



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

***Trabajo de Tesis Doctoral: ESTUDIO DE CITOTOXICIDAD Y
MECANISMOS DE ACCIÓN DE METALOFARMACOS DE RUTENIO Y
COBRE CON POTENCIAL ACTIVIDAD ANTITUMORAL.***

Tesista: Bioquímica María Carolina Ruiz

Directora: Dra. Ana Laura Di Vigilio

Codirector: Dr. Ignacio E. León

Año: 2021



ESTUDIO DE

CITOTOXICIDAD Y

MECANISMOS DE ACCIÓN

DE METALOFARMACOS DE

RUTENIO Y COBRE CON

POTENCIAL ACTIVIDAD

ANTITUMORAL.

TESIS 2021

Tesista: Bioq. Maria Carolina Ruiz

Directora: Dra. Ana Laura Di Virgilio

Codirector: Dr. Igancio E. León



Universidad Nacional de La Plata
Facultad de Ciencias Exactas
Departamento de Ciencias Biológicas

El presente trabajo de Tesis, para optar por el título de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas (UNLP), fue realizada en el Centro de Química Inorgánica “Dr. Pedro J. Amonio”, CONICET-UNLP-CEQUINOR.



CEQUINOR

Centro de Química Inorgánica

Dr Pedro J. Amonio



CONICET



LA PLATA

Congresos asistidos y publicaciones científicas

Congresos

- Evento: X Congreso ALAMCTA. II Congresos de la Sociedad Uruguaya de Radioprotección. Escuela de Mutagenesis. I Jornadas de Toxicología y Salud Ambiental.
Carácter de participación: presentación de poster
Título: CYTO- AND GENOTOXICITY OF A RUTHENIUM-CLIOQUINOL COMPLEX AGAINST 2D AND 3D HUMAN OSTEOSARCOMA MODELS.
Autores: Ruiz, M.C ; Cadavid Vargas, J.F ; Kljun ,J ; Di Virgilio, A.L.;Turel, I.;León, I.E ;Etcheverry, S.B.
Expositor: M. Carolina Ruiz.
Lugar: Montevideo, Uruguay.
Año: 13-15 de Octubre de 2016. Uruguay
- Evento: LXI reunión de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica.
Carácter de participación: presentación de poster.
Título: TRANSITION METAL COMPLEXES WITH 6-METHOXYQUINOLINE AS ANTITUMOR AGENTS. BIOLOGICAL STUDIES ON TWO AND THREE-DIMENSIONAL CELL CULTURED MODELS.
Autores: Juan Cadavid Vargas, Cristian Villa Pérez, María Carolina Ruiz, Ignacio Esteban León, Gloria Cristina Valencia, Delia Beatriz Soria, Ana Laura Di Virgilio , Susana Beatriz Etcheverry.
Expositor: Juan Cadavid Vargas.
Lugar: Mar del Plata. Buenos Aires. Argentina
Años: Noviembre 2016.
- Evento: Reunión Conjunta de Sociedades de Biociencias.
Carácter: presentación oral.
Título: IN VITRO ANTICANCER ACTIVITY OF TWO NOVEL RU HIDROXIQUINOLINES COMPOUNDS AGAINST 2D AND 3D CELL MODELS. Autores: Ruiz, M.C ; Cadavid Vargas, J.F ; Kljun ,J ; Di Virgilio, A.L.; Turel, I.; León, I.E ;Etcheverry, S.B.
Expositor: M. Carolina Ruiz.
Lugar: Capital Federal, Argentina.
Año: noviembre 2017.
- Evento: X Reunión científica de Bioinorgánica BioBilbao 2017
Carácter de participación: Poster
Tema: NUEVOS TIOSEMICARBAZONATOS DE PD(II) Y PT(II) BIOACTIVOS. CITOTOXICIDAD, SELECTIVIDAD Y ESTUDIOS DE INTERACCIÓN CON ADN Y PROTEÍNAS.

Autores: Ana I. Matesanz, Eva Jiménez, Ruiz. M.C., León I.E, Carmen Navarro-Ranninger., Adoración G. Quiroga
Lugar: ciudad de Bilbao, España.
Fecha: 9 al 12 de Julio de 2017.

- Evento: SLAP 2018. XVI Simposio Latinoamericano de Polimeros.
Carácter de participación: Poster.
Tema: SELF-ASSEMBLED BOVINE SERUM ALBUMIN NANOPARTICLES AS DELIVERY SYSTEMS FOR ANTITUMOR FLAVONOIDS.
Autor: Joana Ferrado, Adrián Perez, María-Carolina Ruiz, Ignacio León, Germán Islan, Guillermo Castro, Liliana Santiago.
Lugar: Mar del Plata. Argentina
Fecha: 6 al 9 de Noviembre de 2018.
- Evento: III Congreso Latinoamericano de métodos alternativos al uso de animales de experimentación en educación, investigación e industria.
Carácter de participación: Poster.
Tema: USO DE MODELOS TRIDIMENSIONALES EN LA EVALUACIÓN ANTITUMORAL DE DOS COMPLEJOS DE RUTENIO.
Autores: Ruiz, MC, Cadavid,JF, Balsa, LM, Kljun, J, Turel, I, Di Virgilio, AL, León, IE.
Lugar: Capital Federal, Buenos Aires.
Fecha: 30-31 de Octubre y 1 de Noviembre de 2018.
- Evento: SAIC.SAI.SAFIS 2018
Carácter de participación: poster
Tema: IN VITRO ANTITUMOR EFFECTS OF TWO COPPER COMPLEXES WITH PHENATROLINES DERIVATIVES TOWARD 2D AND 3D BONE, LUNG AND BREAST CANCER CELL MODELS.
Autores: Ruiz, M.C.; Cadavid Vargas, J.F ; Lemus, Luis ; Levin Pedro; Di Virgilio, A.L.; León, I.E ;Etcheverry, S.B.
Lugar: Mar del Plata. Buenos Aires
Fecha y lugar: 14 al 17 de noviembre de 2018.
- Evento: XXXII CAQ 2019.
Carácter de participación: poster. Acreditado el primer premio en el Área de Química Inorgánica y Química Bioinorganica.
Tema: EFECTOS ANTITUMORALES INDUCIDOS POR UNA METALODROGA DE COBRE CON TROPOLONA SOBRE MODELOS CELULARES 2D Y 3D DE CÁNCER DE MAMA. LUCIA SANTA MARIA DE LA PARRA, MARÍA CAROLINA RUIZ, ENRIQUE JOSÉ BARAN, IGNACIO ESTEBAN LEÓN.
Lugar: Buenos Aires. Argentina.

Fecha y lugar: 12 al 15 de Marzo de 2019.

- Evento: SAIC. SAFE. SAB. SAP. AACYTAL. NANOMED-ar. HCS. 2019
Carácter de presentación: poster
Tema: ANTITUMOR PROPERTIES OF TWO COPPER BASES COMPOUNDS AGAINST 2D AND 3 D HUMAN COLORECTAL CANCER CELL MODELS.
Autores: Ruiz, M., Perelmuter K., Bollati-Fagolin M., Di Virgilio A., Leon I.
Lugar: Mar del Plata, Buenos Aires.
Fecha y lugar: 13 al 16 de noviembre de 2019.

Publicaciones científicas

- Título: Mononuclear Pd(II) and Pt(II) complexes with an α -N-heterocyclic thiosemicarbazone: cytotoxicity, solution behaviour and interaction versus proven models from the biological media.
Autores: Ana I. Matesanza; Eva Jimenez-Faraco; María C. Ruiz; Lucia M. Balsa; Carmen Navarro Ranningera ; Ignacio E. León; A.G. Quiroga.
Año: 18 de octubre de 2017.
Nombre de la revista: Inorganic Chemistry Frontiers.
- Título: Metvan,bis(4,7-Dimethyl-1,10-phenanthroline) sulfatooxidovanadium(IV): DFT and Spectroscopic Study—Antitumor. Action on Human Bone and Colorectal Cancer Cell Lines
Autores: Ignacio E. León & María C. Ruiz & Carlos A. Franca & Beatriz S. Parajón-Costa & Enrique J. Baran
Año: 2018
Nombre de la revista: Biological Trace Element Research
- Título: Comparative antitumor studies of organoruthenium complexes with 8-hydroxyquinolines on 2D and 3D cell models of bone, lung and breast cancer.
Autor: Ruiz MC, Kljun J, Turel I, Di Virgilio AL, León IE.
Año: 2019.
Nombre de la revista: Metallomics.
- Título: 6-Methoxyquinoline complexes as lung carcinoma agents: induction of oxidative damage on A549 monolayer and multicellular spheroid model
Autor: Cadavid-Vargas JF, Villa-Pérez C, Ruiz MC, León IE, Valencia-Urbe GC, Soria DB, Etcheverry SB, Di Virgilio AL.
Año: 2019
Nombre de la revista: JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry.

- Título: In vitro and in vivo anticancer effects of two quinoline-platinum(II) complexes on human osteosarcoma models.
 Autor: Ruiz MC, Resasco A, Di Virgilio AL, Ayala M, Cavaco I, Cabrera S, Aleman J, León IE.
 Año: 2019.
 Nombre de la revista: Cancer Chemotherapy and Pharmacology.
- Título: Lipid nanoparticles – Metvan: revealing a novel way to deliver a vanadium compound to bone cancer cells
 Autor: M. L. Cacicedo, M. C. Ruiz. Scioli-Montoto, M. E. Ruiz, M. A. Fernández, R. M. Torres-Sanchez, E. J. Baran, G. R. Castro ORCID logo a and I. E. León.
 Año: 2019
 Nombre de la revista: New Journal of Chemistry.
- Título: Mononuclear Pd(ii) and Pt(ii) complexes with an α -N-heterocyclic thiosemicarbazone: cytotoxicity, solution behaviour and interaction versus proven models from biological media.
 Autor: Ana I. Matesanz, Eva Jimenez-Faraco, María C. Ruiz, Lucia M. Balsa, Carmen Navarro-Ranninger, Ignacio E. León and Adoracion G. Quiroga ORCID.
 Año: 2018.
 Nombre de la revista: Inorganic Chemistry Frontiers.
- Titulo: Anticancer and antimetastatic activity of copper(II)-tropolone complex against human breast cancer cells, breast multicellular spheroids and mammospheres.
 Autor: Balsa LM, Ruiz MC, Santa Maria de la Parra L, Baran EJ, León IE.
 Año: 2019
 Nombre de la revista: Journal of inorganic biochemistry.
- Titulo: Diethylaminophenyl-based Schiff base Cu(II) and V(IV) complexes: experimental and theoretical studies and cytotoxicity assays.
 Autor: Mariana Rocha, Maria C. Ruiz, Gustavo A. Echeverria, Oscar E. Piro, Ana L. Di Virgilio, Ignacio E. Leon, Antonio Frontera y Diego M. Gil.
 Año: 2019
 Nombre de la revista: New Journal of Chemistry.

Agradecimientos

Por la presente quisiera agradecer

- A mi directora y codirector, Ana Laura e Ignacio, por confiar en mí para llevar a cabo este proyecto. Además agradecerles por todas sus ideas, colaboración, enseñanzas, paciencia, y gran ayuda durante el transcurso de todo este proyecto.
- El CONICET, a Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT), por otorgarme las becas de inicio y finalización de doctorado para el desarrollo de la tesis Doctoral.
- A la Universidad Nacional de La Plata (UNLP) por el otorgamiento de subsidios y fondos necesarios para llevar a cabo las tareas de investigación
- Al director del Centro de Química Inorgánica (CEQUINOR). Prof. Dr. Carlos O. Della Védova por permitirme desarrollar las tareas de investigación en sus instalaciones durante estos años.
- A la Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia de la Universidad Nacional de Tucumán, tanto a la Cátedra de Bacteriología como de Histología, por su gran aporte en el desarrollo de esta tesis.
- A la Universidad Nacional de Tucumán.
- A mi gran amigo y compañero, Dr. Friendo Cadavid, por su compañía y gran amistad en estos años. Por ser incondicional. Por todo lo que compartimos y aun lo hacemos a la distancia.
- A Lucia Balsa, por su ayuda y compañerismo dentro y fuera del laboratorio.
- A mis amigos internacionales (y no tanto), Cris, Ede, Eli, Maria, Helen, Vale, Sole, Diana y Yace, por su gran amistad, por todo lo compartido, desde sus clases de química, after office, fines de semana, etc. Gracias por el apoyo y ayudarme con la adaptación platense jaja.
- A la Luciana Naso por sus enseñanzas y momentos compartidos dentro y fuera del cuarto de cultivo.
- A todos los becarios, investigadores y profesionales de la carrera de personal de apoyo, tanto del CEQUINOR como del IIFP, que me enseñaron, me prestaron reactivos, me sacaron de dudas, etc. etc., infinitas gracias.
- A las Dras. Betty, Bea, Anita, Patricia, Eli y Evelina, por sus consejos en estos años, almuerzos y festejos compartidos.
- A mis papas, Angel y Clara, por ser mi guía, por sus enseñanzas y acompañarme en todo momento. A mis hermanos y hermana, Esteban, Juan y Mariana, que siempre estuvieron presente apoyándome y alentándome desde que decidí irme a vivir a La Plata.
- A mis abuelos que estuvieron siempre en mi corazón.
- A mis chiquitos locos, Martin y Matías.
- A toda mi familia que siempre fueron el mayor sostén en mis días más difíciles.
- A mis dos amores, Gabriel y Guillermina.

Índice general

| | | |
|-------|---|-----|
| 1. | Definición, clasificación del cáncer y epidemiología | 1 |
| 1.2 | Características patológicas del cáncer..... | 16 |
| 1.2.1 | Apoptosis | 16 |
| 1.3 | Metalofármacos..... | 29 |
| 1.4 | Metodología usada para el testeo de los metalofármacos..... | 42 |
| 1.5 | Hipótesis | 48 |
| 1.6 | Objetivos generales | 48 |
| | Bibliografía..... | 50 |
| 2. | Metodología..... | 57 |
| 2.1 | Descripción de las líneas celulares y condiciones de cultivo. | 57 |
| 2.2 | Síntesis de los complejos estudiados..... | 62 |
| 2.3 | Estudios de viabilidad | 64 |
| 2.4 | Mecanismos de acción de los complejos..... | 66 |
| 2.4.3 | Potencial Redox | 73 |
| 2.5 | Interacción con ADN | 84 |
| 2.6 | Captación celular del Cu por Espectroscopía de Absorción atómica acoplada a plasma inducido (ICP-MS)..... | 86 |
| 2.7 | Sistema de cultivo 3D, Esferoides..... | 87 |
| 2.8 | Inhibición de la vía NFκβ en la línea celular HT-29 NF-κB hr-GFP | 94 |
| 2.9 | Estudios <i>in vivo</i> | 95 |
| 2.10 | Bibliografía..... | 101 |
| 3 | Complejos de Rutenio..... | 104 |
| 3.1 | Estabilidad de los complejos 1 y 2..... | 105 |
| 3.2 | Efecto de los complejos 1 y 2 en las interacciones con Ct-ADN..... | 105 |

3.3 Estudio de la actividad anticancerígena de los complejos sobre monocapa celular

109

| | |
|--|-----|
| 3.4 Estudios en modelos 3D..... | 128 |
| 3.5 Conclusiones | 138 |
| 3.6 Bibliografía..... | 140 |
| 4 Complejos de cobre | 145 |
| 4.1 Experimentos en monocapa | 146 |
| 4.2 Ensayos en sistemas 3D | 180 |
| 4.3 Inhibición de la vía NFκβ en monocapa y esferoides de la línea celular HT-29 | 198 |
| 4.4 Determinación del cobre intracelular mediante ICP-MS..... | 202 |
| 4.5 Estudios de los efectos de los complejos en modelos <i>in vivo</i> | 203 |
| 4.6 Conclusiones | 219 |
| 4.7 Bibliografía..... | 223 |
| 5 Actividad antimicrobiana de los complejos de coordinación de cobre | 228 |
| 5.1 Introducción | 228 |
| 5.2 Materiales y métodos | 230 |
| 5.4 Resultados..... | 236 |
| 5.5 Conclusiones | 248 |
| 5.6 Bibliografía..... | 249 |
| 6. ANEXO | 261 |

Abreviaturas empleadas

γ GT: Gamma glutamil transferasa

ADN: Acido desoxirribonucleico

ALT: Alanina aminotransferasa

AST: Aspartata aminotransferasa

BCRA: *BReast-CAnce*r susceptibility gene 1 y 2

BLM: Bleomicina

CCCP: Carbonilcianuro-m-clorofenilhidrazona

CCR: Cáncer colorectal

CisPt: Cisplatino

Ct-DNA: *Calf Thimus DNA*

DHR123: Dihidrorodamina 123

DMEM: *Dulbecco's modified Eagles minimal essential medium*

DMSO: Dimetilsulfóxido

ERO: Especies de oxígeno reactivas

FDA: Fluoresceína diacetato

FITC: Fluoresceína-5-isotiocianato

GCO: *Global Cancer Observatory*, Observatorio Global del Cancer

GSH: Glutati3n

GSSG: Glutati3n disulfuro

HER2: Receptor del factor epidérmico humano 2

ICP-MS: Absorci3n at3mica inducida acoplada a plasma

INC: Instituto Nacional del Cáncer

IP: Ioduro de propidio

MEC: Matriz extracelular

MMPs: Metaloproteinasas

MTT: Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio

NF κ β : Factor Nuclear κ β

MN: Micronúcleo

OMS: Organización Mundial de la Salud

ON: *Overnight*

PBS: *Phosphate-Buffered Saline*. pH 7.4

PMM: Potencial de membrana mitocondrial

RE: Receptor de estrógeno

RP: Receptor de progesterona

SFB: Suero Fetal Bovino

TNF- α : Factor de Necrosis Tumoral α .

The background of the slide features a white field with a dotted black border. Scattered throughout are several blue molecular models, each consisting of spheres of varying sizes connected by thin rods, representing chemical structures. At the bottom, a solid red rectangular box with a dashed black border contains the word "INTRODUCCIÓN" in white, bold, serif capital letters.

INTRODUCCIÓN

1. Definición, clasificación del cáncer y epidemiología

La Organización Mundial de la Salud (OMS), y el Instituto Nacional de Cáncer (INC) definen al cáncer como un término genérico que designa a un amplio grupo de enfermedades que pueden afectar a cualquier parte del organismo; también se habla de “tumores malignos” o “neoplasias malignas”. Una característica definitoria de esta patología es la multiplicación rápida de células anormales que se extienden más allá de sus límites habituales y puede invadir partes adyacentes del cuerpo o propagarse a otros órganos, un proceso que se denomina “metástasis”, por medio del sistema circulatorio o linfático y formar nuevos tumores en localizaciones anatómicas diferentes a la original. Las metástasis son la principal causa de muerte por cáncer (*¿Qué es el cáncer? - Instituto Nacional del Cáncer, n.d.*)(*Cáncer, n.d.*). Robbins y Cotran, definen el cáncer como una alteración del crecimiento celular desencadenada por mutaciones adquiridas que afectan a una sola célula y a su progenie clónica. Estas mutaciones proporcionan a las células neoplásicas una ventaja para su supervivencia y crecimiento, que permiten su proliferación excesiva e independiente de las señales fisiológicas de crecimiento (Aster, 2015).

Los tumores benignos y malignos se diferencian por rasgos histológicos y anatómicos característicos. Uno de ellos es el grado de diferenciación, los tumores benignos están bien diferenciados, no así los tumores malignos. Estos están compuestos por células poco diferenciadas, o anaplasias, lo cual es un rasgo distintivo de malignidad. Se suma, las abundantes células en mitosis, como reflejo de una gran actividad proliferativa, con figuras mitóticas atípicas y grotescas, con husos multipolares, y la pérdida de polaridad. Otra de las características, es que por lo general los tumores benignos, al estar compuestos por células bien diferenciadas, conservan una función similar a la normal, en cambio, las células muy indiferenciadas de los tumores malignos adquieren funciones nuevas e imprevistas. Otra de las características que permite diferenciar estos tipos de tumores es la capacidad de invasión. El crecimiento de los tumores malignos o cáncer, se acompaña de una infiltración, invasión y destrucción del tejido circundante, mientras que casi todos los tumores benignos crecen en forma de masas expansivas y

cohesionadas que se mantienen en su lugar de origen y carecen de la capacidad de infiltrar, invadir o metastizar (Aster, 2015).

Carton James agrega que el cáncer es un término amplio para cualquier neoplasia maligna. Una neoplasia es una masa anormal de tejido que muestra crecimiento descoordinado y no tiene un propósito útil. Las neoplasias malignas tienen la capacidad de diseminarse hacia sitios distantes y producir tumores secundarios llamados metástasis que pueden crecer de manera independiente del tumor primario. Se define como carcinogénesis a la secuencia de eventos que conducen a la aparición de una neoplasia maligna. Son varias las causas de las mismas, entre ellas, radiaciones, sustancias químicas, enfermedades inflamatorias crónicas, concentraciones elevadas de hormonas, entre otras (Carton, 2012).

El cáncer ocurre por una serie de mutaciones sucesivas en genes, las cuales llevan a un cambio en la función celular. A pesar de que aún no se ha encontrado una causa exacta de esta enfermedad, muchas han sido identificadas como factores de riesgo. Estos incluyen, tabaquismo, dieta, estilo de vida, ocupación, herencia, medio ambiente y agentes infecciosos. Los compuestos químicos tienen un importante rol en generar mutaciones en genes, como por ejemplo, los químicos inhalados debidos al tabaquismo son causantes del cáncer de pulmón, cáncer de vejiga entre otros. Las sustancias químicas con propiedades cancerígenas tienen influencia directa o indirecta sobre el citoplasma y el núcleo celular, y provocan mutaciones genéticas. Virus, bacterias y radiaciones son otros factores carcinogénicos, que generan el 7% de todos los cánceres. En general, las células cancerígenas tienen mutados genes vitales, como oncogenes, genes supresores de tumores, los cuales alteran el ciclo celular, y producen una proliferación celular anormal, no controlada (Hassanpour & Dehghani, 2017).

El cáncer se origina a partir de una sola célula normal que sufre alteraciones irreversibles de los genes responsables de controlar el crecimiento y la muerte celular. Todas las células que se hayan formado por división de esta primera, así como todas las siguientes generaciones presentaran los mismos fallos, y por lo tanto, el mismo comportamiento

tumoral. Por lo tanto, el tumor seguirá creciendo de forma incontrolada mediante clones de la primera célula dañada (Reya *et al.*, 2001) (Aster, 2015).

Hanahan y Weinberg definieron el cáncer con 6 características principales: autosuficiencia en señales de crecimiento, insensibilidad a las señales anti-crecimiento, evasión de la apoptosis, potencial de replicación ilimitada, desarrollo de angiogénesis e invasión de tejidos y metástasis. Una década después, agregaron cuatro características más, reprogramación de la energía celular, evasión de la respuesta inmune, inestabilidad genómica y promotor de la inflamación. Las mismas están representadas en la figura 1.1.1. Fouad y colaboradores, realizaron una categorización complementaria “Las células adquieren características evolutivas ventajosas que complementariamente promueven la transformación de células fenotípicamente normales en células malignas, y promueve la progresión de células malignas mientras se sacrifica el tejido huésped” (Fouad & Aanei, 2017).



