; HARWOOD, A. J. «Biological interaction of COSAN-based synthetic vesicles with living cell». [Article enviat]

[9] TARRÉS, M.; CANETTA, E.; VIÑAS, C.; TEIXIDOR, F.; HARWOOD, A. J. «Imaging in living cells using νB-H Raman spectroscopy: mo-

nitoring COSAN uptake». *Chem. Commun.*, núm. 50 (2014), p. 3370-3372.

[10] a) MARUYAMA, K.; ISHIDA, O.; KASAOKA, S.; TAKIZAWA, T.; UTOGUCHI, N.; SHINOHARA, A.; CHIBA, M.; KOBAYASHI, H.; ERIGUCHI, M.; YANAGIE, H. «Intracellular targeting of sodium mercaptoundecahydrododecaborate (BSH) to solid tumors by transferring-PEG liposomes, for boron neutron-capture therapy (BNCT)». *J. Controlled Release*, núm. 98 (2004), p. 195-207. b) KOGANEI, H.; UENO, M.; TACHIKAWA, S.; TASAKI, L.; BAN, H. S.; SUZUKI, M.; SHIRAIISHI, K.; KAWANO, K.; YOKOYAMA, M.; MAITANI, Y.; ONO, K.; NAKAMURA, H. «Development of high boron content liposomes and their promising antitumor effect for neutron capture therapy of cancers». *Bioconjugate Chem.*, núm. 24 (2013), p. 124-132. c) KUEFFER, P. J.; MAITZ, C. A.; KHAN, A. A.; SCHUSTER, S. A.; SHLYAKHTINA, N. I.; JALISATGI, S. S.; BROCKMAN, J. D.; NIGG, D. W.; HAWTHORNE, M. F. «Boron neutron capture therapy demonstrated in mice bearing EMT6 tumors following selective delivery of boron by rationally designed liposomes». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, núm. 110 (2013), p. 6512-6517.

[11] Dues patents sobre les aplicacions d'aquesta tecnologia han estat registrades i es troben en fase de prepublicació: a) TARRÉS, M.; VIÑAS, C.; TEIXIDOR, F.; HARWOOD, A. J. «Cell storage». GB1306048.8, 2013. b) TARRÉS, M.; VIÑAS, C.; TEIXIDOR, F.; HARWOOD, A. J. «Uses as medicament for treatment of cancer and amoeboid infections». GB1306047.0, 2013.



M. Tarrés



E. Canetta



C. Viñas



F. Teixidor



A. J. Harwood

Màrius Tarrés és llicenciat en ciències químiques (2009) i màster en ciència i tecnologia químiques (2010) per la Universitat Autònoma de Barcelona. Actualment està realitzant una tesi doctoral sobre síntesi de derivats dels metal·locarborans, tot estudiant les seves propietats electroquímiques i les seves possibles aplicacions en biologia molecular, sota la direcció del professor Francesc Teixidor, a l'Institut de Ciència de Materials de Barcelona (ICMAB-CSIC).

Elisabetta Canetta és llicenciada en física per la Universitat de Bolonya, amb un màster en física teòrica nuclear. Obtingué el títol de doctora en biofísica experimental a la Universitat Joseph Fourier de Grenoble (2004). El 2011, s'incorporà a la Universitat de Cardiff com a professora associada de biofotònica. Finalment, el 2013, s'incorporà a la Universitat de St. Mary, també com a professora associada.

Clara Viñas es va llicenciar en químiques per la Universitat Autònoma de Barcelona (1975) i en farmàcia per la Universitat de Barcelona (UB) (1980). Es va doctorar en farmàcia per la UB l'any 1991. L'any 1992, va guanyar una plaça de científica titular del Consell Superior d'Investigacions Científiques a l'ICMAB-CSIC de Barcelona. Va passar a científica titular l'any 2002 i és professora d'investigació des del 2006.

Francesc Teixidor es va llicenciar en químiques per la Universitat Autònoma de Barcelona l'any 1975 i es va doctorar a la mateixa universitat el 1979. L'any 1987, obtingué una plaça d'investigador científic del Consell Superior d'Investigacions Científiques a l'ICMAB-CSIC de Barcelona, i n'és professor d'investigació des de l'any 1999.

Adrian J. Harwood es va llicenciar en zoologia per la Universitat d'Oxford. Obtingué el títol de doctor el 1988 a la Universitat d'Edimburg. El 2001, obtingué el grau de professor associat, i el 2003, el de professor d'investigació per l'Imperial College de Londres. El 2005 es traslladà a la Universitat de Cardiff. Entre el 2009 i el 2013, n'ha estat cap d'Innovació, Associació i Compromís.