Figura 1.1.1. (Imagen extraída de Hanahan y Weinberg. *Cell*. 2011). Características principales del cáncer.

En el proceso de transformación de las células a la malignidad, se enfrentan a varias tensiones, que incluyen: señalización excesiva, daño en ADN, hipoxia, escasez de

nutrientes, e incluso terapias anticancerígenas. Por lo tanto, la célula adopta una variedad de respuestas adaptativas cuando es posible para sobrevivir. Algunas de estas respuestas son, por ejemplo, la sobreexpresión de proteínas anti-apoptóticas o la baja expresión de proteínas pro-apoptóticas (Fouad & Aanei, 2017).

Los tumores no pueden crecer más de 2-3 mm³ sin vasculatura nueva. En ese sentido, la angiogénesis es el proceso de brotación, división celular, migración y ensamblaje de células endoteliales de vasos preexistentes. En las neoplasias este proceso está activado continuamente. La característica definitoria de malignidad implica la invasión de tejidos alrededor, y la proliferación de células cancerígenas en sitios distantes para generar crecimientos secundarios (metástasis). La metástasis es responsable del 90% de las muertes relacionadas al cáncer (Fouad & Aanei, 2017).

La reprogramación del metabolismo provee una ventaja selectiva durante la iniciación y progresión de los tumores. Pavlova y Thomson, introdujeron el metabolismo alterado del cáncer en 6 características, absorción desregulada de glucosa y aminoácidos, modos oportunistas de adquisición de nutrientes, utilización de glucólisis y productos intermedios del ciclo de los ácidos tri-carboxílicos, aumento de la demanda de nitrógeno, alteraciones en la regulación génica impulsada por metabolitos e interacciones metabólicas con el microambiente (Pavlova & Thompson, 2016). Por último, cabe señalar que existe una continua comunicación paracrina entre las células cancerosas y las células del estroma creando un microambiente rico y dinámico en todas las etapas de la carcinogénesis. A pesar de que el cáncer está bajo selección inmune, algunos clones pueden escapar. Durante esta fase las células cancerígenas, que son capaces de evadir el sistema inmune y su eliminación a través de alteraciones genéticas y epigenéticas, crecen de una manera no controlada formando tumores detectables clínicamente (Pavlova & Thompson, 2016).

Los cánceres son clasificados de dos maneras: 1) tipo de tejido en el cual el cáncer se origina (tipo histológico) y 2) por el primer sitio o la localización en el cuerpo donde el cáncer se desarrolló por primera vez.

Desde el punto de vista histológico, se agrupan en 6 categorías:

- 1) Carcinoma: hace referencia a una neoplasia maligna con origen epitelial o cáncer del revestimiento interno o externo del cuerpo. Representan el 80 a 90% de todos los casos de cáncer. Muchos de ellos afectan a órganos o glándulas que son capaces de secretar, como la mama, pulmón, colon, próstata o vejiga. Estos son divididos en 2 subtipos principales:
 - Adenocarcinomas, se desarrollan en un órgano o glándula, generalmente ocurren en las membranas mucosas, pueden diseminarse fácilmente a través del tejido blando.
 - Carcinoma de células escamosas, se originan en el epitelio escamoso. Ocurre en muchas áreas del cuerpo.
- 2) Sarcoma: se refiere al cáncer que se origina en el tejido de soporte y tejido conectivo, como huesos, tendones, cartílagos, músculo y grasa. Generalmente se originan en adultos jóvenes, en el que se desarrolla una masa dolorosa en el hueso.
- 3) Mieloma: es un cáncer que se origina en las células plasmáticas de la médula ósea.
- 4) Leucemia: son neoplasias de la médula ósea. Generalmente está asociada a la sobre producción de glóbulos blancos inmaduros. Estas células no actúan como deberían, por lo tanto, los pacientes son más propensos a las infecciones. También afecta a los glóbulos rojos causando problemas de coagulación, fatiga y anemia.
- 5) Linfoma: se desarrollan en las glándulas o ganglios del sistema linfáticos. Son clasificados en 2 subcategorías: linfomas de Hodgkin y linfomas no Hodgkin.
- 6) Mixtos: el componente típico puede ser de una sola categoría o de diferentes categorías. Algunos ejemplos son: carcinosarcoma, teratocarcinoma, entre otros (*Cancer Classification | SEER Training, n.d.*).

Para muchos cánceres, el estadio se basa en el tamaño del ganglio linfático primario y si el cáncer se ha diseminado a los ganglios linfáticos. De acuerdo a este sistema, si las células están presentes en la capa donde se desarrollan y no se diseminan, el estado es

in situ. Si las células han penetrado más allá de la primera capa, el cáncer se volvió viral e invasivo, y es clasificado como local, regional o distante según el grado en que se disemino.

Los patólogos clínicos, usan un sistema diferente llamado TNM. Este sistema evalúa el crecimiento el cáncer y propagación en 3 maneras: tamaño y extensión del tumor primario (T), ausencia o presencia de nódulos linfáticos (N) en presencia o ausencia de la metástasis distante (M) (Institute, 2020).

Más de 1.8 millones nuevos casos de cáncer van a ser diagnosticados en 2020. Este estimativo no incluye carcinomas no invasivos y tampoco cáncer de piel (Institute, 2020). Según el Observatorio Global del Cáncer (GCO: *Global Cancer Observatory*) nuestro país, en 2018, presentó una tasa de incidencia de 218 casos cada 100 000 habitantes, basados en una estimación de 129 047 casos nuevos por año incluyendo ambos sexos y todos los tipos de cáncer. Argentina se ubica en el mundo dentro de los países con incidencia media alta (183.8-253.9 cada 100 000 habitantes) y en América del Sur entre los países con alta incidencia (≥ 217.8 cada 100 000 habitantes), tal como puede observarse en las figuras 1.1.2 y 1.1.3 respectivamente.

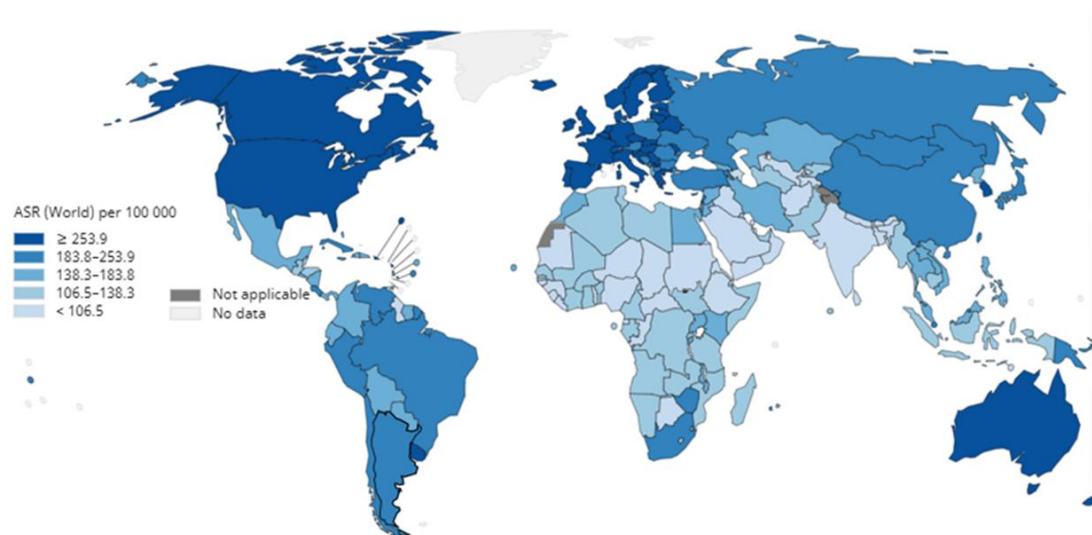


Figura 1.1.2. Imagen extraída de la página web del Observatorio Global del Cáncer. Incidencia global de cáncer.

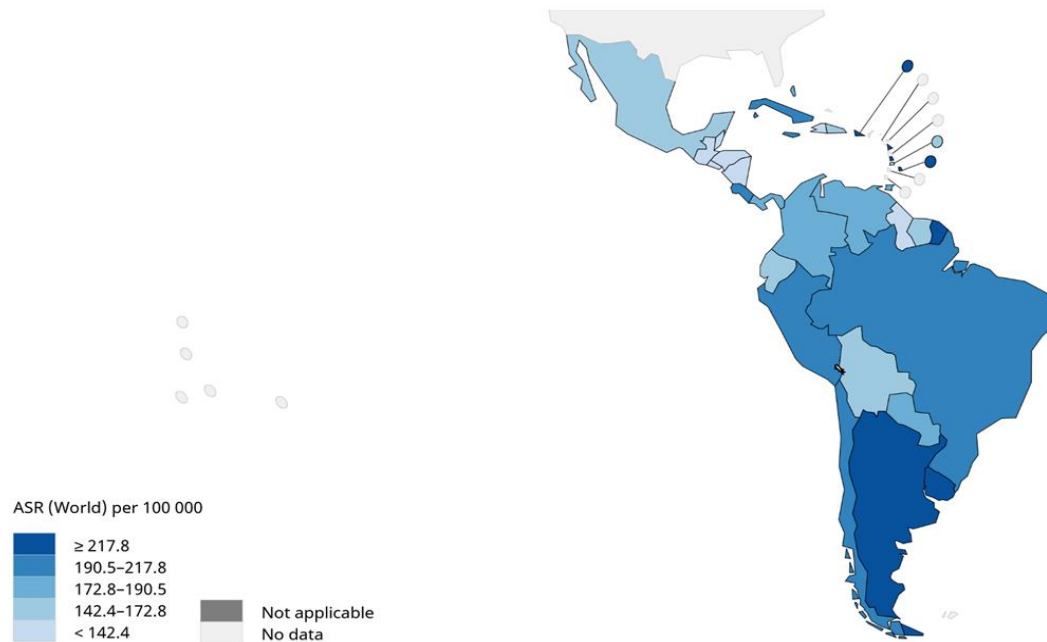


Figura 1.1.3. Imagen extraída de la página web del Observatorio Global del Cáncer. Incidencia de cáncer en América del Sur.

En cuanto a los tipos de cáncer más frecuentes en Argentina, diferenciando según el sexo, el de mayor prevalencia en la mujer es el cáncer de mama, con una incidencia de 53.4 casos cada 100 000 habitantes y en el hombre es el cáncer próstata con una incidencia de 55.3 casos cada 100 000 habitantes. Para ambos sexos, el segundo tipo de cáncer más común es el color rectal, con una incidencia de 19.4 para el hombre y de 15.8 para el sexo femenino cada 100 000 habitantes. El cáncer de pulmón es el tercero en orden de incidencia en el hombre y el quinto en la mujer. En niños el porcentaje más alto de tipos de cáncer, son leucemias, y los que están relacionados al cerebro y a nódulos linfáticos (Hassanpour & Dehghani, 2017).

El problema del cáncer en el mundo tendrá un impacto creciente en las próximas décadas como producto del envejecimiento de la población debido a la mayor expectativa de vida y a la disminución del índice de natalidad observado. Este fenómeno alcanzará a Latinoamérica y a la Argentina, en donde se estima para el año 2030 un crecimiento del 49% de las personas de 65 o más años con respecto a 2010 (Instituto Nacional del Cáncer (INC) & Ministerio de Salud, 2011). La OMS (Organización Mundial de la Salud) comunico que dada la situación de pandemia actual debido al COVID-19, muchos pacientes que requerían tratamiento para enfermedades como el cáncer,

diabetes, etc., no han estado recibiendo servicios de salud y medicinas necesarias desde que la pandemia inicio. En la mayoría de los países, 94%, los ministerios de salud, que trabajan en enfermedades de enfermedades no notificables, han sido reasignadas para trabajar en COVID-19. Otra de las razones para la discontinuidad de la atención a pacientes con cáncer, fue la cancelación de los planes de tratamiento, disminución del transporte público y la falta de personal debido a que estaban reasignados a atender pacientes con COVID-19, además la falta de medicinas, diagnóstico y otras tecnologías agravaron la situación de pacientes oncológicos (*COVID-19 significantly impacts health services for noncommunicable diseases*, n.d.)

A continuación, se introducirá aspectos generales de los cánceres que consideramos más relevantes, tanto desde el punto de vista de su incidencia y mortalidad, y de los cuales derivan las líneas celulares, con las cuales se trabajó en este trabajo de tesis.

1.1.1 Cáncer de hueso

El cáncer primario de hueso incluye osteosarcoma, sarcoma de Ewing y condrosarcoma. El osteosarcoma es el cáncer de hueso más común, representa casi dos tercios de todos los casos. Es un cáncer que se produce con mayor frecuencia en niños y tiene baja incidencia en personas mayores de 60 años. Entre los cánceres pediátricos, el osteosarcoma es el octavo en incidencia a nivel mundial. (Ottaviani & Jaffe, 2009). Se cree que el osteosarcoma se origina en células mesenquimales primitivas malignas, las cuales se diferencian en osteoblastos, que a su vez producen una matriz osteoide maligna. El osteosarcoma puede surgir en cualquier hueso, pero se desarrollan clásicamente en la metafisis de los huesos largos. Por lo tanto, los osteosarcomas tienden a ocurrir en la edad y el lugar en que el crecimiento óseo es más activo y es además, cuando las células presentan mayor vulnerabilidad a las mutaciones. Casi el 60% ocurre en el fémur distal, la tibia y el húmero proximal.

Este tipo de cáncer puede hacer metástasis regional y sistémicamente. Los tumores primariamente pueden diseminarse dentro del mismo hueso o pueden hacerlo entre huesos, a través de una unión por ejemplo entre tibia y fémur. La metástasis sistémica

ocurre en los pulmones con mayor frecuencia a través del sistema circulatorio (un 20% aproximadamente) (Ferguson & Turner, 2018) (Casali *et al.*, 2018).

En cuanto al tratamiento, se utiliza quimioterapia neo adyuvante con el objetivo de producir necrosis tumoral y disminuir el tamaño del tumor primario, así como de reducir la metástasis pulmonar. De esta manera se ha aumentado el rescate de los miembros y aumenta la supervivencia de un 10-20% a un 60%. Por lo general la quimioterapia es administrada antes y después de la cirugía. Las drogas quimioterapias que son efectivas incluye, metotrexato, doxorubicina, ifosfamida y cisplatino (Casali *et al.*, 2018; Ferguson & Turner, 2018).

1.1.2 Cáncer de mama

Este cáncer es uno de los tres tipos de cáncer más común en el mundo. El cáncer de mama temprano se considera potencialmente curable. La mayoría de los cánceres de mama son benignos, no cancerosos, y son debido a formaciones fibroquísticas. Dentro de los tumores malignos, existen varios tipos, en función del lugar de la mama donde se produzca el crecimiento anormal de las células y según su estadio. El cáncer de mama se clasifica según su diagnóstico histológico, con criterios patológicos estandarizados, en: carcinoma ductal invasivo (50-75% de los pacientes), carcinoma lobular invasivo (5-15% de los pacientes), carcinoma medular (hereditario por mutaciones en los genes BCRA 1 y 2) (siglas en inglés, *BReast-CAnceR susceptibility gene 1 y 2*), carcinoma tubular, carcinomas no invasor intraductal, carcinomas no invasor papilar intraductal, carcinoma lobular in situ no invasivo, carcinomas mixtos, ductal/lobular, que constituyen el resto de los pacientes (Waks & Winer, 2019).

Las nuevas técnicas de biología molecular han contribuido a la clasificación de este cáncer. Perou y colaboradores lo clasificaron en 2 grupos en función de la respuesta a los receptores de estrógeno (Perou *et al.*, 2000):

- 1) **Receptor de estrógeno α (RE α) positivo:** el cual se expresa en un 70% aproximadamente de los cánceres invasivos. RE α es un receptor hormonal esteroideo y un factor de transcripción, cuando es activado por estrógeno, se activan vías de

crecimiento en las células de mama cancerígenas. Estos tumores son categorizados como RE+. Este grupo de tumores está formado por los tumores luminales, ellos son:

- Luminal A: es el más frecuente, 67% de los casos. Tiene alta expresión del gen del receptor hormonal (RE+).
- Luminal B: la expresión del receptor de estrógenos es menor.

2) **Tumores receptores de estrógeno negativo:** existen dos grupos de tumores:

- El cáncer de mama triple negativo o subtipo basal: corresponde a un 15% aproximadamente de todos los tumores, es caracterizado por la falta de expresión de los *targets* moleculares, RE, RP (receptor de progesterona) y HER2 (receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 2). Es el subtipo más agresivo y se da mayoritariamente en mujeres menores a 40 años. En estos tumores hay alteraciones de genes reparadores de ADN.
- Factor de crecimiento epidermal 2 (ERBB2 o HER2): receptor transmembrana tirosina quinasa, que está sobre expresado en el 20% de los cánceres de mama aproximadamente, y está asociado con bajo pronóstico en ausencia de terapia sistémica. El ERBB2 es un protooncogén, cuando se encuentra amplificado, se asocia con caracteres histológicos relacionados con baja expresión de ER y PR. El subtipo HER/neu presentan mala respuesta a la terapia, es resistente a la terapia hormonal, por la falta de receptores hormonales (Hadi & Jamal, 2015; Perou *et al.*, 2000; Waks & Winer, 2019).

En cuanto al tratamiento, para el cáncer RE+/HER2-, se realiza una terapia endocrina, con antiestrógeno, que contrarresta el crecimiento del tumor promovido por los estrógenos. Tamoxifeno es el modulador del receptor que inhibe de manera competitiva la unión de la hormona al receptor. Otra droga es un inhibidor de aromatasa, que disminuye los niveles de estrógenos circulantes por la inhibición de la conversión de andrógenos a estrógenos.

Diferentes neoadyuvantes y adyuvantes son usados como regímenes quimioterápicos para el cáncer de mama HER2-, en etapas tempranas. Todos los regímenes

docetaxel/ciclofosfamida, adriamicina/ciclofosfamida, y ciclofosfamida/metotrexato/5-fluorouracilo son todas de elección en pacientes con bajo riesgo.

Debido a su pronóstico no favorable, la quimioterapia es administrada en pacientes con cáncer de mama triple negativo. Debido a los deficientes mecanismos de reparación del ADN, quimioterápicos de platino han sido de interés en el tratamiento de este tipo de cáncer. Dos ensayos clínicos con carboplatino han demostrado una mejoría en este tipo de cáncer. Los tratamientos disponibles son capecitabina, doxorubicina liposomal y paclitaxel ligado a albumina.

El desarrollo de terapia contra el tipo de cáncer HER2+, ha sido uno de los mayores avances en el tratamiento contra el cáncer. Trastuzumab, un anticuerpo monoclonal, tiene como blanco un dominio extracelular del receptor HER2. Se demostró que un año de terapia, marcó una mejoría en la supervivencia para pacientes con cáncer de mama HER2+. (Waks & Winer, 2019)(Harbeck & Gnant, 2017).

1.1.3 Cáncer de pulmón

A nivel mundial, el cáncer de pulmón continúa siendo la causa más común de muerte por cáncer. Es relativamente raro antes de los 50 años, el riesgo aumenta conforme aumenta la edad, y los hombres se ven más afectados que las mujeres. El tabaquismo es el factor más estrechamente relacionado con el cáncer de pulmón ya que un 80-90% de los casos son causados por el tabaco mientras que el riesgo de contraer cáncer es 10 veces más alto que para las personas que nunca fumaron (Nasim *et al.*, 2019) (*Cáncer*, n.d.). El 10% de los casos restante se debe a causas genéticas, factores externos o exfumadores (Enomoto *et al.*, 2016).

El cáncer de pulmón se clasifica en 2 grupos:

- El cáncer de pulmón microcítico o de células pequeñas (CPCP o *SCLC*) se caracteriza por una tasa de duplicación alta, rápido crecimiento y desarrollo temprano de metástasis, alta tasa de respuesta a la quimioterapia y las recaídas en el primer año. Es un tumor que afecta a grandes fumadores. El CPCP se caracteriza por tener células pequeñas azules, con citoplasma escaso y cromatina dispersa sin claros nucléolos. El

70% tiene metástasis en hígado, hueso, glándulas suprarrenales y cerebro en el momento del diagnóstico (Valdivia, 2017). Este tipo de cáncer es poco frecuente, entre un 10 a un 15% de los cánceres de pulmón.

- El cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPCNP) incluye todos los tipos de cáncer epitelial, engloba el 85% de los casos. Surgen de las células epiteliales pulmonares, desde los bronquios principales hasta los alvéolos terminales. Los tipos más comunes de CPCNP, de acuerdo a una clasificación histológica, son: el carcinoma de células epiteliales (25% de los cánceres de pulmón), el carcinoma de células grandes (10% de los cánceres de pulmón) y el adenocarcinoma (40% de los cánceres de pulmón). Son un cáncer relativamente insensible a la quimio y radioterapia en comparación con CPCP. Existen ciertos factores de riesgo, como antecedentes de consumo de tabaco, exposición ocupacional al amianto, arsénico, cromo, berilio, níquel, entre otras, antecedentes familiares de cáncer de pulmón, infección por el virus de la inmunodeficiencia humana, entre otros (*Tratamiento del cáncer de pulmón de células no pequeñas (PDQ®)–Versión para profesionales de salud - Instituto Nacional del Cáncer, n.d.*). La metástasis ocurre en hueso y en cerebro (Nasim *et al.*, 2019).

El tratamiento de este tipo de cáncer depende del estadio del mismo. Para estadios tempranos de la enfermedad, la cirugía de remoción del cáncer es el tratamiento de preferencia. Para pacientes con estadio IV del cáncer de pulmón de células no pequeñas, el régimen de quimioterapia es con drogas de platino, por ejemplo con cisplatino, carboplatino (Nasim *et al.*, 2019). Otras drogas usadas para el tratamiento del cáncer de pulmón, con etoposido, carboplatino, paclitaxel (*Tratamiento del cáncer de pulmón de células no pequeñas (PDQ®)–Versión para profesionales de salud - Instituto Nacional del Cáncer, n.d.*).

1.1.4 Cáncer colorrectal

El cáncer colorrectal (CCR) es definido como la presencia de células tumorales en el colon, recto y el apéndice. Se conoce también como cáncer de colon o cáncer de intestino grueso. Este tipo de cáncer se produce en ambos sexos, siendo más común en el sexo masculino, y representa el tercer cáncer más común y la segunda causa de muerte alrededor del mundo. CCR esporádico constituye el 75% de los pacientes, sin

tener factores hereditarios. El 25% restante constituyen pacientes con historia familiar (tanto de primer como de segundo grado) de cáncer de colon, lo que sugiere una contribución genética. El cáncer esporádico es común en personas mayores de 60 años, probablemente como resultado de factores ambientales, dietas (ricas en grasa, principalmente de fuente animal y baja en fibras) y del envejecimiento normal. Otro de los factores de riesgo son personas que tienen enfermedades intestinales inflamatorias como la enfermedad de Crohn, que tienen una vida sedentaria, consumo de alcohol y tabaco, diabetes, obesidad, entre otros (*Cancer Classification | SEER Training*, n.d.).

De los pacientes que padecen cáncer de colon, un 5% desarrolla los síndromes hereditarios autosómicos dominantes (Poliposis Adenomatosa Familiar, PAF) y síndrome de cáncer colorrectal hereditario no polipósico. Estos síndromes tienen varios genes mutados como APC, MLH1, MSH2 y MSH6 (genes reparadores del ADN). Estas mutaciones producen una pronta aparición del tumor, mayor velocidad de progresión, y ocurre a una edad temprana, alrededor de los 40 años (Jasperson *et al.*, 2010).

Los tumores colorrectales presentan un amplio espectro de neoplasias, desde crecimiento benignos hasta cáncer invasivo, y predominan los tumores epiteliales, como adenocarcinomas. Los patólogos han clasificado estas lesiones en tres grupos: pólipos no neoplásico, pólipos neoplásicos (pólipos adenomatosos) y cáncer (Sameer, 2013).

Para su clasificación se han usado 2 sistemas, Dukes y TNM. La clasificación de Dukes propone: A) tumor confinado en la pared intestinal, B) tumor invade a través de la pared intestinal, C) con nódulos linfáticos involucrado, D) con metástasis distante. La clasificación TNM, realiza una descripción más precisa e independiente de los tumores primarios y su propagación (Sameer, 2013).

La mayoría de los cánceres colorrectales, se desarrollan de lesiones pre-neoplásicas, como los pólipos adenomatosos o adenomas. Un modelo multi-etapa de carcinogénesis para el desarrollo de cáncer ha sido propuesto por Vogelstein, quien describe la progresión de un adenoma benigno a un carcinoma maligno a través de etapas histológicas bien definidas. Las características de este modelo son: 1) la activación debido a mutaciones de oncogenes o inactivación de genes supresores de tumores

resultado en carcinogénesis colorrectal; 2) mutaciones de genes que llevan a la transformación maligna y 3) la característica de los genes es dependiente de la acumulación de múltiples mutaciones genéticas en lugar de la secuencia mutada. Estos cambios genéticos resultan en un crecimiento celular no controlado, proliferación y desarrollo tumoral clonal. Su acumulación es la causa del cáncer colorrectal esporádico (Arends, 2000).

1.1.4.1. Vía de señalización Wnt/ β -Catenina

Varios genes están implicados en la patogénesis del cáncer de colon, incluyendo p53, p16, p14, APC, β -Catenina, E-cadherina, factor transformante β (TGF)- β , SMADs, MLH1, MSH2, MSH6, PMS2, AXIN, STK11, PTEN, DCC, y KRAS (Sameer, 2013).

A partir de la búsqueda en la base de datos COSMIC (*Catalogue of Somatic Mutations in Cancer*, Catalogo de Mutaciones Somáticas en Cáncer) con la herramienta Cáncer Browser, se puede observar que dentro de las mutaciones más frecuentes en el cáncer colorrectal, se encuentra en el gen APC, en el 4to lugar, y en el gen de la β -Catenina (CTNNB1) en el 13avo lugar. El gen APC se encuentra mutado en 1612 muestras de 3084 muestras analizadas, es decir un 52%. Y el gen CTNNB1 está mutado en 180 muestras de 2957 muestras analizadas, es decir un 6% (figura 1.1.4.1) (*Cancer Browser*, n.d.).

β -Catenina transactiva muchos genes *target*, los cuales estimulan la proliferación celular (actúan como oncogenes) o inhiben el proceso de apoptosis. Los niveles de β -Catenina en la célula son regulados por su asociación con la proteína supresora de tumores APC, axina y GSK-3 β (quinasa sintasa serina-treonina glucógeno, fosforila a β -Catenina). La fosforilación por el complejo APC-axin-GSK-3 β lleva a la degradación de la β -Catenina por el sistema ubiquitinina-proteosoma.

La proteína β -Catenina presenta mutaciones en el 10% de los casos de colorrectal esporádico aproximadamente. Estas son mutaciones puntuales o deleciones en el marco de lectura en los residuos de serina y treonina que son fosforilados por GSK-3 β . Estas mutaciones resultan en una estabilización de la β -Catenina y la activación de la vía Wnt (Sameer, 2013).

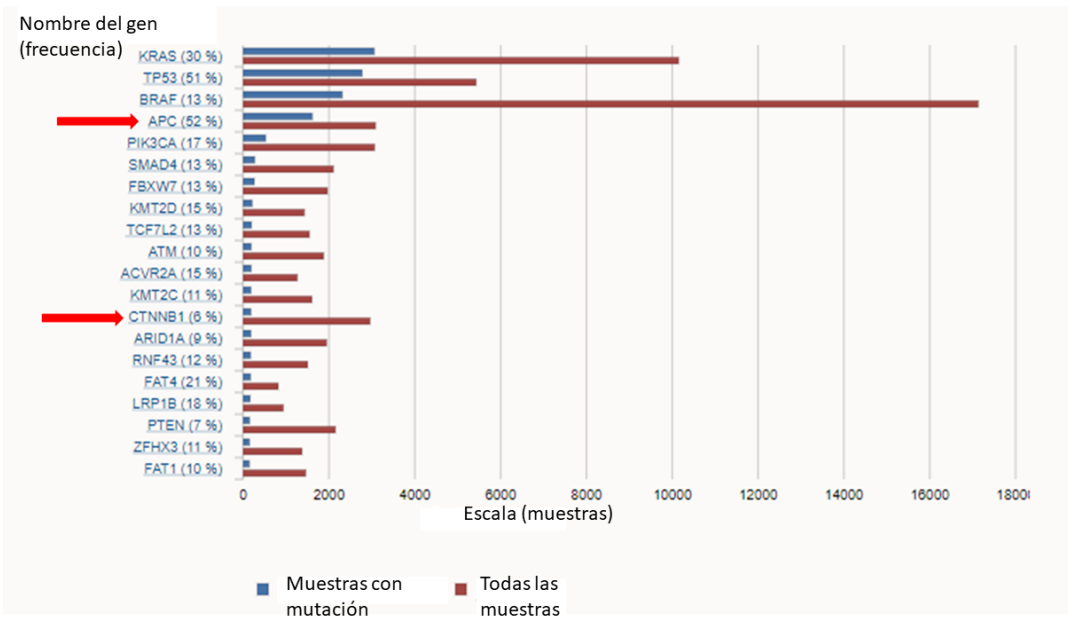


Figura 1.1.4.1. Lista de los 20 genes encontrados con mayor frecuencia en muestras con adenocarcinoma de colon. Flechas rojas señalan al gen APC y CTNNB1. (Cancer Browser, n.d.).

Wnt es el principal regulador de la β -Catenina. En ausencia de ligandos Wnt, β -Catenina se mantiene en bajos niveles en el citoplasma a través del sistema ubiquitina-proteosoma (Shang *et al.*, 2017). Debido a la activación aberrante de Wnt o mutaciones genéticas de los componentes de Wnt, o en el gen de β -Catenina o bien mutaciones en el complejo de destrucción de la misma, β -Catenina se acumula en el citoplasma y se transloca al núcleo. Consecuentemente se une a LEF-1/TCF4 y a otros co-reguladores para promover la transcripción de genes target como Jun, c-Myc y ciclina D-1, muchos de los cuales codifican oncoproteínas. Elevados niveles de β -Catenina en el citoplasma y en el núcleo, siempre induce a rasgos tumorigénicos y promueve la proliferación de células cancerígenas y su supervivencia. Además promueve la progresión tumoral por inhibición de las células T. La acumulación nuclear de β -Catenina se observa en casi el 80% de los CCR (Shang *et al.*, 2017).

Existe una asociación entre la señalización de la vía Wnt/ β -Catenina, y la iniciación de cáncer, debido a que ayuda a mantener la capacidad indiferenciada de las células, controlando su proliferación en la base de las criptas, migran hacia arriba y actúan como iniciadoras del tumor (Shang *et al.*, 2017). La señalización por β -Catenina, promueve:

- Angiogénesis: las mutaciones activas están asociadas a una mayor invasión micro y macrovascular en cáncer, estimula la expresión de factores angiogénicos como MMP-2, MMP-9, VEGF-A, VEGF-C y bFGF,
- Replicación celular: regula las vías de señalización que producen la auto renovación y juegan un rol central en el control de los genes de pluripotencia,
- Escape de la muerte celular programada: bloquea el proceso de anoikis (apoptosis inducida por la pérdida de anclaje de la célula a la matriz extracelular o porque las interacciones célula-matriz son insuficientes o inapropiadas) y promueve el crecimiento independiente de anclaje por la disminución en la expresión de DAPk-2 (proteína quinasa asociada de muerte-2),
- Señales de proliferación,
- Invasión y metástasis: activado por hipoxia contribuye a aumentar el potencial metastásico de las células cancerígenas,
- Cambios en el metabolismo energético celular,
- Escape inmune del cáncer

Y esta vía suprime:

- La respuesta inflamatoria provocada por el tumor (*CTNNB1 Hallmarks of Cancer*, n.d.).

1.2 Características patológicas del cáncer

1.2.1 Apoptosis

Apoptosis o muerte celular programada es un proceso normal que ocurre durante la embriogénesis, y en otros procesos fisiológicos como en la destrucción normal de las células del intestino, entre otros, necesarios para mantener la homeostasis celular. Así mismo es importante en ciertas condiciones patológicas, por ejemplo la muerte celular inducida por fármacos contra el cáncer, depleción de los linfocitos CD4⁺ en la infección por VIH (virus de la inmunodeficiencia humana) y muerte celular en enfermedades neurodegenerativas (Wong, 2011).

Durante la apoptosis se llevan a cabo cambios morfológicos característicos del proceso, que involucra tanto al núcleo como al citoplasma. Entre estos cambios claves se puede enumerar:

- Pérdida de simetría de la membrana plasmática,
- Condensación del citoplasma, acompañada de redondeo celular y pérdida de su volumen (picnosis),
- Condensación de la cromatina,
- Clivaje internucleosomal del ADN,
- Formación de estructuras tipo “burbuja” en la membrana plasmática,
- Modificación de las organelas citoplasmáticas,
- Formación de cuerpos apoptóticos, que son rápidamente eliminados por células fagocíticas.

Estos cambios morfológicos, son acompañados por cambio bioquímicos. Estos eventos incluyen activación de caspasas, liberación de citocromo C de las mitocondrias, externalización de la fosfatidilserina en la membrana plasmática, clivaje de la poli ADP ribosa polimerasa y fragmentación internucleosomal del ADN en múltiples oligonucleosomas de 180-200 pares de bases por endonucleasas (Wong, 2011) (Sundquist *et al.*, 2006). Un evento temprano del proceso de apoptosis es la externalización de la fosfatidilserina a la parte externa de la membrana plasmática. Esto permite el reconocimiento de las células muertas por los macrófagos, resultando en la fagocitosis, sin liberar componentes proinflamatorios (Wong, 2011).

Otro de los eventos que se producen durante el proceso de apoptosis es la activación de las caspasas. Estas enzimas están presentes como zimógenos, que al ser clivados por estímulos específicos se activan, iniciando por las caspasas iniciadoras (2, 8, 9 y 10) y luego la activación de las caspasas efectoras (3,6 y 7) (Sundquist *et al.*, 2006).

El proceso de apoptosis puede ocurrir por la vía extrínseca o intrínseca. La primera vía, son iniciadas generalmente por un estímulo externo que involucra a la familia de receptores de muerte. La señalización a través del receptor FADD (Fas asociado al dominio de muerte) resulta en apoptosis. La unión de ligandos de la familia TNF (FasL y

TRAIL) a los receptores de muerte (Fas, TNFR1, etc.) en la membrana plasmática, libera la caspasa 8, para formar el complejo de inducción de muerte (DISC), la cual activa o amplifica la activación de caspasa-3. Esto permite la salida de citocromo C de la mitocondria, y la formación del apoptosoma, y la activación de la caspasa 9.

La segunda vía, es iniciada por un estímulo intrínseco, como daño en el ADN, sobrecarga de calcio en el citosol, inanición celular, estrés oxidativo, entre otros. Sin importar el estímulo, esta vía resulta en un aumento de la permeabilidad mitocondrial y la liberación de proteínas pro-apoptóticas al citoplasma. Involucra a proteínas miembros de la familia Bcl-2. Hay 2 grupos de proteínas de Bcl-2, llamadas pro-apoptóticas (Bax, Bak, Bas, Bcl-Xs, Bid, Bik, Bim y Hrk) y las anti-apoptóticas (Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-W, Bfl-1 y Mc1-1). Las proteínas anti-apoptóticas regulan la apoptosis por bloqueo de la liberación del citocromo C, mientras que las pro-apoptóticas actúa promoviendo dicha liberación. El Citocromo C interactúa con Apaf-1, dATP y pro-caspasa 9 para formar el apoptosoma, activando la caspasa 9 y luego caspasa 3.

Ambas vías se unen en una vía en común. Convergen en la activación de la caspasa 3, la cual cliva el inhibidor de la desoxirribonucleasa, esta es responsable de la fragmentación del ADN. Luego inducen el clivaje de quinasas, proteínas del citoesqueleto. También afecta el ciclo celular y vías de señalización, las cuales contribuyen a los cambios morfológicos típicos durante el proceso de apoptosis.

En ambas vías, los eventos tardíos de la apoptosis ocurren luego de la activación de las caspasas y se bloquea el acceso de las enzimas que reparan el ADN, provocando apoptosis (Wong, 2011).

Las mitocondrias actúan como regulador central de la vía intrínseca en la apoptosis y mediador-efector de la vía extrínseca. Las señales pro-apoptóticas, pueden inducir la desestabilización de la membrana mitocondrial, la formación de poros, lo que produce una disipación del potencial de membrana mitocondrial (PMM) y la liberación de proteínas de la membrana interna mitocondrial, incluyendo el citocromo C. Estos eventos activan el apoptosoma y por ende la cascada de caspasas, y otras proteínas que tienen implicancia en el proceso de apoptosis. La disipación del PMM define los eventos

tempranos de la apoptosis, precediendo a la fragmentación de ADN, producción de ERO y aumento de la permeabilidad de la membrana plasmática. Este proceso está graficado en la figura 1.2.1.1.

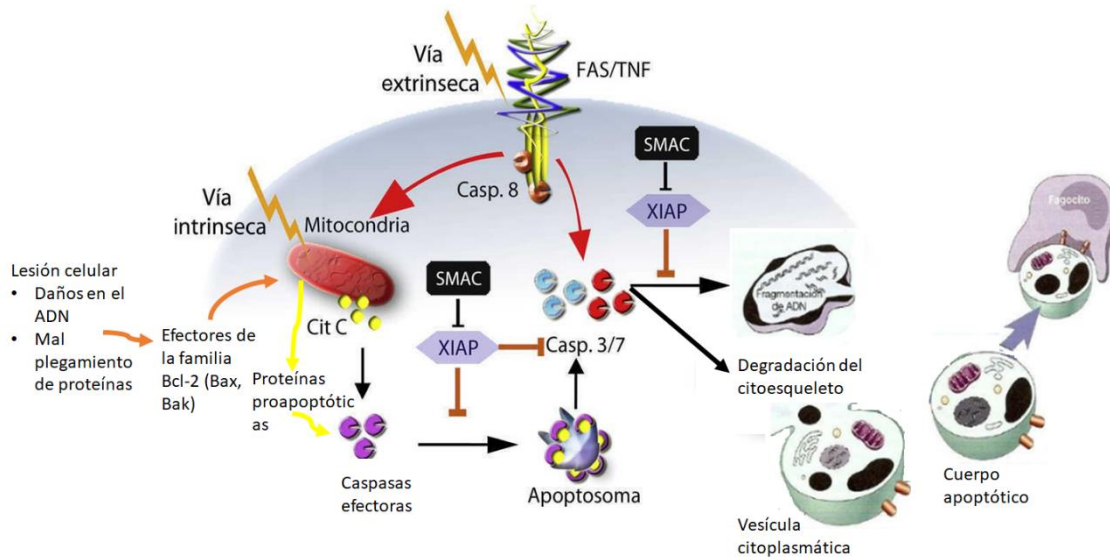


Figura 1.2.1.1. Representación gráfica del proceso de apoptosis. Vía intrínseca y extrínseca.

La inducción inapropiada de apoptosis tiene implicaciones patológicas y han sido asociadas a ciertas patologías, como enfermedades neurodegenerativas, rechazo de trasplantes, cáncer, entre otras (Cycle, n.d.). En lo que respecta al cáncer, como ya se mencionó, esta patología resulta de una sucesión de cambios genéticos, en la cual una célula normal es transformada en una maligna, y la evasión de la muerte celular es uno de los cambios esenciales que causan esta transformación maligna. La reducción del proceso de apoptosis o su resistencia juega un rol clave en la carcinogénesis. Uno de los mecanismos por los cuales ocurre la evasión de este proceso es (figura 1.2.1.2.) la alteración del balance entre las proteínas pro y anti-apoptóticas. Dentro de esta clasificación, se encuentran incluidas: 1) la alteración de las proteínas inhibidoras de apoptosis (IAPs), que inhiben las caspasas, 2) reducción en la función de las caspasas, 3) disrupción de la señalización a través del receptor de muerte, en consecuencia no inicia la cascada de señalización y 4) disminución en la expresión de receptores, relacionado con los mecanismos de resistencia adquirida a drogas (Wong, 2011).

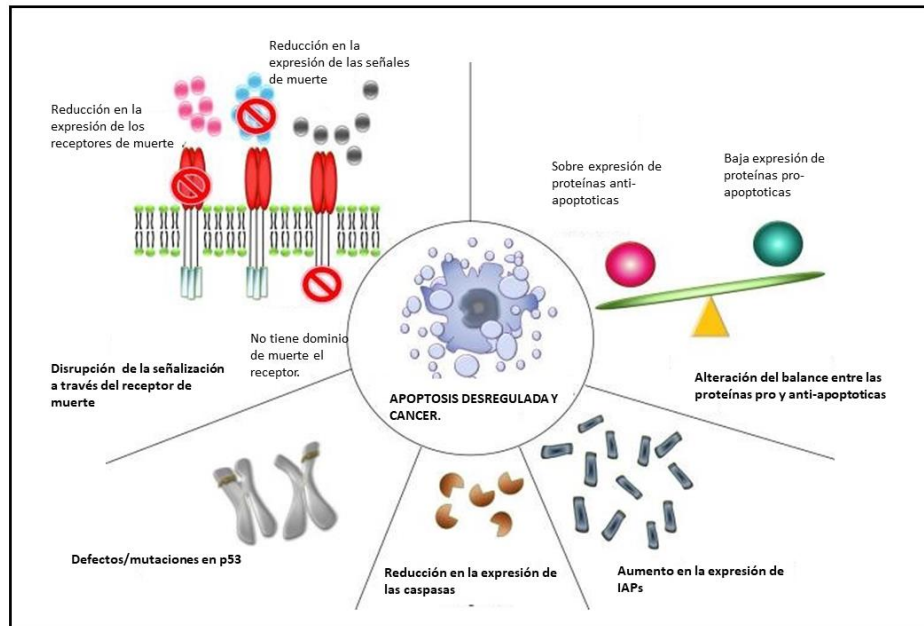


Figura 1.2.1.2. Mecanismos alterados en apoptosis y el proceso de carcinogénesis. Imagen adaptada de (Wong, 2011).

1.2.2 Ciclo Celular

Las células proliferan sosteniendo el crecimiento del organismo, manteniendo los tejidos y reemplazando células dañadas. La proliferación es una respuesta fundamental que responde a mecanismos celulares involucrados en la inmunidad, hematopoyesis, neoplasias, inflamación y otras respuestas biológicas.

En el ciclo celular hay 3 etapas: G1, las células monitorean su ambiente y debido a señales inducen el crecimiento, a través de la síntesis de ARN y proteínas. Si las condiciones son las adecuadas, el ciclo avanza a la 2da etapa, fase S, donde ocurre la síntesis de ADN y se replican los cromosomas, y finalmente ocurre la fase G2, en la cual continúa el crecimiento y la célula se prepara para la mitosis. El resultado final de la mitosis, fase M, es la formación de 2 células hijas, que contienen el mismo material genético de la célula parental. Finalmente ocurre la citocinesis, que se inicia en la telofase mitótica. Existe una fase llamada G0, en donde las células permanecen quiescentes y están en un estado de no división, que se activan e ingresan en el ciclo por la reactivación de algunos genes antes distintos estímulos. Estas fases están representadas en la figura 1.2.2.1.

Proteínas, llamadas ciclinas, se expresan durante las diferentes fases del ciclo, y regula a las quinasas dependiente de ciclinas (CDKs), cuya fosforilación de sustratos claves, fuerza a la progresión del ciclo celular. Existen controles extras que garantizan que un proceso sea completado antes que inicie el siguiente.

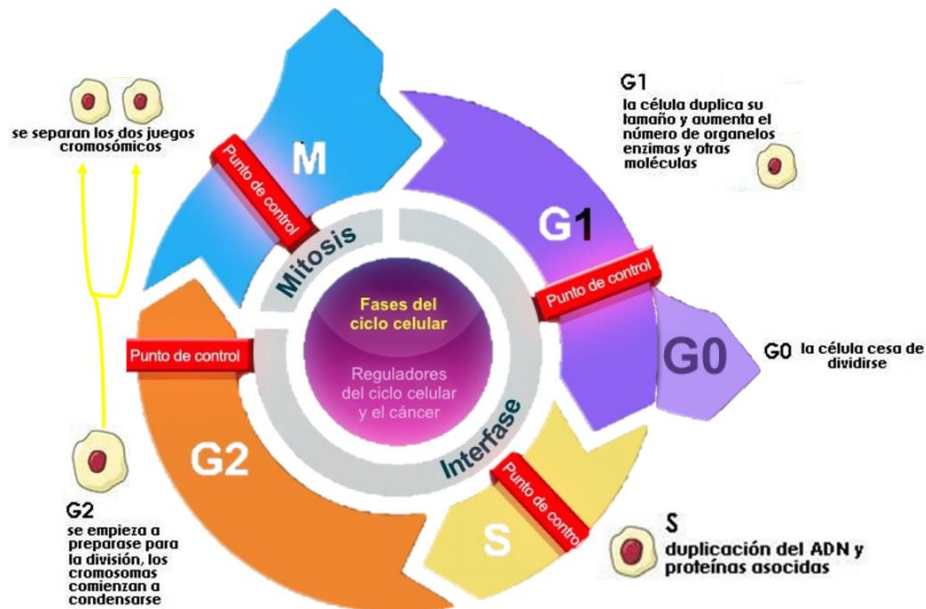


Figura 1. 2.2.1. Representación esquemática del ciclo celular. Imagen adaptada de (El ciclo celular eucariote y el cáncer, n.d.)

El cáncer se caracteriza por una proliferación tumoral no controlada, resultado de la actividad alterada de varias proteínas del ciclo celular (Otto & Sicinski, 2017). Durante el ciclo celular existe un equilibrio entre mitosis y apoptosis que regula la población celular de cada tejido, si este equilibrio se rompe, la célula es capaz de repetir de manera indefinida el ciclo y termina por generar una célula tumoral.

Muchas mutaciones oncogénicas ejercen sus efectos sobre los componentes de la vía de señalización, forzando la progresión del ciclo celular en lugar de los controles normalmente regulados (Sherr & Bartek, 2017). Por ejemplo, componentes de la vía Ciclina D1/CDK4/6-RB (permite la transición de G0/G1 a la fase S) están comúnmente mutados en procesos cancerígenos. Muchos estudios revelaron que ciclina D1, CDK4/CDK6 son requeridas para la iniciación del tumor y su continua expresión para el mantenimiento del mismo (Otto & Sicinski, 2017).

Otras mutaciones, por ejemplo, alteran la respuesta ante la presencia del ADN dañado y los mecanismos de control, permitiendo una consolidación de daño genómico y provocando aneuploidía o catástrofe mitótica, o ambas (Sherr & Bartek, 2017). Las células cuentan con puntos de control para detener la progresión del ciclo celular en respuesta al daño en el ADN, por lo que su mutación produce alteraciones que pueden provocar la formación de tumores (Otto & Sicinski, 2017). El factor de transcripción nuclear p53 activado promueve el arresto del ciclo celular para permitir la reparación de ADN o para inducir apoptosis (dependiendo del nivel de daño en el ADN) previniendo la propagación de células con ADN dañado. p53 tiene la función de mantener la integridad genómica. Científicos demostraron que aproximadamente el 50% de los cánceres tiene pérdida de función de p53 por mutaciones en el gen, sugiriendo que este factor es un supresor de tumores. Este p53 mutado, además de ser pro tumorigénicos, también genera quimio resistencia (Ozaki & Nakagawara, 2011).

Como conclusión, los puntos de control en el ciclo celular son esenciales para detener la progresión del mismo en respuesta al daño en el ADN, dando tiempo para permitir la reparación del mismo (Otto & Sicinski, 2017).

1.2.3 Alteraciones estado redox

Especies reactivas del oxígeno, es un término colectivo que se refiere a especies, inestables y reactivas, reducidas derivadas del oxígeno, que se originan como productos de procesos fisiológicos normales. Estas especies reactivas incluyen peróxido de hidrógeno (H_2O_2), anión superóxido (O_2^-), ácido hipocloroso (HOCl), oxígeno singlete ($O_2\cdot$) y radical hidroxilo ($OH\cdot$). Estas son esenciales para varios procesos biológicos en células normales y cancerígenas. Existe un sistema de balance intracelular, siendo los sistemas glutatión (GSH) y tiorredoxina (Txn), las principales enzimas implicadas. Estas reacciones pueden observarse en la figura 1.2.3.1.

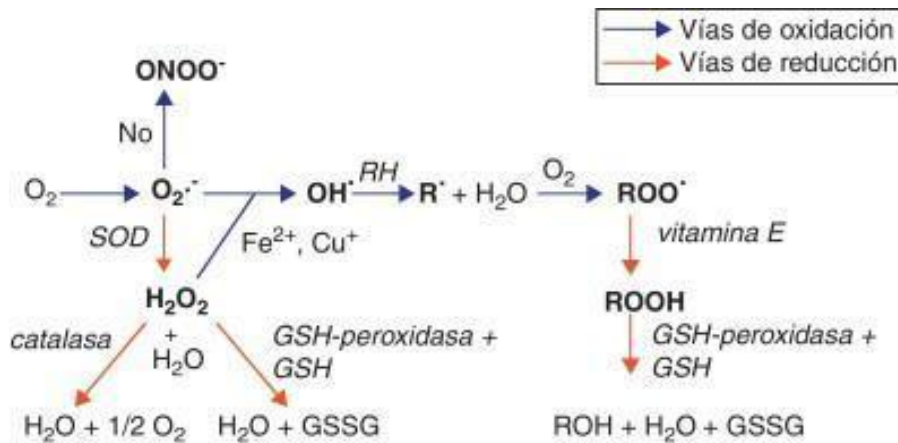


Figura 1.2.3.1. Reacciones de producción de especies reactivas del oxígeno, así como del sistema antioxidante.

La desproporcionalidad en la homeostasis del redox, es inducida por el aumento de radicales libres, en especial ERO. Los mismos son originados por: 1) vía intrínseca, cuyas principales fuentes son: mitocondria, células inflamatorias y varios complejos enzimáticos, y 2) fuentes extrínsecas, incluyen toxinas ambientales pro-oxidantes, radiaciones, y diversos compuestos químicos, incluyendo alcohol, tabaco, y ciertas drogas.

Cuando están en altas concentraciones, estas especies dañan a proteínas, lípidos y ADN, dando lugar a la senescencia o lesiones fatales en las células. Por lo tanto, cualquier alteración en el balance redox está relacionado a patologías, incluyendo el cáncer. En esta patología, están involucrados en mecanismos de iniciación, progresión y metástasis (J. Wang & Yi, 2008). Una concentración moderada de ERO, activa cascadas de señalización que llevan a la supervivencia celular, como las vías MAPK/ERK1/ERK2, p38, c-Jun, fosfoinositol-3-quinasa/protein quinasa B (PI3K/Akt), que activa la vía NFκB, metaloproteinasas (MMPs) y factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (Yang *et al.*, 2018).

Por otro lado, la producción de ERO es un mecanismo de acción común en quimioterapia, radioterapia y terapia fotodinámica, debido a su capacidad de producir apoptosis, en consecuencia son considerados supresores de tumores (J. Wang & Yi, 2008; Yang *et al.*, 2018). La producción de ERO que se genera en una célula cancerígena produce un estado irreversible de estrés oxidativo. Una de las consecuencias de este

mecanismo de acción es la activación de receptores celulares y mitocondriales que desencadenan apoptosis, por ejemplo, el aumento de ERO induce la activación de FAS, lo cual lleva a la activación de caspasa 8, y la inducción de apoptosis. El efecto en las mitocondrias está caracterizada por la apertura de poros, permitiendo la liberación de citocromo C, la formación del apoptosoma y la consecuente activación de caspasas. Las especies reactivas del oxígeno, impactan en la estabilidad de los poros de dos maneras, a través de cascadas de señalización y a través de la modificación oxidativa de los componentes del complejo de proteínas que constituyen los poros. Otra consecuencia del aumento de ERO con la terapia, es el aumento de GSH, el mismo ha sido asociado al desarrollo de resistencia a quimioterapia, por lo que al agotar el sistema antioxidante con el aumento de especies reactivas del oxígeno, disminuye la capacidad de la célula para defenderse y en consecuencia estas células son eliminadas (Yang *et al.*, 2018).

Debido a lo antes expuesto, muchas drogas son desarrolladas, buscando incrementar la generación de EROs (figura 1.2.3.2). Hay dos razones por las cuales las especies reactivas del oxígeno aumentan durante la quimioterapia, 1) la producción de ERO se genera directamente en las células tumorales y 2) la inhibición del sistema antioxidante en estas células. (Yang *et al.*, 2018). Algunos grupos de investigación han demostrado que el tratamiento con agentes que producen EROS puede mejorar los efectos de la terapia tradicional. Por ejemplo, emodin, por aumento de ERO, puede aumentar la citotoxicidad de drogas dependientes de ERO, como CisPt doxorubicina y taxanos en una variedad de tipos de cáncer. Otra manera de aumentar la producción de ERO directamente, es interferir con el sistema antioxidante, lo que resulta en un exceso de ERO, provocando la muerte celular. El sistema GSH, está compuesto por NADPH, glutatión reductasa (GR), y glutatión (GSH). El contenido de GSH es regulado por enzimas como glutatión peroxidasa (GPx), glutatión reductasa (GR) y glutatión transferasa (GST) (Yang *et al.*, 2018).

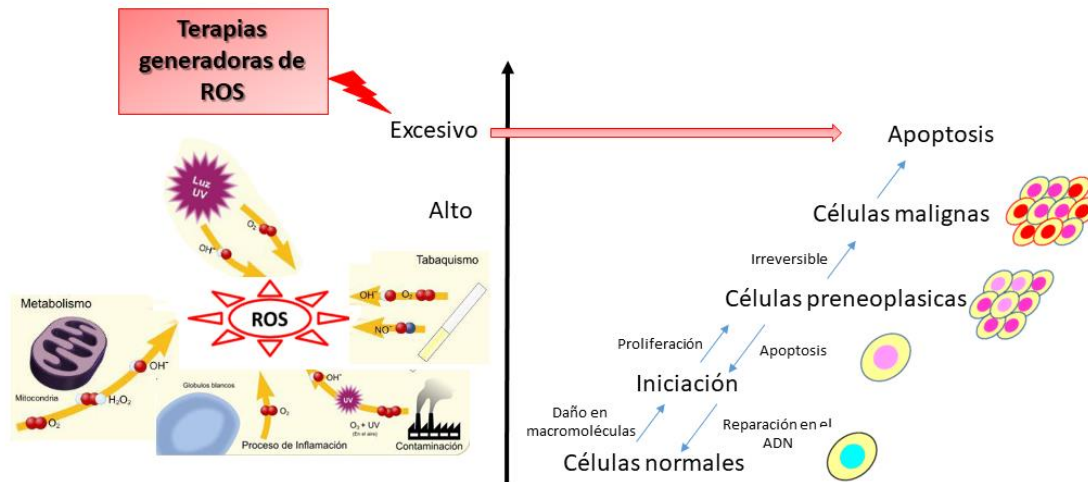


Figura 1.2.3.2. Acción de las terapias que generan aumento de especies reactivas del oxígeno. El nivel de ROS en las células malignas es alto, la finalidad de la terapia es producir un aumento tal que la células no tengo defensas y se produzca apoptosis.

1.2.4 Angiogénesis

Angiogénesis es un proceso biológico complejo, en el cual se forman nuevos capilares sanguíneos a partir de una vasculatura pre-existente, de esta manera provee oxígeno y nutrientes a los tejidos. Consiste en 4 pasos consecutivos: 1) degradación de la membrana basal y otros componentes de la MEC que rodean a los vasos sanguíneos, por enzimas proteolíticas, 2) activación y migración de las células endoteliales, 3) proliferación de las células endoteliales y 4) transformación de las células endoteliales en estructuras tubulares para la formación de los capilares y el desarrollo de nueva membrana basal.

Durante el desarrollo tumoral, el proceso de angiogénesis está siempre activado, pasando de la formación de vasos quiescentes a continua y generando así nuevos vasos que ayudan a mantener la expansión del crecimiento neoplásico. El proceso de angiogénesis tumoral se activa principalmente cuando una lesión tumoral supera el punto del tamaño máximo, alrededor de 1-2 mm³, lo que permite mantenerse por difusión de oxígeno y nutrientes (Aplin & Nicosia, 2016). Diferentes tipos de reguladores son liberados desde las células endoteliales, células tumorales, células del estroma y de la matriz extracelular. Así mismo, mutaciones genéticas, que activan oncogenes o inhiben supresores tumorales, estrés metabólico, estrés mecánico, y la respuesta inflamatoria son estímulos importantes para la angiogénesis. La hipoxia es uno de los

factores principales que promueve este proceso, ya que causa el aumento en la expresión del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (juega un rol clave en el proceso de angiogénesis), estimula a las células endoteliales de la vasculatura pre-existente a dispersarse y migrar en el tejido hipóxico, con el resultado final de la supervivencia celular. Además, las enzimas que remodelan la matriz extracelular, particularmente las metaloproteinasas, producen varios cambios en el microambiente tumoral por la degradación de la misma, principalmente MMP-9 y MMP-2 clivan proteolíticamente al factor de crecimiento transformante β (TGF- β), con la consecuente activación del mismo (Aslan *et al.*, 2019; T. Li *et al.*, 2018).

Luego de varios pasos, los vasos sanguíneos maduran y son capaces de transportar nutrientes, oxígeno y factores de crecimiento para suplir las necesidades de los tejidos tumorales para facilitar su crecimiento, además de permitir que las células cancerígenas se dispersen a órganos distantes a través de la sangre (Li *et al.*, 2018) (Aslan *et al.*, 2019). Este proceso se puede observar resumido en la figura 1.2.4.1.

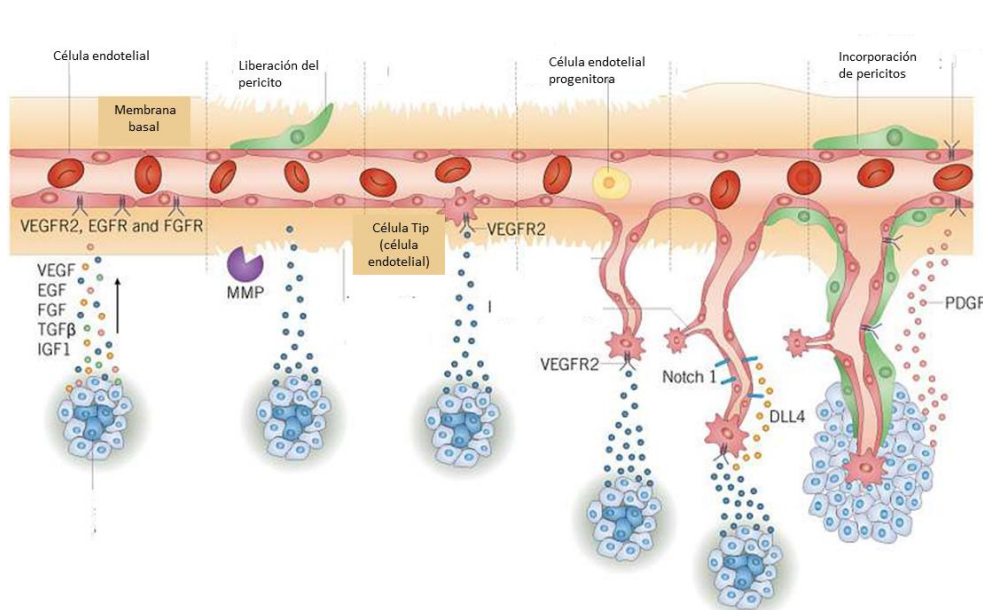


Figura 1.2.4.1. Etapas del proceso de angiogénesis en un tumor. Imagen adaptada de Cancer Research Product Guide Edition 3, 2015.

1.2.5 Invasión y Metástasis

La migración celular es una actividad altamente regulada, ocurre en procesos fisiológicos normales, como la embriogénesis, la reparación de tejidos, y angiogénesis. Así como en procesos patológicos, como en los tumores malignos, debido a que juega un rol clave durante la invasión y la metástasis. Durante la migración, las células forman monocapas e interactúan mecánica y bioquímicamente a través de las uniones célula-célula, en el que están involucradas complejas vías de señalización (Figura 1.2.5.1).

Las células malignas pueden diseminarse a través de procesos complejos, para ellos deben atravesar barreras histológicas, la membrana basal, estroma y la lámina basal de la vasculatura, dominado por una red de fibrillas de colágeno I, para moverse en la circulación y diseminarse a sitios distantes. Este proceso es el resultado de una compleja interacción entre las células cancerígenas y el medio ambiente en los tumores sólidos, conocido como “microambiente tumoral”. Varias clases de proteínas, involucradas en el anclaje de las células a la MEC están alteradas, como por ejemplo los miembros de la familia de cadherinas calcio dependiente e integrinas. Las células cancerígenas penetran en la MEC por la formación de invadopodias, responsables de facilitar la diseminación hematogena o linfática (Riahi *et al.*, 2012). Además, se producen modificaciones proteolíticas por proteasas, como las metaloproteinasas (MMPs), las cuales ayudan en la penetración de las células a la MEC (Hall & Brooks, 2014). Estas enzimas están altamente implicadas en la diseminación de las células tumorales (Winer *et al.*, 2019). Son miembros de una familia de 24 endopeptidasas zinc (Zn) dependientes. La síntesis, así como la actividad de las MMPs está altamente regulada para prevenir la degradación excesiva de la MEC. Las MMPs son secretadas como zimógenos, están inactivadas por la unión del Zn a su dominio catalítico y la unión de un grupo cisteína-sulfhídrico en el dominio N-terminal. Su activación requiere la remoción de estas uniones, que puede ocurrir luego de la secreción o en el interior celular. La activación completa es llevada a cabo por un proceso de auto catálisis en la cual la proteinasa cliva su pro-dominio. Su inactivación puede ser llevada a cabo por ella misma, y su actividad es también regulada por inhibidores de metaloproteinasas (TIMPs), y por inhibidores no específicos como la α 2-macroglobulina, trombospondina 1 y 2, etc. Las MMPs participan del proceso de

invasión cancerígena en varios aspectos, entre los que se puede nombrar, contribuyen a la angiogénesis, evaden el proceso de apoptosis y el sistema inmune

En varios tipos de tumores sólidos, hay sobreexpresión de MMPs, y ha sido relacionado con angiogénesis, progresión tumoral y bajo nivel de supervivencia. Por ejemplo, la sobreexpresión de MMP-9 ha sido asociada a un mal pronóstico en múltiples tumores malignos como tumor de mama, pulmón, colon, gástrico, pancreático y cáncer de próstata (Winer *et al.*, 2019). Evidencias clínicas han implicado a las MMPs en invasión tumoral, neoangiogénesis y metástasis y representan un *target* para terapia anticancerígena (Winer *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2019).

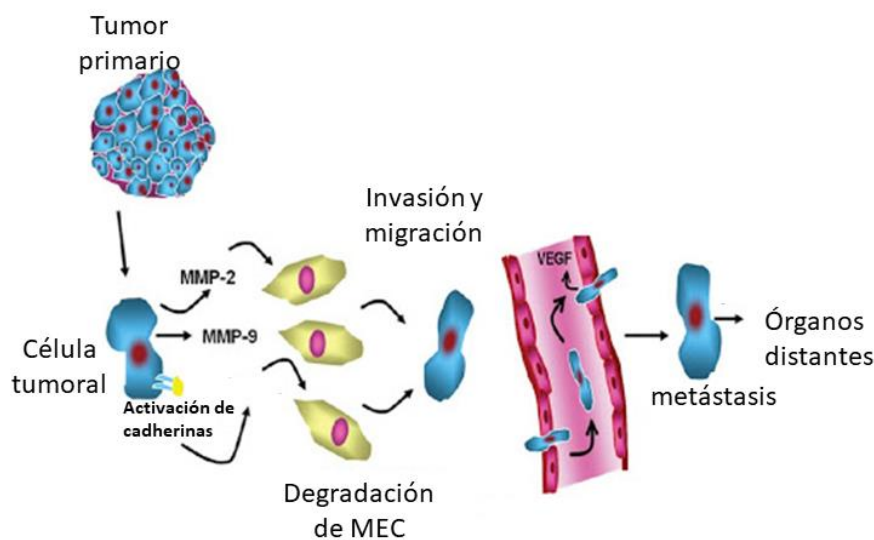


Figura 1.2.5.1. Representación gráfica del proceso de metástasis durante la carcinogénesis.

1.2.6 Vía Nf- κ B

El Factor nuclear NF- κ B, es una familia de 5 factores de transcripción, incluyendo NF- κ B1/p105, NF- κ B2/p100, RelA/p65, RelB y c-Rel, los cuales pueden formar heterodímeros u homodímeros y unirse a secuencias consenso de promotores en el ADN. Esta familia de proteínas controla la expresión de genes involucrados en varios procesos fisiológicos, como en la respuesta inflamatoria, en la proliferación, diferenciación, adhesión celular y apoptosis. NF- κ B está en el citoplasma inactivo, unido

a I κ B α , puede ser activado por varios estímulos, como por citoquinas (TNF- α , IL-1 β), factores de crecimiento epidermal, productos virales o bacterianos, radiaciones ionizantes, especies reactivas del oxígeno, daño en el ADN y estrés oncogénico. Tras la activación, el complejo NF κ B ingresa al núcleo, donde puede activar la expresión de genes que tienen sitio de unión para NF- κ B. Luego de la activación de ciertos genes, NF- κ B, activa la expresión del represor I κ B α , el cual re-inhibe a NF- κ B y genera una retroalimentación, que resulta en la oscilación de NF- κ B (Hee Park & Tae Hong, 2016).

La regulación estricta de NF- κ B es indispensable para la integridad de la función celular, por lo que su alteración contribuye al desarrollo de enfermedades autoinmunes y desórdenes malignos incluyendo artritis reumatoidea, aterosclerosis, esclerosis múltiple y tumores malignos. La translocación de cromosomas asociada a cáncer, mutaciones, deleciones, etc., altera genes que codifican NF- κ B e I κ B, que desacoplan NF- κ B de sus reguladores, causando la activación constitutiva de NF- κ B. Esta activación influye los procesos de tumorigénesis como la iniciación y el desarrollo del mismo, a través principalmente, de 4 mecanismos:

- 1) NF- κ B estimula la proliferación celular e impide la apoptosis,
- 2) NF- κ B regula la angiogénesis tumoral,
- 3) NF- κ B promueve la metástasis a diferentes niveles,
- 4) NF- κ B remodela el metabolismo tumoral.

1.3 Metalofármacos

La quimioterapia es un tipo de terapia contra el cáncer, que involucra la administración de agentes químicos para destruir las células cancerígenas. Los metalofármacos son, dentro de la quimioterapia, los fármacos de uso más extendidos (Ding *et al.*, 2016).

El uso efectivo de la quimioterapia necesita el entendimiento de las características principales de la biología del tumor, la cinética celular, la farmacología así como la resistencia a drogas. Este mayor conocimiento de los roles que tienen los metalofármacos a nivel celular, ayudará a generar nuevas terapias para la clínica al proporcionar una alternativa, dirigida y un enfoque racional, también permite la

suplementación con otras drogas. La gran cantidad de compuestos basados en metales, continúa progresando a través de los ensayos clínicos, los cuales demostraron el potencial de nuevos compuestos que contienen metales (Boros *et al.*, 2020).

1.3.1 Definición y características de los metalofármacos

Los metalofármacos son el resultado de la unión entre una molécula orgánica con una molécula inorgánica y un metal, el metal es el ingrediente activo. Son compuestos que tienen el potencial de combatir diferentes patologías, entre ellas el cáncer. Estos nuevos fármacos son producto de la química bioinorgánica que amplía el panorama de la industria farmacéutica (Baran, 2014).

Como consecuencia del gran avance de la química bioinorgánica, tiene interesantes aplicaciones en varios campos, como en catálisis y la ciencia de los materiales, en procesos de descontaminación del medio ambiente, por ejemplo, y también una gran aplicación en la medicina y la farmacología. Con respecto al último campo de aplicación, se ha aseverado que la mayoría de los elementos de la tabla periódica, son potencialmente adecuados para el diseño de nuevas drogas o de agentes diagnóstico (Baran, 2014).

Los metales y los compuestos basados en metales han sido usados con propósitos medicinales por mucho tiempo, como el mercurio y el arsénico, en el tratamiento de sífilis. Robert Koch demostró que el complejo de $K[Au(CN)_2]$ era letal *in vitro* para el *Mycobacterium tuberculosis*, iniciando así la utilización de compuestos de oro en medicina.

El descubrimiento de la actividad anti proliferativa del *cis*-dicloroamino-platino (II), *cis*- $[Pt(NH_3)_2Cl_2]$, por Barnett Rosenberg y colaboradores en 1968, fue lo que disparó el interés por las terapias con metales. Desde entonces, el descubrimiento de los iones metálicos con propiedades medicinales se ha expandido a un amplio rango en terapias y diagnóstico (Baran, 2014; McQuitty, 2014).

Los metalofármacos tienen variadas aplicaciones en el tratamiento de ciertas enfermedades, como antiartrítico (compuestos de oro), tratamiento para úlceras

(compuestos de bismuto), inflamación, enfermedades neurodegenerativas, metales con actividad insulinoimética (compuestos de vanadio), vasodilatadores (compuestos con hierro con nitroprusiato de sodio) y como agentes antimicrobianos y antitumorales (McQuitty, 2014) (X. Wang *et al.*, 2019).

La mayor ventaja de las metalodrogas es su diversidad biológica y química:

- Poseen una variedad de geometrías incluyendo, cuadrada plana, cuadrada piramidal, tetraédrica, trigonal bipyramidal, formas octaédricas, entre otras, dependiendo de los números de coordinación del ion metálico central que otorgan a los complejos una amplia gama de actividades biológicas.
- El ion metálico tiene características físicoquímicas únicas, por ejemplo, iones metálicos con múltiples estados de oxidación, pueden hacer que el complejo tenga un comportamiento redox y exhiban nuevos mecanismos de acción en los procesos biológicos.
- Complejos metálicos con metales luminiscentes tienen potencial diagnóstico con excelentes características ópticas. Métodos de diagnóstico con metalodrogas radioactivas y magnéticas han sido usadas como agentes de contraste en resonancia magnética, tomografía de emisión positrón y tomografía computarizada de emisión de fotones. (X. Wang *et al.*, 2019)

De manera sinérgica, los ligandos de los iones metálicos contribuyen a la actividad farmacológica de la metaldroga. Considerando la gran influencia de los ligandos en la termodinámica y la cinética de los complejos metálicos, modificaciones o sustituciones del ligando pueden afinar la actividad biológica de las metalodrogas (X. Wang *et al.*, 2019).

Los metalofármacos, pueden actuar como agentes antimicrobianos. Ejemplos de ello, lo constituyen compuestos de plata, usados como antimicrobianos por muchos años, en la forma de AgNO_3 . La ventaja que tiene el uso de este metal, es que es tóxica a bajas concentraciones para las bacterias, no así para el ser humano, que es tóxico a elevadas concentraciones. Un compuesto usado en la clínica para el tratamiento del paciente quemado es el compuesto polimérico sulfadiazina de plata, el cual ha sido incorporado

en varios materiales como vendajes. Otro ejemplo de ellos son los compuestos de cobalto, cobre, níquel y zinc con aminoácidos, fueron testeados contra hongos, contra bacterias Gram positivas y negativas por Chohan y colaboradores (Chohan *et al.*, 2006). Mostraron actividad contra las bacterias *E. coli*, *B.subtilis*, *S. flexneri*, *S.aureus*, *P. aeruginosa* y *S. typhi*, y actividad anti fúngica contra *C. albicans*, *A. flavus*, *M. canis*, *F. solanis* y *C. glaberata*. Algunos complejos de rutenio han mostrado también actividad contra bacterias Gram positivas y Gram negativas, e incluso actividad antiparasitaria, contra la enfermedad de Chagas. Otros compuestos que mostraron actividad antiparasitaria son los complejos de oro con cloroquinolina, contra una cepa resistente de malaria (McQuitty, 2014).

Como drogas antitumorales, el metalofármaco con aplicación mundial y en una amplia gama de tumores es el cisplatino (figura 1.3.1.1). Este quimioterápico es altamente efectivo en el tratamiento de cáncer testicular, ovario, vejiga, cabeza y cuello. También se utiliza para tratar el cáncer de esófago, pulmón, mama, cervical, estómago y próstata. Su uso provocó un cambio en el porcentaje de supervivencia de los pacientes, llegando a un 80-90% de pacientes con cáncer de ovario y testículo que sobreviven. La eficacia de su acción es atribuida a su hidrólisis una vez en el interior celular y su subsecuente unión a las bases nitrogenadas del ADN, que actúan como ligandos nucleofílicos. La formación de aductos, producto de la interacción con las guaninas y adeninas, bloquean la replicación y la transcripción del ADN, desencadenando una cascada de señalización de apoptosis que lleva, finalmente, a la muerte celular (Baran, 2014; McQuitty, 2014).

Algunos tipos de células cancerígenas no responden al tratamiento ya que presentan resistencia intrínseca al CisPt y otros pueden desarrollar resistencia luego de la exposición prolongada a la droga (resistencia adquirida). Una de las principales razones de resistencia es una acumulación reducida de la droga en el interior celular por una disminución en la entrada o un aumento en el eflujo (McQuitty, 2014).

A pesar del gran éxito del CisPt, los pacientes sufren de efectos secundarios importantes como nefrotoxicidad y también en menor medida, neuro y ototoxicidad, náuseas y vómitos. Además, es importante destacar varios efectos de quimioresistencia

reportados para este fármaco. Estos efectos llevaron al desarrollo de nuevos complejos de platino, con las siguientes consideraciones: minimización de los efectos colaterales, mayor solubilidad en agua, mayor actividad y ampliación del espectro de acción (Baran, 2014). Esto da lugar a la síntesis de compuestos de platino (Pt) de segunda generación, como carboplatino (figura 1.3.1.1), el cual tiene menos efectos secundarios, acción atribuida a su hidrólisis más lenta, además el espectro de acción es similar, ya que ha demostrado que tiene acción en la mayoría de las neoplasias en las que el cisplatino ha demostrado su eficacia (Griesinger *et al.*, 2019)(Moncharmont *et al.*, 2011). Otro complejo desarrollado fue un análogo de platino de segunda generación, el oxaliplatino, el cual ha evolucionado como uno de los agentes terapéuticos más importantes para el tratamiento del cáncer colorrectal, (figura 1.3.1.1), además de ser activo frente a cánceres resistentes al cisplatino (Stein & Arnold, 2012)(McQuitty, 2014).

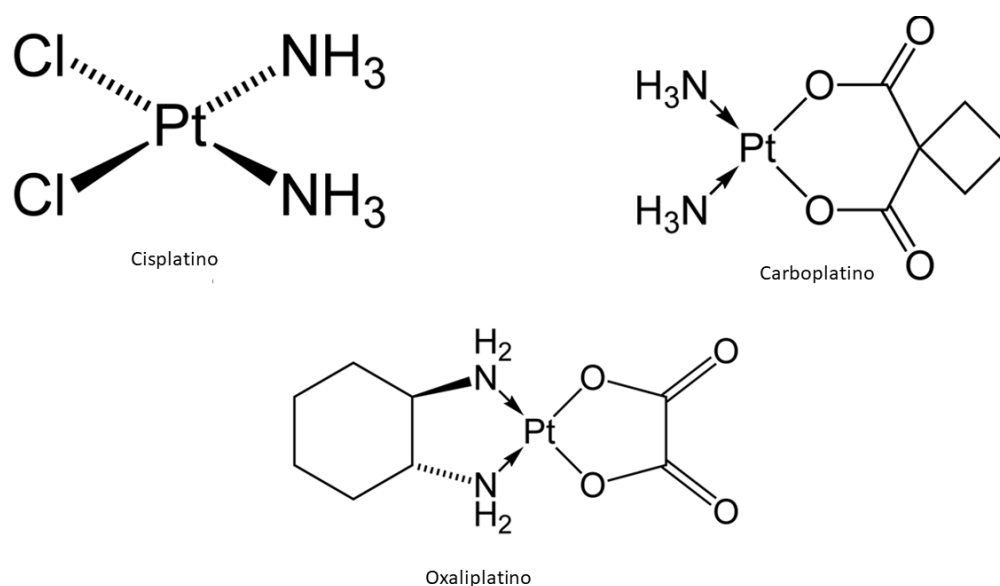


Figura 1.3.1.1. Estructura química de los compuestos de platino: Cisplatino, Carboplatino y Oxaliplatino.

A su vez, la búsqueda de nuevos complejos efectivos contra el cáncer con diferente rango de actividades comparadas con el cisplatino, y sin efectos secundarios, ha llevado a la síntesis de nuevas estructuras, los cuales contienen iones metálicos diferentes al platino.

Nuevos complejos de rutenio y cobre fueron testeados en este trabajo de tesis doctoral con el fin de ampliar la biblioteca de compuestos con actividad antitumoral. Los compuestos de rutenio serán explicados con mayor detalle en el capítulo 2, mientras que los de cobre serán descriptos en el capítulo 3.

1.3.2 Complejos de Rutenio

El descubrimiento de compuestos de platino (Pt) por Barnett Rosenberg en 1960, como se mencionó anteriormente, fue lo que marcó el uso de los metalo-compuestos en el tratamiento del cáncer (Ndagi *et al.*, 2017). La droga antitumoral fue aprobada por la FDA para el uso clínico en el año 1978. El CisPt demostró acción antitumoral, solo o en terapia combinada, contra una amplia gama de tumores sólidos (cuello de útero, vejiga, cabeza y cuello, testicular, etc.). Modificaciones estructurales llevaron al desarrollo del carboplatino (utilizado en el tratamiento de cáncer de ovario, pulmón, cabeza y cuello, cerebro y neuroblastoma) y oxaliplatino (utilizado para tratar el cáncer colorrectal). Pero hay que nombrar sus limitaciones como el desarrollo de resistencia, un espectro limitado de actividad y sus efectos secundarios como nefro, neuro y mielotoxicidad, náuseas, vómitos, daños en los nervios, bajos niveles de magnesio, potasio y calcio en sangre y bajo número de glóbulos rojos (Meier-Menches *et al.*, 2018)(Pal *et al.*, 2018). Así mismo el avance de la biología celular-molecular y la combinación con la química, encaminaron el diseño racional de nuevos compuestos químicos que tengan como blanco, moléculas específicas, con la resultante alteración en los mecanismos celulares. Además, hubo un aumento en la demanda de compuestos basados en metales para el tratamiento del cáncer, debido al gran flagelo del mismo y a la falta de terapias efectivas.

Por estas razones, la química de compuestos con metales ha recibido mayor atención, en donde, las metalodrogas con rutenio (Ru) fueron inicialmente diseñadas para imitar el modo de acción de los complejos antitumorales de platino. Las drogas de Rutenio fueron una de las primeras alternativas al platino en ser reportadas, ya que el Ru(II) y el Ru(III) tienen cinética de sustitución de ligando similar al platino. Dos complejos de rutenio, KP1019 y NAMI-A (figura 1.3.1.2), han llegado a fase clínica II. Otros complejos de rutenio que mostraron elevada actividad antitumoral, son los desarrollados por

Dyson y colaboradores (Ang *et al.*, 2011), complejos RAPTA-C (figura 1.3.1.2), y $[(\eta^6\text{-biphenyl})\text{Ru}(\text{ethylenediamine})\text{Cl}]^+$, los cuales son propensos a sufrir hidrólisis y subsecuentemente unirse al ADN. Los complejos de rutenio mostraron aspectos peculiares, parecen ser más activos frente a los procesos de metástasis que frente al tumor primario propio, se activan por reducción, es decir los complejos de Ru(III) al llegar a la célula cancerígena son reducidos a Ru(II). El mecanismo de acción de estos compuestos es atribuido a su capacidad de interactuar con el ADN, pero de una manera distinta a los complejos de Pt(II) (McQuitty, 2014).

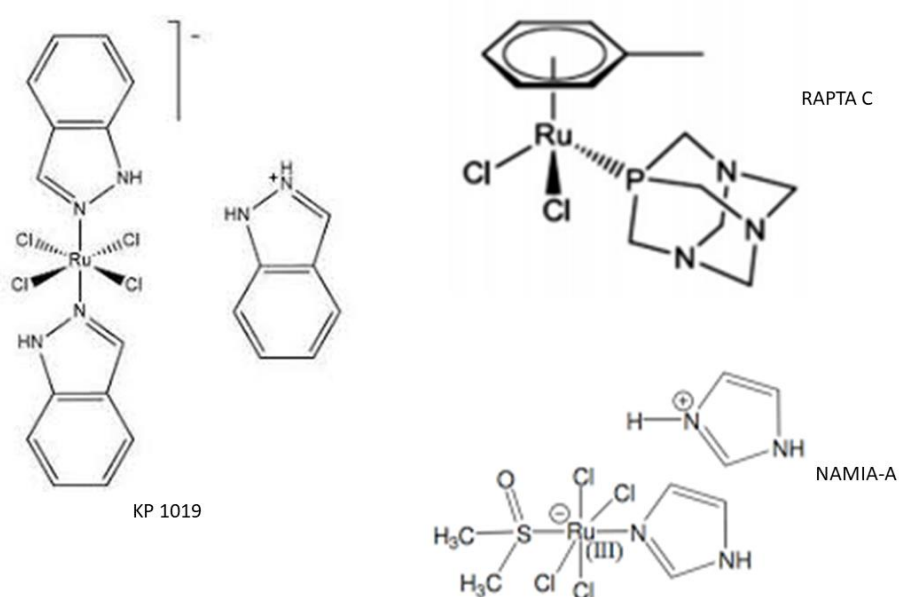


Figura 1.3.1.2. Estructura química de los complejos de Rutenio. KP1019, RAPTA C y NAMIA-A.

Esto se reflejó en los primeros complejos de rutenio sintetizados con aminas y compuestos clorados, y el ADN fue considerado el *target* molecular principal. Sin embargo, esto cambió en la última década, ya que los compuestos con rutenio tienen un gran potencial como drogas citostáticas y citotóxicas, con nuevos mecanismos de acción (Pal *et al.*, 2018).

Uno de los primeros compuestos desarrollados fue *fac*- $[\text{Ru}^{\text{III}}\text{Cl}_3(\text{NH}_3)_3]$ en 1976 (figura 1.3.2.1). Este tenía acción citotóxica sobre *Escherichia coli* produciendo el mismo efecto que CisPt, por ende indicaba un mecanismo de acción similar. Clarke reportó la interacción con ADN con el complejo monofuncional, $[\text{Ru}^{\text{III}}(\text{NH}_3)_5\text{Cl}]\text{Cl}_2$. Otro compuesto

con un derivado de purina, demostró acción en un carcinoma nasofaríngeo, a una concentración de 1mM, mediante la inhibición de la síntesis de ADN. Un hallazgo muy importante por este grupo, fue la teoría de la activación por reducción, la cual supone que el Ru^{III} inerte es activado por reducción a Ru^{II} en el ambiente reductor del tumor. La hipótesis fue que el mecanismo de acción principal fue la unión al ADN y la reducción del Ru, era facilitada por el ambiente hipóxico del tumor, lo que lo hacía selectivo para el tejido tumoral (Meier-Menches *et al.*, 2018). Por otro lado, el estado de oxidación del metal tiene influencia en la cinética de unión a los ácidos nucleicos. La hipótesis de "activación por reducción" estaba bien establecida a mediados de la década de 1990 y, en consecuencia, se intentó preparar potenciales compuestos antineoplásicos de Ru^{II}, que no requiere este paso de activación. Asimismo, se estableció que los N-heterociclos estabilizan el bajo estado de oxidación del Ru, lo que llevó al desarrollo del primer compuesto de Ru^{II} activo, el cual fue reportado por Reedijk en 2000, quien demostró también que la actividad y la solubilidad del mismo dependen del isómero obtenido. En estudios posteriores el objetivo fue, estabilizar el rutenio con estado de oxidación +2, con una molécula de η^6 -areno. Este compuesto organometálico, facilita el pasaje a través de las membranas y la intercalación con el ADN. Además de esta molécula, se generaron los compuestos llamados "half-sandwich piano-stoll", que presentan tres sitios de unión restantes, que pueden ser ocupados por ligandos inertes y / o lábiles. Los complejos con la fórmula general, $(\eta^6\text{-areno})\text{Ru}(\text{L})\text{Cl}$, donde (L) es el ligando, no son activados por reducción, sino por reacciones de intercambio que involucran al grupo saliente, como el cloro, se produce la rápida hidrólisis del enlace Ru-Cl. La hidratación es suprimida por la concentración de cloro fuera de la célula, pero en el interior de la misma el proceso es favorable. Esto es debido a la diferencia de concentración del ion cloro, 23 mM en el citoplasma y 103 mM en el exterior. Esto sugiere un mecanismo de activación selectivo (Pal *et al.*, 2018). Este tipo de moléculas representan la última generación de agentes antitumorales basados en Rutenio (Meier-Menches *et al.*, 2018). Se sintetizaron varios compuestos, sin embargo dos de ellos fueron los de mayor relevancia por su actividad, RAPTA-C y RAED, que aún son intensamente investigados como posibles drogas antitumorales. Por ejemplo el complejo RAPTA (figura 1.3.2.2) es activado por uno de sus uniones Ru-Cl.

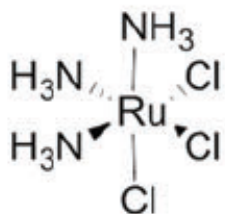


Figura 1.3.2.1. Complejo de rutenio $\text{fac-}[\text{Ru}^{\text{III}}\text{Cl}_3(\text{NH}_3)_3]$, desarrollado en 1976.

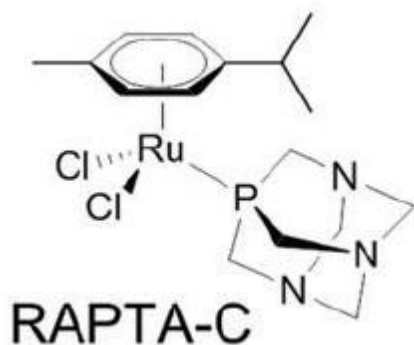


Figura 1.3.2.2. Complejo de rutenio RAPTA-C. Ejemplo de compuestos $(\eta^6\text{-areno})\text{Ru}(\text{L})\text{Cl}$. Estos son activados por la hidrólisis del enlace Ru-Cl .

Por todo lo expuesto anteriormente, estos complejos proveen una alternativa a los complejos de Pt, debido a su citotoxicidad y sus potenciales propiedades anticancerígenas.

Los compuestos de rutenio desarrollados para este propósito tienen varias ventajas, 1) son activos contra algunos tumores que son resistentes al CisPt, 2) tienen bajos efectos secundarios debido a su gran selectividad por las células cancerígenas comparadas con las células normales, 3) la elevada selectividad por sus blancos puede estar relacionado por la captación selectiva por los tejidos tumorales que en los tejidos sanos, 4) pueden imitar la unión del hierro a algunas proteínas (Thota *et al.*, 2018). La naturaleza química de este metal, a su vez le da mayor ventaja debida a que el rutenio permite múltiples estados de oxidación, por lo tanto, vías de transferencia de electrones versátiles. Esto permite que este metal pueda formar complejos octaédricos con la posibilidad de unir más ligandos, a diferencia del platino que sólo forma complejos cuadrados planos. (Ndagi *et al.*, 2017)(Liu *et al.*, 2019). Las variaciones adecuadas de los ligandos auxiliares, permiten la modulación de las propiedades redox y las interacciones de los ligandos, dando como resultado una gran plataforma de complejos rutenio (Dragutan *et al.*,

2015). Otra de las razones es que el Ru tiene baja cinética de intercambio de ligando en agua, equivalentes al tiempo de reproducción celular. Esto significa que los iones de Ru permanecen unidos a algunas especies dentro de la célula durante su vida útil (Pal *et al.*, 2018). Por estas razones algunos compuestos de rutenio son excelentes candidatos para el diseño de nuevos complejos antitumorales.

Varios complejos de rutenio mostraron efectos deletéreos en las células tumorales ya que tienen la capacidad de modular varios procesos incluidos la migración, la proliferación y la diferenciación. Los compuestos de rutenio ejercen su acción anticancerígena vía mitocondrial, interacción con ADN, alterando el retículo endoplasmático, interacción con proteínas, apoptosis mediada por ERO, entre otros. Su mecanismo de acción depende del ligando, de las propiedades fisicoquímicas del complejo y de la existencia de sitios de no coordinación en la región de coordinación del metal. Muchos complejos de Rutenio han sido diseñados, y cuatro de ellos, llamados NAMI-A, KP1019, KP1339 (Ru(III)) y TLD1433 (Ru(II)), han ingresado a la fase de ensayos clínicos, con mecanismos de acción conocidos contra los tumores (J. Liu *et al.*, 2019).

Las propiedades de los compuestos de rutenio pueden variar en función de la variación de sus ligandos, lo cual fue demostrado en experimentos tanto *in vitro* como *in vivo*. Se sintetizaron complejos de Ru con una amplia gama de ligandos, como arenos, fosfinas, heterociclos aromáticos, bases de Schiff, tiocarbamatos, etc. (Dragutan *et al.*, 2015).

Uno de los ligandos usados para la síntesis de los complejos de rutenio estudiados en este trabajo de tesis es la 8-hidroxiquinolina (8-HQ). Las hidroxiquinolinas han sido usadas como ligandos en el diseño de metalofármacos por sus propiedades físico-químicas (Kljun *et al.*, 2018). Este ligando es un quelante lipofílico, multifuncional, y posee propiedades terapéuticas como antibacteriano, antifúngico, antiviral, antiparasitario, anticancerígeno, neuroprotector y antioxidantes. (Mansouri-Torshizi *et al.*, 2016). Notablemente, la 8-HQ ha sido usado como ligando en el complejo KP46 (complejo de galio), que actualmente está en ensayos clínicos. Su acción es atribuida a la interacción con el ion metálico, como el cobre, zinc y cationes de hierro, los cuales son abundantes en los sistemas biológicos (Kljun *et al.*, 2018). Para agregar, el clioquinol, es el derivado halogenado de 8-hidroxiquinolina. Este compuesto se usa hoy en día como agente desinfectante, y además un derivado con yodo y cloro, mostró resultados

promisorios en la enfermedad de Parkinson y Alzheimer. Son ligandos que se caracterizan por su estabilidad, sus propiedades físico-químicas como su habilidad para formar compuestos estables y por su lipofilicidad (Suwanjang *et al.*, 2016) (Kubanik *et al.*, 2015). Mousumi Pal y colaboradores, reportaron que la introducción de una molécula de 7-cloroquinolina en un complejo de *p*-cimeno aumentaba significativamente la captación intracelular, y por consiguiente, la citotoxicidad del mismo (Pal *et al.*, 2018).

1.3.3 Complejos de Cobre

El cobre es uno de los elementos más abundantes de la corteza terrestre y puede presentarse como metal, sulfuros, óxido, carbamatos, etc. Es un típico elemento de transición puesto que es un metal, se presenta en varios estados de oxidación y sus iones forman fácilmente complejos, dando lugar a una gran variedad de compuestos de coordinación. Los estados de oxidación varían, desde el Cu(0) hasta el Cu(IV) los cuales son poco frecuentes, y luego está el Cu(III) que se reduce fácilmente por lo que también es poco común y por últimos los estados de oxidación de Cu(I) y (II), los cuales son los más frecuentes. El Cu(II) es más estable en condiciones normales lo que da lugar a la formación de varios complejos de coordinación (*Química de coordinación de iones metálicos en estado de oxidación II ... - Google Libros, n.d.*).

En cuanto a la importancia biológica de este metal, podemos decir que es un elemento traza bio-esencial, un elemento biológico relevante ya que muchas enzimas dependen del mismo para su actividad. El cobre forma parte de numerosas proteínas y sus funciones están relacionadas con la transferencia electrónica y con el transporte y activación de oxígeno. La homeostasis de este metal en humanos está finamente regulada, ya que hay poca tolerancia a las desviaciones debido al papel esencial en la cadena respiratoria y en la dismutación del anión superóxido. Un desequilibrio tiene consecuencias patológicas ya sea por intoxicaciones crónicas o agudas, o bien por su relación con enfermedades hereditarias como lo son la Enfermedad de Wilson y el Síndrome de Menkes (Hu *et al.*, 2017) (*Química de coordinación de iones metálicos en estado de oxidación II ... - Google Libros, n.d.*).

Este metal tiene propiedades redox, aumenta los niveles de las especies reactivas del oxígeno y puede unir varios tipos de ligandos, para formar complejos que interactúan con biomoléculas, principalmente proteínas y ácidos nucleicos (Hu *et al.*, 2017). La mayor parte del cobre en la célula se encuentra como cobre (I). El procesamiento químico que activa al cobre, mediante la reacción de Fenton, usualmente está asociado con la generación de EROs. El daño oxidativo juega un rol clave en el proceso de carcinogénesis y el estrés oxidativo es un mecanismo de acción importante de numerosas drogas antitumorales. En las células cancerígenas existe un elevado estado de oxidación, es por eso que son más vulnerables al aumento de los niveles de EROs (Z. Zhang *et al.*, 2012). Debido a su relevancia biológica numerosos complejos de cobre han sido extensamente sintetizados e investigados con diferentes propiedades farmacológicas dentro de las cuales se destacan: antiinflamatorios, anticonvulsivos, analgésica, antimicrobiana, anticancerígenas, esta última debido a su elevada actividad antitumoral y ventajas en relación a otros metalofármacos (Deng *et al.*, 2018).

El complejo bis (3,5-diisopropilsalicilato) cobre(II) es uno de los que mostró actividad antitumoral interesante además demostró ser anticonvulsionante, antiinflamatorio y antiulceroso. Compuestos de cobre con tiosemicarbazonas han mostrado actividad antitumoral (Baran, 2014).

Como ejemplo de compuesto con propiedades antitumorales, se encuentran las Casiopeínas. Este grupo de compuestos tiene la fórmula básica, $[\text{Cu}(\text{N-N})(\alpha\text{-L-amino acidato})]\text{NO}_3$ y $[\text{Cu}(\text{N-N})(\text{O-O})]\text{NO}_3$. El N-N es una diamina sustituida, 1,10 fenantrolina o 2,2 bipyridina, y el O-O es acetilacetato o salicilaldehído (figura 1.3.3.1). Algunos compuestos de esta familia tienen elevada actividad anti proliferativa, incluso mejor que el CisPt sobre células tumorales de ovario, útero, leucemia, entre otras. Los ensayos in vivo, mostraron resultados prometedores, revelando actividades similares a drogas de referencia, en algunos casos a bajas concentraciones micromolares, con aceptable toxicidad. Uno de estos compuestos, conocido como Casiopeína III-ia, ha completado los ensayos preclínicos y está por iniciar la fase clínica I en México. Tienen 3 mecanismos de acción principales, 1) generación de especies reactivas del oxígeno, lo cual provoca oxidación del ADN y su degradación, más depleción de GSH como consecuencia 2)

toxicidad mitocondrial, 3) daño en el ADN a través de la interacción directa con el complejo (Bravo-Gómez *et al.*, 2015).

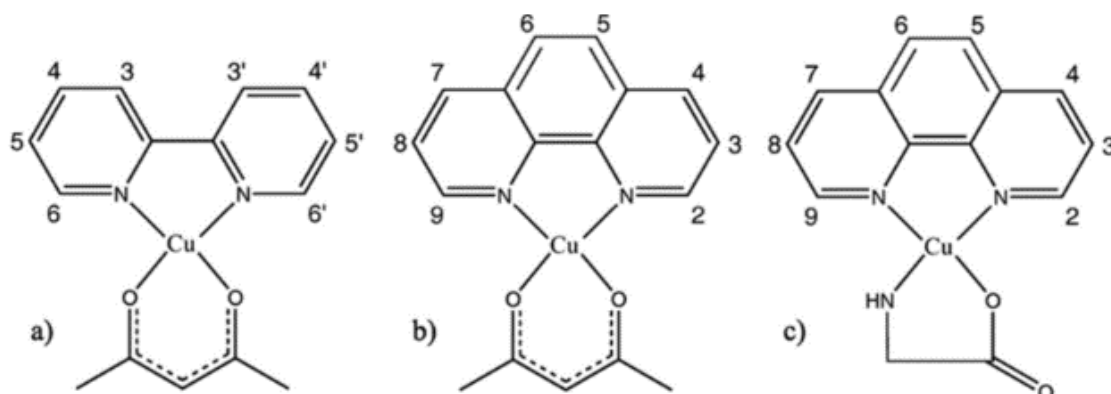


Figura 1.3.3.1. Estructura de las casiopéinas. (a) $\text{Cu}[(2,2'\text{-bipiridina})(\text{acetilacetionato})]^+$, (b) $\text{Cu}[[1,10\text{-fenantrolina})(\text{acetilacetionato})]^+$ and (c) $\text{Cu}[[1,10\text{-fenantrolina})(\text{glicinato})]^+$.

Sigman y colaboradores demostraron que la mezcla de fenantrolina, cobre (II) y tiol eran capaces de despolimerizar soluciones de poli[d(A-T)] bajo condiciones aeróbicas, numerosos complejos de cobre polipiridinicos han sido sintetizados y utilizados como nucleasas artificiales. Muchos de los cuales tiene 1,10 fenantrolina como ligandos o sus derivados (Uma *et al.*, 2005). 1,10 fenantrolina es un ligando heterocíclico que está unido a través de anillos conjugados, presenta una estructura rígida impuesta por el anillo central, lo que implica que ambos átomos de nitrógeno se encuentren siempre en yuxtaposición. Esto le confiere ventajas para formar complejos metálicos de forma más eficiente y rápida así como su capacidad para interactuar con el ADN y el ARN. Este ligando es un compuesto neutro, por lo que forma complejos cargados con cationes metálicos, propiedad que ha sido explotada para la síntesis de complejos metal-fenantrolina (*Química de coordinación de iones metálicos en estado de oxidación II ... - Google Libros*, n.d.).

1,10 fenantrolina es un ejemplo de ligando donador de nitrógeno bidentado, son fuertes aceptores π , coordinan el metal a través de los átomos de nitrógeno. Como consecuencia de la naturaleza poco flexible de ligando, los efectos estéricos son fuertes, generando estructuras pocos comunes al coordinarse con iones metálicos. Además, la presencia de los anillos aromáticos posibilita la formación de estructuras supramoleculares mediante el establecimiento de interacciones no covalentes de

apilamiento π - π . Esta característica contribuye a la estabilidad de la estructura tanto en disolución como en estado sólido, así como a la formación de varias estructuras supramoleculares (R. H. Zhang *et al.*, 2009). Las propiedades quelantes de la 1,10-fenantrolina han sido usadas en varios reactivos e investigaciones analíticas. Tienen propiedades antihelmínticas, bactericida, fungicida, antiviral y antimicoplasma. Y se descubrió que además tienen propiedades anticancerígenas.

Este ligando y sus derivados sustituidos, libre de metales o coordinados a metales de transición, alteran la función de una amplia variedad de sistemas biológicos (Coyle *et al.*, 2004). Como plantea Zhang y colaboradores, complejos metálicos que unen 1,10-fenantrolina son inhibidores proteosomícos potentes y selectivos, e inductores de la apoptosis en células tumorales (Z. Zhang *et al.*, 2012). Además, complejos de cobre(II) con fenantrolina y otros ligandos heteroaromáticos han sido ampliamente estudiados debido a sus efectos catalíticos en el clivaje del ADN. El quelante metálico 1,10-fenantrolina junto al cobre forman un complejo estable cobre-1,10-fenantrolina, el cual tiene actividad nucleasa en presencia de agentes reductores y oxígeno molecular. Se puede unir fuertemente al surco menor del ADN e inducir clivaje a través del OH⁻ formado por la catálisis del cobre (Cai *et al.*, 2007).

1.4 Metodología usada para el testeo de los metalofármacos

El cultivo celular hace posible el estudio de la biología celular, morfología del tejido, mecanismos de enfermedad, acción de las drogas, producción de proteínas, entre otros. Son generalmente usados en la investigación preclínica de drogas, estudios de la biología del cáncer y en el estudio de la función de genes. La elección del método de cultivo apropiado en el área de la investigación del cáncer permite entender mejor la biología del tumor, y por lo tanto optimizar la quimio o radioterapia, o encontrar nuevas estrategias de tratamiento (Kapałczyńska *et al.*, 2018). El tipo de cultivo más usado es el modelo 2D, pero recientemente el uso de modelos 3D han ganado popularidad. A continuación se hará una descripción del modelo celular 3D, usado en este trabajo de tesis y una comparación con el método de cultivo 2D.

1.4.1 Modelo de cultivo celular 3D

Los esferoides son agregados celulares que crecen en suspensión o embebidos en una matriz (Costa *et al.*, 2018; Katt *et al.*, 2016). Los esferoides de células cancerígenas, conocidos como esferoides tumorales multicelulares, representan tumores avasculares o micrometástasis.

Este modelo de cultivo tiene 4 aplicaciones principales: 1) estudiar la función celular (proliferación, migración e invasión celular), en un microambiente tumoral avascular, 2) el desarrollo de nuevas terapias y *screening* de drogas, 3) estudio de angiogénesis y 4) el estudio de las interacciones entre el tumor y el sistema inmune (Katt *et al.*, 2016).

Con respecto al estudio de la funcionalidad celular, los estudios consisten en estudiar su cinética de crecimiento, su composición y la biología tumoral. Se realizaron estudios comparando la expresión de genes en modelos 3D y 2D, se observaron diferencias en los genes asociados a la supervivencia, proliferación diferenciación y resistencia a tratamientos antitumorales (Katt *et al.*, 2016).

Los esferoides a su vez son usados para estudiar la respuesta y sensibilidad a quimioterapia, combinación de terapias, blancos moleculares y la liberación de drogas. Por lo general involucra el crecimiento de los esferoides, la incubación con las drogas, la medida de la integridad del esferoide, su cinética de crecimiento y la medida de la viabilidad celular (Katt *et al.*, 2016).

El desarrollo de drogas es un proceso lento y costoso, el cual tiene varios pasos, desde la identificación de un blanco molecular hasta su optimización, validación preclínica y ensayo clínicos, finalizando en su aprobación para el uso clínico (Langhans, 2018). Actualmente, los ensayos de *screening* de drogas antitumorales en cultivo en monocapa (2D), son complementados con el uso de modelos de cultivo de esferoides tumorales multicelulares (3D) ya que son una mejor representación de tumores de pacientes (Hamilton & Rath, 2019). En 1980 Mina Bissell y su equipo de trabajo estudiaron la importancia de la matriz extracelular en el comportamiento celular, por lo que ahora es aceptado el cultivo 3D, el cual imita factores claves del tejido *in vivo*. El uso del cultivo

3D en el descubrimiento de drogas está progresando rápidamente (Langhans, 2018). Sutherland y colaboradores (Sutherland *et al.*, 1970), fueron pioneros en el uso de esferoides (realizados con células de pulmón de un hámster chino V79), caracterizaron la eficacia de la radiación de cobalto en terapia anticancerígena (Costa *et al.*, 2018). Este tipo de cultivo tiene muchas aplicaciones, entre ellas es un modelo para replicar las características de un tumor sólido humano. Esto se debe a que los esferoides tienen un gradiente de metabolitos (oxígeno, dióxido de carbono, pH, nutrientes y desechos) similares a un tumor pobremente vascularizado. Este gradiente afecta varios aspectos del comportamiento celular, la forma, polaridad, expresión de genes y proteínas, crecimiento, motilidad, diferenciación y la señalización celular, así como la quimio y la radiosensibilidad (Hamilton & Rath, 2019) (Figura 1.4.1.1 y 1.4.1.2).

Además, como consecuencia de este gradiente se establecen 3 capas celulares en los esferoides, las cuales están también influenciadas por el tamaño de la esfera. Esferoides de 200 μm de diámetro han sido usados para el testeo de drogas y son suficientes para representar las interacciones célula-célula y célula-MEC (Hamilton & Rath, 2019). En esferoides de 400 a 500 μm se observan las 3 capas: La capa externa está compuesta por células proliferativas las cuales reflejan el microambiente de las células más cercanas a los capilares en tumores *in vivo* (Mehta *et al.*, 2012), una capa intermedia constituida por células quiescentes y una capa interna, ácida e hipóxica, compuesta por células necróticas (Costa *et al.*, 2018). La capa interna es más resistente a la quimioterapia, inmunoterapia y radioterapia. El tamaño de los esferoides es una variable muy importante, está relacionada con la función celular, la penetración y el transporte de drogas.

Los esferoides presentan ciertas ventajas como método para valorar drogas, como ser:

- Estructuras empaquetadas de células, los esferoides tienen una interacción considerable entre las células, incluidas las uniones estrechas, comparable a los tejidos *in vivo*. Estos contactos célula-célula y la consecuente comunicación entre ellas tiene influencias en las respuestas a los diferentes tratamientos.

- Los esferoides tienen límites en el transporte de drogas, nutrientes y otros factores similares a los tejidos *in vivo*. Debido a las barreras fisiológicas que existen en los tumores *in vivo*, los esferoides pueden ser útiles para mejorar formatos de ensayos para testear eficacia.

- Los esferoides más grandes desarrollan un área necrótica central y regiones de hipoxia que están presentes en varios tipos de cánceres, lo cual es crítico para testear antitumorales (Mehta *et al.*, 2012).

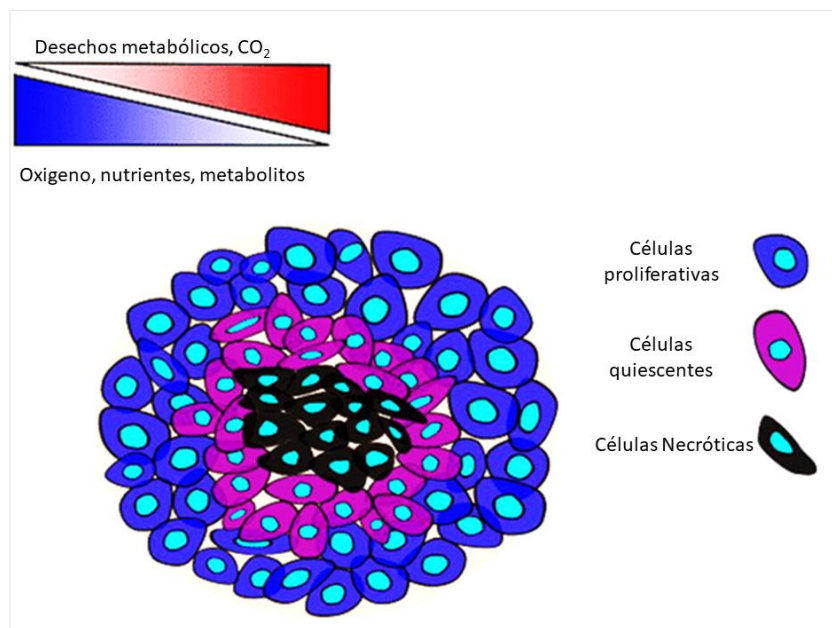


Figura 1.4.1.1. Dibujo de un esferoide multicelular con 3 capas (proliferativas, quiescentes y necróticas). Arriba a la izquierda se indica como es el gradiente de concentración y de pH. Imagen adaptada de (Acland *et al.*, 2018).

Adicionalmente, este tipo de cultivo disminuye el uso de animales de experimentación, los cuales son costosos, deben considerar cuestiones éticas y no siempre son capaces de representar la enfermedad a estudiar. Al mismo tiempo el cultivo 3D podría generar modelos capaces de predecir el comportamiento celular deseado, como el aumento de la movilidad celular, la promoción de la diferenciación celular o un microambiente con características por ejemplo de un nicho metastásico, generando por ende blancos moleculares con ciertos comportamientos para el descubrimiento de nuevas drogas (Langhans, 2018). Los efectos combinados del gradiente fisiopatológico y las complejas interacciones entre las células y entre las células y la MEC, alteran el ARN y por ende la expresión de proteínas, afectando la respuesta al tratamiento con distintos agentes

antitumorales. Por estas razones con un excelente modelo para testear nuevas drogas (Mehta *et al.*, 2012).

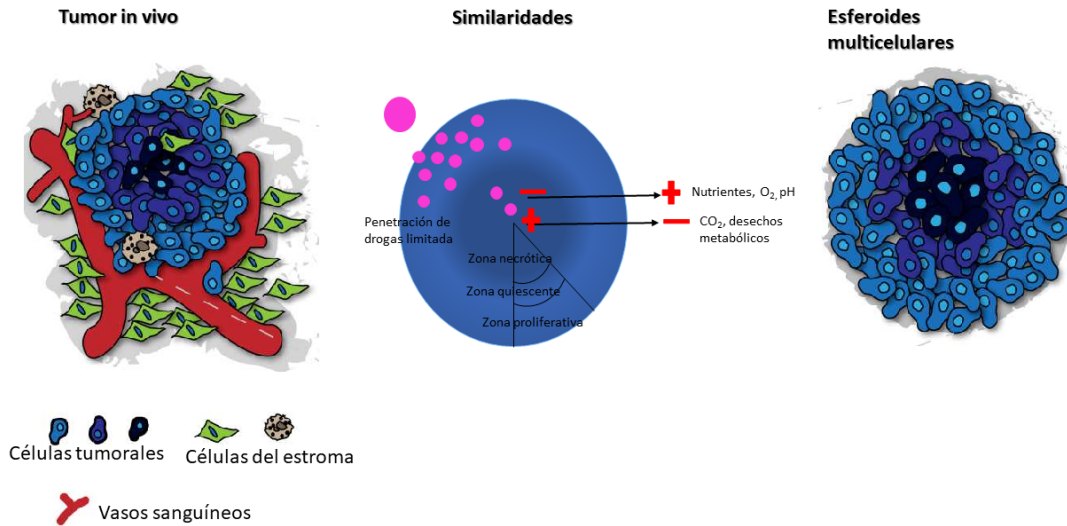


Figura 1.4.1.2. Similitudes entre los tumores in vivo y un esferoide multicelular. Se observan las 3 capas, necrótica, intermedia y proliferativa, así como también la variación en los metabolitos y en los desechos metabólicos. A su vez se ejemplifica, la dificultad del tratamiento ya que no llega a zonas complicadas, como zonas necróticas.

Una de las mayores influencias en el comportamiento celular son las interacciones entre las células y la matriz extracelular que las rodea. La MEC no solo es un soporte, si no que sus componentes afectan varios aspectos del comportamiento celular. Específicamente, en el desarrollo de un cáncer, los cambios en la MEC son altamente variables y dependen del tipo y localización del tumor. Cambios dinámicos en estos componentes regulan la proliferación, diferenciación, migración, supervivencia, adhesión así como la organización del citoesqueleto celular y varias vías de señalización. A su vez, estos cambios influyen en la respuesta a las drogas, modificando la disponibilidad del fármaco, al afectar blancos moleculares o afectando los mecanismos intrínsecos de defensa celular, como la evasión de la apoptosis. La adhesión entre las células y la MEC, principalmente mediante proteínas de la familia de las integrinas, son un factor importante que modula la respuesta a la quimioterapia y son blancos tumorales de las diferentes terapias antitumorales (Langhans, 2018).

Todas estas características del cultivo 3D crean una plataforma la cual puede ser usada para el estudio de la biología de las células cancerígenas, procesos de invasión y metástasis, así como para el testeo de drogas.

1.4.2 Comparación entre sistemas de cultivo en monocapa y esferoide multicelulares.

En la siguiente tabla se comparan los sistemas de cultivo utilizados en este trabajo de tesis.

| Tipo de cultivo | 2D | 3D |
|------------------------------------|--|--|
| Tiempo de cultivo | Pocas horas | Algunos días |
| Características del cultivo | Reproducibilidad, largo tiempo en cultivo, fácil interpretación, simple de cultivar | Difícil reproducibilidad, dificultad para interpretar. |
| Similitud con <i>in vivo</i> | No imita la naturaleza de la masa tumoral o el tejido | Imitación de los tejidos y órganos |
| Interacciones celulares | No existen las interacciones célula-célula o célula-MEC, no hay microambiente o nichos característicos | Interacción célula-célula y célula-MEC apropiadas, se forma un microambiente |
| Características celulares | Cambios en la morfología y en la manera de dividirse, pérdida del fenotipo y la polaridad | Morfología preservada, al igual que la división celular, diversidad en el fenotipo y en la polaridad |
| Acceso a compuestos esenciales | Acceso ilimitado al oxígeno, nutrientes, metabolitos y moléculas de señalización | Acceso variable a oxígenos, nutrientes, metabolitos y moléculas de señalización |
| Mecanismos moleculares | Cambios en la expresión de genes, cambios en el corte y empalme del ARNm. | Expresión de genes y del <i>splicing</i> del ARNm similares al <i>in vivo</i> |
| Costo de mantenimiento del cultivo | Barato y muchos test disponibles | Caro y conlleva más tiempo, pocos test comerciales |

1.5 Hipótesis

La hipótesis planteada en el presente trabajo de Tesis Doctoral sostiene que complejos de Cu y Ru son compuestos con mejores propiedades farmacológicas que el ligando libre o el ion metálico. Además, estos compuestos ejercen mayor efecto antitumoral que el cisplatino, metalofármaco utilizado en la clínica.

En particular, este proyecto estará destinado a la investigación de estos aspectos en relación a compuestos potencialmente útiles para el tratamiento del cáncer óseo, pulmonar, de mama y colorrectal.

1.6 Objetivos generales

Estudiar la actividad biológica (antitumoral y antibacteriana) de diversos compuestos de metales de transición (rutenio y cobre) con ligandos de interés biológico y/o farmacológico, en sistemas *in vitro* (células en cultivo) e *in vivo* (animales de laboratorio), incluyendo estudios de toxicidad y de los posibles mecanismos de acción, a fin de hallar nuevos compuestos con potencial aplicación terapéutica para enfermedades como el cáncer. El propósito es contribuir al diseño racional de nuevos compuestos promisorios para posteriores investigaciones clínicas que determinen su aplicación como drogas alternativas para el tratamiento de diversos tumores.

1.6.1 Objetivos específicos

1- Realizar un *screening* de la actividad antitumoral de compuestos de rutenio(II) complejados con ligandos derivados de quinolina (8-hidroxiquinolina sustituido con halógenos) y con compuestos de cobre(II) con ligandos 1,10 fenantrolina y su derivado 2,9 dimetil-1,10 fenantrolina. Se utilizarán líneas celulares tumorales y células con un fenotipo no tumoral, tomadas como control para contrastar los efectos de los complejos en las primeras. Las líneas tumorales a usar son de hueso (MG-63), mama (MDA-MB-231, MCF-7), colon (HT-29, CACO2 y LS174T) y pulmón (A549) y la línea con fenotipo normal es L929, en cultivo.

2- Investigar los efectos de los complejos sobre la genotoxicidad en las líneas celulares referidas anteriormente.

3- Investigar los posibles mecanismos de acción de los compuestos bioactivos en esas líneas celulares (apoptosis, estrés oxidativo, arresto del ciclo celular, etc.).

4- Estudiar la acción, de los compuestos que presentaron mayor actividad *in vitro*, sobre la vía Wnt/ β -Catenina, usando como modelos *in vivo* embriones de *Xenopus laevis*.

5- Investigar las propiedades antitumorales en modelos *in vivo* (ratón N:NIH(S) *Fox1^{nu}* xenotransplantado con células tumorales de colon (HT-29) para determinar la capacidad antitumoral de los metalocompuestos con mayor actividad.

6- Estudiar la actividad antibacteriana de los complejos que presenten mejor actividad sobre cepas bacterianas de referencia ATCC e investigar su capacidad de inhibir la formación de *biofilm*, utilizando cepas de referencia ATCC y clínicas.

Bibliografía

- ¿Qué es el cáncer? - Instituto Nacional del Cáncer. (n.d.). Retrieved May 28, 2020, from <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/naturaleza/que-es>
- Acland, M., Mittal, P., Lokman, N. A., Klingler-Hoffmann, M., Oehler, M. K., & Hoffmann, P. (2018). Mass Spectrometry Analyses of Multicellular Tumor Spheroids. In *Proteomics - Clinical Applications* (Vol. 12, Issue 3). Wiley-VCH Verlag. <https://doi.org/10.1002/prca.201700124>
- Aplin, A. C., & Nicosia, R. F. (2016). The Aortic Ring Assay and Its Use for the Study of Tumor. *Tumor Angiogenesis Assays: Methods and Protocols*, 1464, 63–72. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3999-2>
- Arends, J. W. (2000). Molecular interactions in the Vogelstein model of colorectal carcinoma. *Journal of Pathology*, 190(4), 412–416. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9896\(200003\)190:4<412::AID-PATH533>3.0.CO;2-P](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9896(200003)190:4<412::AID-PATH533>3.0.CO;2-P)
- Aslan, C., Maralbashi, S., Salari, F., Kahroba, H., Sigaroodi, F., Kazemi, T., & Kharaziha, P. (2019). Tumor-derived exosomes: Implication in angiogenesis and antiangiogenesis cancer therapy. *Journal of Cellular Physiology*, 234(10), 16885–16903. <https://doi.org/10.1002/jcp.28374>
- Baran, E. J. (2014). Metalofármacos: una nueva perspectiva para la farmacología y la medicina. *Anales Acad. Nac. de Cs. Ex., Fís. y Nat., Tomo*, 66, 5–21. http://www.ancefn.org.ar/biblioteca/anales/tomo_63/21.pdf
- Berens, E. B., Holy, J. M., Riegel, A. T., & Wellstein, A. (2015). A cancer cell spheroid assay to assess invasion in a 3D setting. *Journal of Visualized Experiments*, 2015(105), 1–6. <https://doi.org/10.3791/53409>
- Boros, E., Dyson, P. J., & Gasser, G. (2020). Classification of Metal-Based Drugs according to Their Mechanisms of Action. *Chem*, 6(1), 41–60.

<https://doi.org/10.1016/j.chempr.2019.10.013>

Cáncer. (n.d.). Retrieved May 28, 2020, from <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>

Cancer Browser. (n.d.). Retrieved June 18, 2020, from https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/browse/tissue?wgs=off&sn=large_intestine&ss=colon&hn=all&sh=adenocarcinoma&in=t&src=tissue&all_data=n

Cancer Classification | SEER Training. (n.d.). Retrieved June 1, 2020, from <https://training.seer.cancer.gov/disease/categories/classification.html>

Casali, P. G., Bielack, S., Abecassis, N., Aro, H. T., Bauer, S., Biagini, R., Bonvalot, S., Boukovinas, I., Bovee, J. V. M. G., Brennan, B., Brodowicz, T., Broto, J. M., Brugières, L., Buonadonna, A., De Álava, E., Dei Tos, A. P., Del Muro, X. G., Dileo, P., Dhooge, C., ... Blay, J. Y. (2018). Bone sarcomas: ESMO-PaedCan-EURACAN Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*, 29(August), iv79–iv95. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdy310>

Costa, E. C., de Melo-Diogo, D., Moreira, A. F., Carvalho, M. P., & Correia, I. J. (2018). Spheroids Formation on Non-Adhesive Surfaces by Liquid Overlay Technique: Considerations and Practical Approaches. In *Biotechnology Journal* (Vol. 13, Issue 1, p. 1700417). Wiley-VCH Verlag. <https://doi.org/10.1002/biot.201700417>

Carton James, CJ, (2012), *Manual de Patología clínica*, Londres, Inglaterra. Editorial, Mc Graw Hill Educattion.

CTNNB1 Hallmarks of Cancer. (n.d.). Retrieved June 18, 2020, from <https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/census-page/CTNNB1>

Ding, C., Tong, L., Feng, J., & Fu, J. (2016). Recent advances in stimuli-responsive release function drug delivery systems for tumor treatment. *Molecules*, 21(12). <https://doi.org/10.3390/molecules21121715>

Enomoto, Y., Inui, N., Yoshimura, K., Nishimoto, K., Mori, K., Kono, M., Fujisawa, T.,

- Enomoto, N., Nakamura, Y., Iwashita, T., & Suda, T. (2016). Lung cancer development in patients with connective tissue disease-related interstitial lung disease: A retrospective observational study. *Medicine (United States)*, *95*(50), e5716. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000005716>
- Ferguson, J. L., & Turner, S. P. (2018). Bone cancer: Diagnosis and treatment principles. *American Family Physician*, *98*(4), 205–213.
- Fouad, Y. A., & Aanei, C. (2017). Revisiting the hallmarks of cancer. In *American Journal of Cancer Research* (Vol. 7, Issue 5, pp. 1016–1036). E-Century Publishing Corporation.
- Hadi, N. I., & Jamal, Q. (2015). “OMIC” tumor markers for breast cancer: A review. *Pakistan Journal of Medical Sciences*, *31*(5). <https://doi.org/10.12669/pjms.315.7627>
- Hall, D. M. S., & Brooks, S. A. (2014). *Chapter 1 Basement Membrane Preparation*. *1070*(July 2016), 1–11. <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-8244-4>
- Hamilton, G., & Rath, B. (2019). Applicability of tumor spheroids for in vitro chemosensitivity assays. *Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology*, *15*(1), 15–23. <https://doi.org/10.1080/17425255.2019.1554055>
- Harbeck, N., & Gnant, M. (2017). Breast cancer. *The Lancet*, *389*(10074), 1134–1150. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)31891-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)31891-8)
- Hassanpour, S. H., & Dehghani, M. (2017). Review of cancer from perspective of molecular. *Journal of Cancer Research and Practice*, *4*(4), 127–129. <https://doi.org/10.1016/j.jcrpr.2017.07.001>
- Hee Park, M., & Tae Hong, J. (2016). *cells Roles of NF-κB in Cancer and Inflammatory Diseases and Their Therapeutic Approaches*. <https://doi.org/10.3390/cells5020015>
- Institute, N. N. C. (2020). Cancer Facts & Figures 2020. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*,

1–76.

Instituto Nacional del Cáncer (INC), & Ministerio de Salud. (2011). *ORGANIZACIÓN, COBERTURA Y CALIDAD DE LAS ACCIONES DE PREVENCIÓN Y CONTROL. Informe final de diciembre de 2011 : Propuesta del Programa de prevención y detección temprana, y acciones para su implementación Cáncer colorrectal en la Argentina :*

http://www.msal.gob.ar/images/stories/bes/graficos/0000000899cnt-2016-10-28-guia_ccr_aps.pdf

Jasperson, K. W., Tuohy, T. M., Neklason, D. W., & Burt, R. W. (2010). Hereditary and Familial Colon Cancer. *Gastroenterology*, 138(6), 2044–2058.

<https://doi.org/10.1053/j.gastro.2010.01.054>

Kapałczyńska, M., Kolenda, T., Przybyła, W., Zajączkowska, M., Teresiak, A., Filas, V., Ibbes, M., Bliźniak, R., Łuczewski, Ł., & Lamperska, K. (2018). 2D and 3D cell cultures – a comparison of different types of cancer cell cultures. *Archives of Medical Science*, 14(4), 910–919. <https://doi.org/10.5114/aoms.2016.63743>

Katt, M. E., Placone, A. L., Wong, A. D., Xu, Z. S., & Searson, P. C. (2016). In vitro tumor models: Advantages, disadvantages, variables, and selecting the right platform. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 4(FEB).

<https://doi.org/10.3389/fbioe.2016.00012>

Langhans, S. A. (2018). Three-dimensional in vitro cell culture models in drug discovery and drug repositioning. *Frontiers in Pharmacology*, 9(JAN), 1–14.

<https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00006>

Li, T., Kang, G., Wang, T., & Huang, H. (2018). Tumor angiogenesis and anti-angiogenic gene therapy for cancer (Review). In *Oncology Letters* (Vol. 16, Issue 1, pp. 687–702). Spandidos Publications. <https://doi.org/10.3892/ol.2018.8733>

McQuitty, R. J. (2014). Metal-based drugs. *Science Progress*, 97(1), 1–19.

<https://doi.org/10.3184/003685014X13898980185076>

- Mehta, G., Hsiao, A. Y., Ingram, M., Luker, G. D., & Takayama, S. (2012). Opportunities and challenges for use of tumor spheroids as models to test drug delivery and efficacy. *Journal of Controlled Release*, 164(2), 192–204. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.04.045>
- Nasim, F., Sabath, B. F., & Eapen, G. A. (2019). Lung Cancer. *Medical Clinics of North America*, 103(3), 463–473. <https://doi.org/10.1016/j.mcna.2018.12.006>
- Otto, T., & Sicinski, P. (2017). Cell cycle proteins as promising targets in cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*, 17(2), 93–115. <https://doi.org/10.1038/nrc.2016.138>
- Ozaki, T., & Nakagawara, A. (2011). Role of p53 in cell death and human cancers. In *Cancers* (Vol. 3, Issue 1, pp. 994–1013). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/cancers3010994>
- Pavlova, N. N., & Thompson, C. B. (2016). The Emerging Hallmarks of Cancer Metabolism. In *Cell Metabolism* (Vol. 23, Issue 1, pp. 27–47). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.12.006>
- Perou, C. M., Sørile, T., Eisen, M. B., Van De Rijn, M., Jeffrey, S. S., Ress, C. A., Pollack, J. R., Ross, D. T., Johnsen, H., Akslén, L. A., Fluge, Ø., Pergammenschikov, A., Williams, C., Zhu, S. X., Lønning, P. E., Børresen-Dale, A. L., Brown, P. O., & Botstein, D. (2000). Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, 406(6797), 747–752. <https://doi.org/10.1038/35021093>
- Reya, T., Morrison, S. J., Clarke, M. F., & Weissman, I. L. (2001). Stem cells, cancer, and cancer stem cells. In *Nature* (Vol. 414, Issue 6859, pp. 105–111). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/35102167>
- Riahi, R., Yang, Y., Zhang, D. D., & Wong, P. K. (2012). Advances in wound-healing assays for probing collective cell migration. *Journal of Laboratory Automation*, 17(1), 59–65. <https://doi.org/10.1177/2211068211426550>
- Sameer, A. S. (2013). Colorectal cancer: Molecular mutations and polymorphisms.

Frontiers in Oncology, 3 MAY(May), 1–8.

<https://doi.org/10.3389/fonc.2013.00114>

Shang, S., Hua, F., & Hu, Z. W. (2017). The regulation of β -catenin activity and function in cancer: Therapeutic opportunities. In *Oncotarget* (Vol. 8, Issue 20, pp. 33972–33989). Impact Journals LLC. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.15687>

Sherr, C. J., & Bartek, J. (2017). Cell Cycle–Targeted Cancer Therapies. *Annual Review of Cancer Biology*, 1(1), 41–57. <https://doi.org/10.1146/annurev-cancerbio-040716-075628>

Sundquist, T., Moravec, R., Niles, A., O’Brien, M., Riss, T., & Corporation, P. (2006). Timing your apoptosis assays. *Protocols and Applications Guide*, 16, 18–21. www.promega.com/paguide/chap3.html

Tratamiento del cáncer de pulmón de células no pequeñas (PDQ®)–Versión para profesionales de salud - Instituto Nacional del Cáncer. (n.d.). Retrieved June 4, 2020, from <https://www.cancer.gov/espanol/tipos/pulmon/pro/tratamiento-pulmon-celulas-no-pequenas-pdq>

Valdivia, J. (2017). Tratamiento del Cáncer de Pulmón de Células Pequeñas. *Rev Esp Patol Torac 2017; 29 (2) Suplemento 1: 11-116, 29(2).*

Waks, A. G., & Winer, E. P. (2019). Breast Cancer Treatment: A Review. *JAMA - Journal of the American Medical Association*, 321(3), 288–300. <https://doi.org/10.1001/jama.2018.19323>

Wang, J., & Yi, J. (2008). Cancer cell killing via ROS: To increase or decrease, that is a question. *Cancer Biology and Therapy*, 7(12), 1875–1884. <https://doi.org/10.4161/cbt.7.12.7067>

Wang, X., Wang, X., Jin, S., Muhammad, N., & Guo, Z. (2019). Stimuli-Responsive Therapeutic Metallodrugs. *Chemical Reviews*, 119(2), 1138–1192. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00209>

- Winer, A., Adams, S., & Mignatti, P. (2019). *Past Failures into Future Successes*. 17(6), 1147–1155. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-17-0646.Matrix>
- Wong, R. S. Y. (2011). Apoptosis in cancer: From pathogenesis to treatment. In *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research* (Vol. 30, Issue 1, p. 87). BioMed Central. <https://doi.org/10.1186/1756-9966-30-87>
- Xia, Y., Shen, S., & Verma, I. M. (2014). NF- κ B, an active player in human cancers. In *Cancer immunology research* (Vol. 2, Issue 9, pp. 823–830). NIH Public Access. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-14-0112>
- Yang, H., Villani, R. M., Wang, H., Simpson, M. J., Roberts, M. S., Tang, M., & Liang, X. (2018). The role of cellular reactive oxygen species in cancer chemotherapy. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, 37(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s13046-018-0909-x>
- Zhang, Y., Wan, R., Zhang, Q., & Mo, Y. (2019). *Chapter 8. 1894*, 133–143. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8916-4>



METODOLOGÍA

2. Metodología

2.1 Descripción de las líneas celulares y condiciones de cultivo.

2.1.1 MG-63

La línea celular deriva de un osteosarcoma de un paciente masculino de 14 años. Fue realizado en la división ortopédica en la Universidad de Leuve, en 1977 por Billiau y colaboradores. Estas células muestran características fenotípicas típicas de un osteoblasto indiferenciado. Esto incluye la síntesis de colágeno tipo I y III, baja expresión de fosfatasa alcalina, que aumenta luego de la administración de 1,25 dihidroxivitamina D, (1,25(OH)₂D) y la producción de osteocalcina en presencia de 1,25(OH)₂D, (Franceschi & Young 1990; Lajeunesse *et al.* 1990). Esta línea celular fue usada como modelo experimental para estudiar una amplia variedad de funciones de los osteoblastos (Dedhar *et al.* 1987; Franceschi *et al.* 1987; Heino & Massague 1989), como adhesión, síntesis de matriz extracelular (Bassols & Massague 1988; Franceschi *et al.* 1988), actividad de fosfatasa alcalina (Boyan *et al.* 1989; Franceschi *et al.* 1985; Franceschi & Young, 1990) y producción de osteocalcina (Lajeunesse *et al.* 1990). Son células con morfología fibroblástica, en cultivo crecen de forma adherente en monocapa, y tienen la habilidad de mantener un fenotipo diferenciado bajo condiciones de cultivo. (Pautke *et al.*, 2004). En cultivo estas células se mantuvieron en DMEM con 10% SFB, con 5% de CO₂ a 37°C.

2.1.2 A549

Esta línea se aisló en 1973 de un adenocarcinoma alveolar. Fue desarrollada en 1973 por D. J. Giard, *et al.*, a través de la remoción y posterior cultivo de células tumorales derivadas de tejido pulmonar de un paciente caucásico de 58 años. Se caracterizaron como células representantes de neumocitos alveolares tipo II. En cultivo crecen de forma adherente formando una monocapa. Estas células son usadas como modelos para el estudio de cáncer de pulmón y terapias antitumorales. Este modelo celular ha servido para testear drogas antitumorales conocidas, como paclitaxel, docetaxel y bevacizumab, en ensayos *in vitro* e *in vivo*. Además se usa como modelo para estudios

de la función respiratoria, en normalidad como en diferentes patologías respiratorias, así como aquellas producidas por virus, ya que son un modelo de huésped. (Phospholipid, 1973). ("In vitro cultivation of human tumors: Establishment of cell lines derived from a series of solid tumors," 1973). (A549 - *Un modelo de cáncer de pulmón de células no pequeñas*, n.d.)(A549 Cell Line: *Cell Culture and Transfection Protocol*, n.d.). Se cultiva en DMEM con 10% de SFB con 5% de CO₂ a 37°C.

2.1.3 MDA-MB-231

Línea celular epitelial de cáncer de mama. Se aisló por Cailleau y sus colaboradores en 1973 a partir de un derrame pleural de una mujer de 51 años de edad con un adenocarcinoma mamario metastásico. Es una de las líneas de cáncer de mama más usadas en los laboratorios de investigación. MDA-MB-231 es altamente agresiva, invasiva y pobremente diferenciada. Se clasifica como representante de cáncer de mama triple negativo, por la falta de expresión del receptor de estrógeno (RE), de progesterona (RP), y por la falta de amplificación del receptor del factor de crecimiento epidermal humano (HER2). Cuando las células MDA-MB-231 son inyectadas intravascularmente en un ratón, tienen la capacidad de realizar metástasis en hueso, cerebro o pulmón, lo que permite la identificación de un perfil de genes mediadores del proceso metastásico hacia sitios específicos. Estas células crecen en monocapa adherentes. Esta línea se cultivó usando el medio DMEM-F12 con el agregado de 10% SFB, con 5% CO₂ a 37°C.

2.1.4 MCF7

Esta línea fue establecida en 1973 en "Michigan Cancer Foundation", la razón de su nombre, por el Dr. Soule y colegas. Esta línea deriva de un derrame pleural de una paciente de 69 años, con cáncer de mama metastásico. Su uso es de larga data por su sensibilidad hormonal, debido a la expresión del receptor de estrógeno (RE), y progesterona (RP), haciendo de ello una línea modelo para el estudio de los mecanismos de respuesta a la terapia hormonal. Esta línea también es útil para el estudio de la unión y la acción biológica de las hormonas (Levenson & Jordan, 1997). Esta línea es poco agresiva y no invasiva, tiene un bajo potencial metastásico. En modelos in vivo, los

tumores se desarrollan sólo en presencia de estrógenos (Holliday & Speirs, 2011). Esta línea se cultivó en medio DMEM con el adicional de 10% SFB, al 5% CO₂ a 37°C.

2.1.5 HT-29

Esta línea celular fue aislada de un adenocarcinoma de colon de una paciente caucásica de 44 años, en 1964 por Fogh y Trempe. Estas células no solo son usadas para estudios de la biología del cáncer, sino también son utilizadas para estudiar el proceso de digestión y biodisponibilidad, ya que expresan características similares a las células intestinales maduras. En su fenotipo diferenciado son capaces de formar una monocapa con uniones fuertes entre las células y el borde en cepillo típico. Estas son usadas frecuentemente para estudiar la respuesta inmune intestinal ante una infección bacteriana, así como el proceso de adhesión e invasión de los microorganismos. Una de las diferencias con la línea celular Caco-2, es que la línea HT-29 produce niveles elevados de mucina (Huet *et al.* 1987; Maoret *et al.* 1989). Bourguine *et al.* (2012) comparó la expresión de genes de HT-29 y tejido colónico humano y no mostraron diferencias significativas (Martínez-Maqueda *et al.*, 2015). Las condiciones de cultivo, fueron 5% CO₂ a 37°C, en DMEM adicionado con 10% de SFB.

2.1.6 HT-29 NFκB-hrGFP

La activación o inhibición de la vía NF-κB tiene aplicación directa en el descubrimiento de drogas para distintas terapéuticas. Estas células reporteras específicas de esta vía son una herramienta útil para el estudio de distintas drogas, tanto naturales como drogas de síntesis. Las células HT-29 fueron transfectadas con el plásmido pNF-κB-hrGFP que contiene el gen GFP bajo control de los elementos de unión NF-κB. Esta línea reportera fue diseñada en la unidad de Biología Celular del Instituto Pasteur de Montevideo, Uruguay por el grupo de la Dra. Bollati-Fogolin. El uso de GFP elimina la necesidad del uso de un sustrato externo y no requiere un procesamiento de la muestra laborioso. La respuesta de esta línea celular fue caracterizada por citometría de flujo y validada por el uso de bacterias lácticas con propiedades inmunomoduladoras y con péptidos con propiedades antiinflamatorias (Mastropietro *et al.*, 2015). Estas células fueron cultivadas en RPMI 1640 con 10% de SFB, con 5% de CO₂ a 37°C.

2.1.7 LS174T

Esta línea fue establecida a partir de un adenocarcinoma de colon, Duke tipo B, de una paciente caucásica de 58 años de edad. Estas células son la variante tripsinizada de la línea LS180. (*LS 174T ATCC*® *CL-188™ Homo sapiens colon Dukes' type B,colo*, n.d.). Las células malignas, exhiben características de una mucosa colónica normal, con abundantes microvellosidades y la presencia de vacuolas de mucina intracitoplasmáticas. Se caracterizan, además, por producir elevados niveles de antígeno carcinógeno embrionario (CEA). (Tom *et al.*, 1976). Estas líneas se cultivaron con DMEM adicionada con SFB al 10%, con 5% de CO₂ a 37°C.

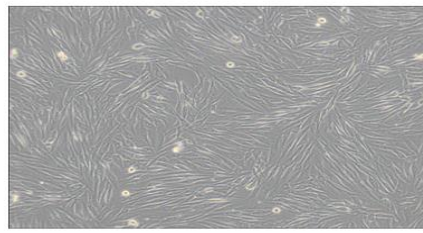
2.1.8 CACO2

Esta línea fue establecida a partir de un adenocarcinoma colorrectal, extraído de una mujer caucásica de 72 años (*Caco-2 [Caco2] ATCC*® *HTB-37™ Homo sapiens Colon Colorectal*, n.d.), por Jorgen Fogh en el centro Sloan-Kettering Cancer Center, Nueva York en 1974 (Rousset, 1986). Estas células expresan características morfológicas y bioquímicas similares a los enterocitos. Crecen en monocapa, tienen microvellosidades en la zona apical, y expresan enzimas con actividad hidrolasa. (Sambuy *et al.*, 2005). Esta línea celular ha sido usada, también, como modelo de barrera intestinal, pudiendo hacer estudios de transporte celular. Estas células se cultivaron en estufa gaseada con 5% de CO₂ a 37°C, en DMEM con SFB al 10%.

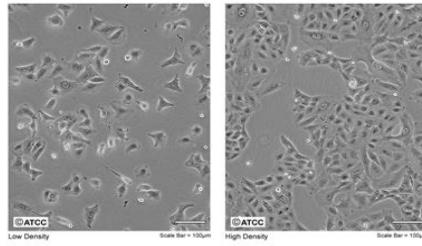
2.1.9 L929

La cepa L original se obtuvo de tejido adiposo y subcutáneo areolar normal de un ratón *Mus musculus* C3H/An macho de 100 días de edad en 1940. El clon 929 de la cepa L derivó en 1948. Son fibroblastos, crecen en monocapa adherentes. (*ECACC General Cell Collection: 85011425 L929*, n.d.). Estas células son utilizadas para estudios de toxicidad y son un buen huésped de transfección. Las mismas se mantuvieron en estufa gaseada con 5% de CO₂ a 37°C, en DMEM adicionado con 10% SFB.

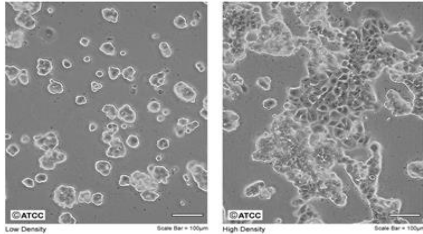
En la figura 2.1.1, están representadas todas las líneas celulares antes expuestas.



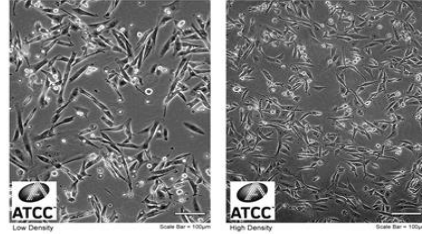
MG-63



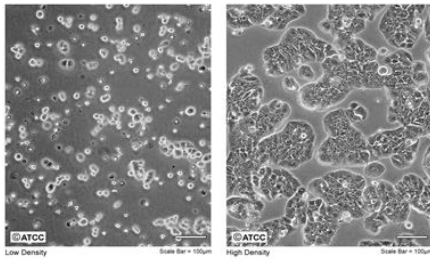
A549



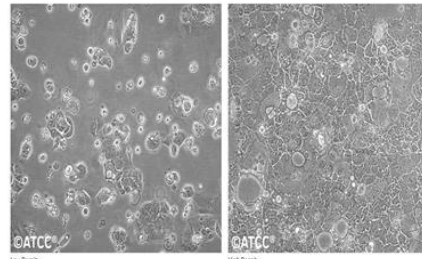
MCF7



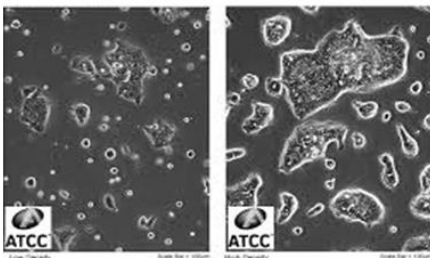
MDA-MB-231



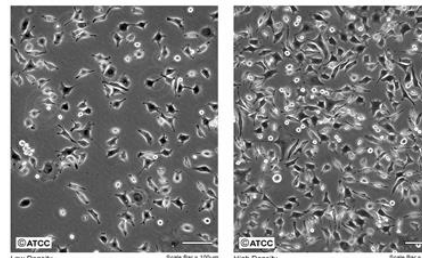
HT-29



CACO-2



LS174T



L929

Figura 2.1.1. Fotografías de las líneas celulares que se utilizaron en este trabajo de tesis, obtenidas de la página de American Type Culture Collection de líneas celulares (https://www.atcc.org/en/Products/Cells_and_Microorganisms/Cell_Lines.aspx).

2.2 Síntesis de los complejos estudiados

2.2.1 Síntesis de complejos organoruthenio-8-hydroquinolinato (Ru-hq).

Estos complejos fueron sintetizados en la Facultad de Química y Tecnología Química, de la Universidad de Ljubljana, de Slovenia bajo la dirección del Prof.Dr. Iztok Turel. Los compuestos resultantes fueron caracterizados por diversas técnicas, reflexión total atenuada, espectro infrarrojo, difracción de rayos X (cristales), resonancia magnética nuclear (RMN H^1 y C^{13}) y por fluorescencia.

Se sintetizaron 2 compuestos de Rutenio:

2.2.1.1. $[\eta^6$ -p-cimeno) Ru (5-bromo-8-hydroxyquinolinato)Cl] (complejo 1)

Se procedió de la siguiente manera: 40 mg del precursor clorado fue suspendido en 30 ml de acetona. Luego de 10 min de agitación turbulenta y un suave calentamiento, 30.0 mg del ligando 5-Br-8-hidroxiquinolina fueron añadidos y 17.1 mg de NaOMe o NaOAc.3H₂O fueron agregados a la mezcla de reacción, la cual fue agitada *overnight* (ON) a T^o ambiente. La solución turbia fue filtrada con filtros de celite para remover precipitados inorgánicos y concentrarlos en un volumen de 3 a 5 ml. La adición de 20 ml de heptano frío resultó un precipitado amarillo. La formación de productos oleosos se evitó secando los solventes con sulfato de sodio y tamices moleculares. Luego los productos fueron purificados, del exceso de ligando, por cromatografía en sílica, donde se usa una mezcla de acetona/DCM como solvente de elución (Kljun *et al.*, 2018).

2.2.1.2. Clorido (5,7-dibromo-8-quinolinolato- $\kappa N1, \kappa O8$)(η^6 -p-cimeno)rutenio(II) (complejo 2)

El ligando 5,7-dibromo- 8-hidroxiquinolina (1 equivalente) y metóxido de sodio (1.1 equivalente) fueron disueltos en una mezcla de 8 ml de cloroformo y 15 ml de metanol. Luego se adicionaron 200 mg del dímero de rutenio, bis [dicloro η^6 -p-cimeno) ruthenium(II)] a la solución en agitación. El complejo formó un precipitado. Luego de

una agitación adicional por 1 h a T^o ambiente usando N₂ atmosférico, el precipitado fue recolectado por filtración, lavado con hexano y secado al vacío. (Kubanik *et al.*, 2015).

Ambos complejos de rutenio están representados en la figura 2.2.1.

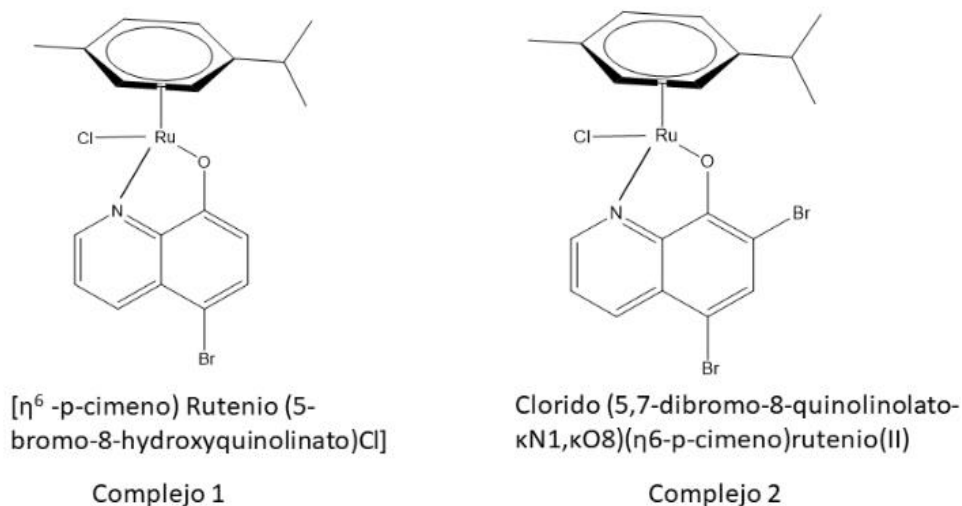


Figura 2.2.1. Estructura química de los complejos de rutenio usados en este trabajo de tesis.

Síntesis de los complejos de Cobre.

La síntesis de estos 2 complejos se llevó a cabo en el Departamento de Química de los Materiales, Facultad de Química y Biología, Universidad de Santiago de Chile, bajo la dirección del Dr. Luis Lemus. Estos complejos, una vez sintetizados, fueron caracterizados por espectroscopia U.V, cristalografía de rayos X y electroquímica.

2.2.2.1. [Cu^{II}(dmp)(CH₃CN)₂](ClO₄)₂ (complejo 3)

A una solución de 10 ml de acetonitrilo conteniendo 1.04 g de Cu(ClO₄)₂·6H₂O se agregó 15 ml de una solución de acetonitrilo de 2,9-dimetil-1,10-fenantrolina (dmp) en un baño de hielo. Luego de 30 min de reacción, se adicionó gota a gota 3 ml de una solución de Tetra-η-butilamonio perclorato (TBAP), y se formó un precipitado verde. Se dejó a -5°C por 15 min y luego fue filtrada. El sólido que se obtuvo fue lavado con etanol y finalmente con dietil éter. Se obtuvieron cristales de [Cu^{II}(dmp)₂(CH₃CN)](ClO₄)₂ por

difusión lenta de dietil éter de una solución saturada del complejo en acetonitrilo seco, en un periodo de 24 h.

2.2.2.2. $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{phen})(\text{CH}_3\text{CN})_2](\text{ClO}_4)_2$ (complejo 4)

A 15 ml de una solución de acetonitrilo con 0.20 g de fenantrolina fue agregado a 10 ml de una solución de acetonitrilo con 0.2 g de $\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$, luego se sometió a agitación por 1 h. La solución fue secada en un rotavapor bajo presión y luego se agregó 10 ml de dietil éter y luego agitado por 30 min, 3 veces. Luego se removió el dietil éter, obteniendo un polvo verde. Cristales de $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{phen})_2(\text{CH}_3\text{CN})](\text{ClO}_4)_2$ fueron obtenidos por difusión lenta de dietil éter de la solución del complejo en acetonitrilo luego de 3 días.

La estructura química de ambos complejos está representada en la figura 2.2.2.

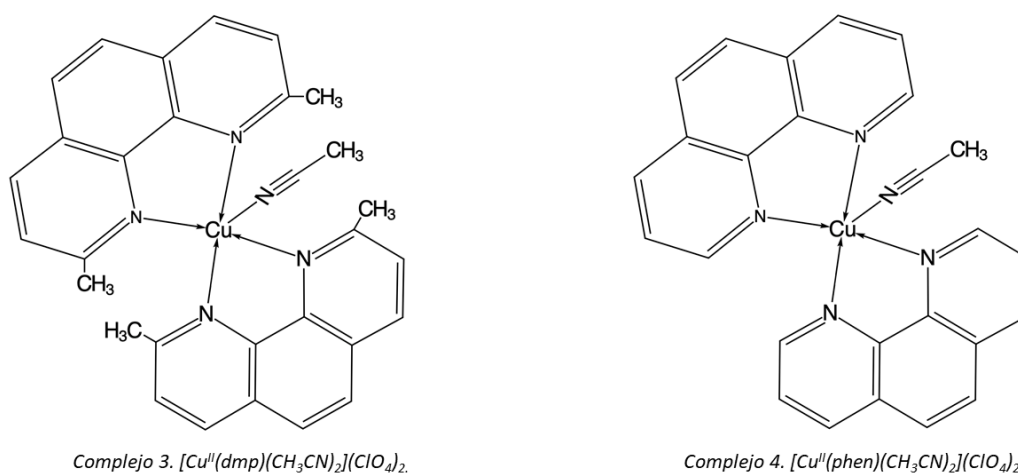


Figura 2.2.2. Estructura química de los complejos de cobre.

2.3 Estudios de viabilidad

2.3.1 MTT (Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol)

Este método fue desarrollado por Mosmann en 1983 como método colorimétrico cuantitativo de microtitulación para determinar la supervivencia de células mamíferas (Mosmann, 1983). El método se basa en la reducción de la sal tetrazolio amarilla MTT

(3-(4, 5-dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazolium bromide). Esta sal es reducida por células metabólicamente activas, por la acción de deshidrogenasas mitocondriales, como NADH y NADPH, a formazan ((E,Z)-5-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-1,3-difenilformazano, un cristal insoluble color violeta. Los cristales de formazan son solubilizados y cuantificados con un lector de placa a 570 nm. Este método mide la tasa de proliferación celular y por el contrario, cuando los eventos metabólicos conducen a la apoptosis o necrosis, la reducción de la viabilidad celular (Type & Collection, 2011). (Figura 2.4.1.1).

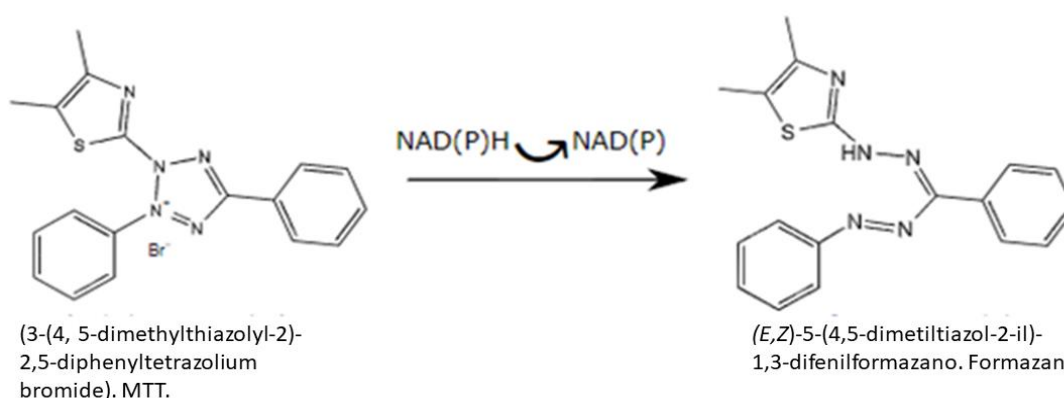


Figura 2.4.1.1 Reacción base del reactivo de MTT

En este experimento, se sembraron entre 150.000 a 250.000 cel/ml, según la línea celular, en placa de 96 wells en DMEM completo, *overnight*. Luego se colocaron las sustancias a testear, previamente diluidas en DMEM, por 24 h. Como control se usó el solvente de los complejos disuelto en DMEM, en este caso DMSO, a una concentración del 0.5%. Al finalizar este periodo, la placa se lavó con 100 μ L de PBS, y se agregaron 100 μ L de una solución 0.5 mg/mL de MTT en DMEM. La placa se incubó en oscuridad por 3 h a 37°C, luego de dicho tiempo se descartó el sobrenadante, y se agregaron 100 μ L de DMSO para disolver los cristales de formazan. Luego se realizó la lectura de la absorbancia en un lector de placas, Multiskan FC Thermo a 570 nm. La viabilidad celular fue normalizada con respecto al control y representadas como porcentaje de ello.

2.3.2 Ensayo de proliferación celular: clonogénico

El ensayo clonogénico o ensayo de formación de colonia es un ensayo que se basa en la habilidad de una célula individual de crecer formando una colonia (la misma consiste en

al menos 50 células). El ensayo detecta todas las células que retienen la capacidad de producir progenie luego del tratamiento que pueden causar muerte celular o daño. Solo una fracción celular retiene la capacidad de producir colonias. (Franken *et al.*, 2006).

En una placa de 12 *wells*, se sembró 500 cel/ml en un volumen final de 1.5 ml. Se incubaron por 24 h y se realizó el tratamiento con las diluciones correspondientes de los complejos a testear. Se probaron las mismas concentraciones que en MTT. Luego del tratamiento se eliminó el medio de cultivo y se lavó suavemente con PBS. Se agregaron 1.5ml de medio con SFB y se incubó por 10 días. Pasado este tiempo se fijó y se tiñó con glutaraldehído al 6% más cristal violeta durante 30 min. Se lavó suavemente con agua corriente, se dejó secar. Se contó el número de colonias en las que había más de 50 células. Se calculó la eficiencia de plaqueo (EP) y la fracción de sobrevivientes (FS), con las siguientes formulas:

$$EP = \frac{N^{\circ} \text{ de colonias}}{N^{\circ} \text{ de células plaqueadas}} * 100$$

$$FS = \frac{N^{\circ} \text{ de colonias}}{EP * \text{células plaqueadas}}$$

2.4 Mecanismos de acción de los complejos

2.4.1 Ciclo celular.

La regulación del ciclo celular se encuentra alterada en las células tumorales, por lo que este proceso sirve como un *target* viable para los compuestos usados en la terapia del cáncer. Uno de los métodos de *screening* para drogas potencialmente terapéuticas es medir los cambios en la cinética del ciclo celular y el contenido de ADN usando tinciones nucleares.

Numerosas sondas fluorescentes han sido desarrolladas para el análisis del ciclo celular. El Ioduro de Propidio (IP) es un colorante que tiene la capacidad de intercalarse en la hélice de ADN de las células fijadas y permeabilizadas. Este tipo de tinción genera

perfiles característicos que indican el contenido de ADN, por lo que es posible identificar la proporción de células en cada una de las fases del ciclo celular. (Cycle, n.d.)

Para llevar a cabo este experimento se sembró en una placa de 6 *wells* alrededor de 300.000-400.000 cel/ml, en un volumen final de 2 ml, teniendo en cuenta dejar un control negativo (células sin teñir). Luego de 24 hrs de incubación, se realizó el tratamiento por 24 hrs con los complejos a las concentraciones deseadas. Pasado este tiempo, se retiró el medio de cultivo y se colocó en un tubo cónico de 15 ml, se lavó la placa con 1 ml de PBS, y se colectó en el mismo tubo. A cada *well* se le colocaron 200 μ l de tripsina-EDTA o triple, y se incubó por 5 a 10 min. Se neutralizó con 400 μ l de medio completo, y se homogeneizó la suspensión. Se colocó todo en el mismo tubo cónico, y se centrifugó a 300 g por 5 min. Se descartó el sobrenadante, se resuspendió el pellet y se lavó con PBS frío, centrifugando nuevamente y descartando el sobrenadante. Para la fijación se utilizó etanol 70% frío, que fue agregado gota a gota, 500 μ l, mientras se agita el tubo a baja velocidad. Se incubó por 1 hr a 4 °C y luego se centrifugó a 300 g por 5 min. El pellet se resuspendió en 300 μ l de PBS/EDTA 2 mM. Esta solución se filtró para eliminar los agregados celulares, se contó las células y se ajustó a una concentración final de 0.8 y 1×10^6 cel/ml. Se agregó 15 μ l de RNAasa (1 mg/ml) (es necesario eliminar el ARN ya que el IP puede teñirlo) y se incubó por 15 min. Finalmente se agregó 15 μ l de IP y se incubó *overnight*. Luego se analizaron las muestras en el citómetro CyAN ADP, en el canal FL3 (λ_{exc} 488), en el que se analizaron 10.000 eventos por muestra. Los resultados fueron analizados por el software FlowJo 10. Las fases del ciclo celular así como el histograma de frecuencias están esquematizados en la figura 2.5.1.1.

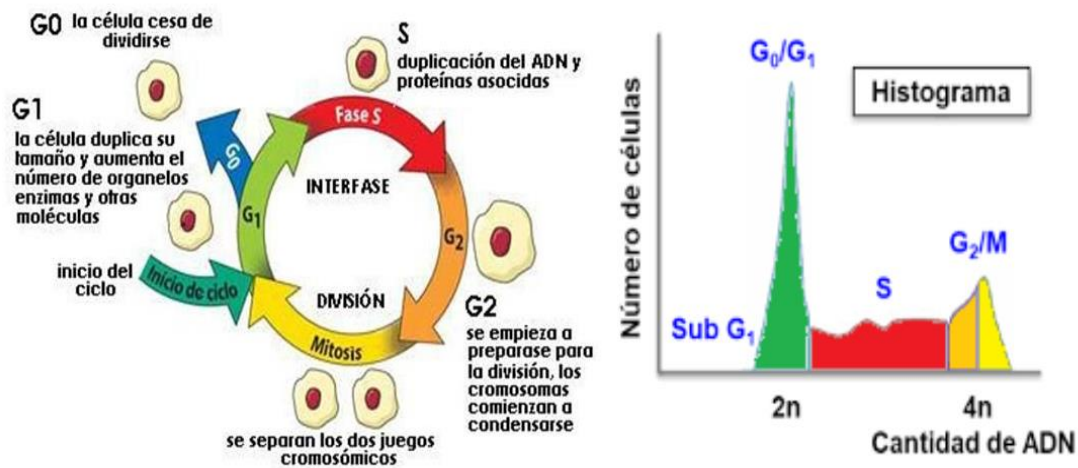


Figura 2.5.1.1. Esquema de las fases del ciclo celular, con su correspondiente representación en un histograma de frecuencias.

2.4.2 Apoptosis.

La capacidad de los compuestos de inducir este tipo de muerte es importante, ya que de lo contrario, la muerte por necrosis generaría lisis tumoral. Es una complicación letal provocada por la liberación masiva de ácidos nucleicos, potasio y fosfato hacia la circulación sistémica, pudiendo desencadenar el desarrollo de hipercalemia, hiperfosfatemia, hiperuricemia e hipocalcemia, lo que provocaría un estallido inflamatorio exacerbado (Delgado *et al.*, 2018).

La evaluación de este proceso se realizó de las siguientes maneras:

2.4.2.1 Anexina/IP

La translocación de residuos de fosfatidilserina (FS) desde la cara interna de la membrana plasmática a la superficie celular es un evento que tiene lugar en los primeros estadios de la apoptosis y que por lo tanto puede utilizarse para detectar y medir este proceso. La anexina V tiene una fuerte afinidad, Ca^{2+} dependiente, por los residuos de FS lo que puede ser utilizado como prueba para la detección de la apoptosis. Al conjugar la Anexina V con un fluorocromo puede identificar las células apoptóticas una vez que esta se ha unido a los residuos de FS expuestos en la superficie celular. Además puede utilizarse combinada con otros fluorocromos, en este caso el IP, lo que permite la diferenciación entre poblaciones apoptóticas y no apoptóticas. En este caso se realizó el

marcaje de las células con IP, indicador de muerte celular, y Anexina V-FITC lo que permite la diferenciación entre poblaciones vivas, necróticas, apoptóticas y apoptóticas tardías. En la figura 2.4.2.1 esta esquematizado este proceso.

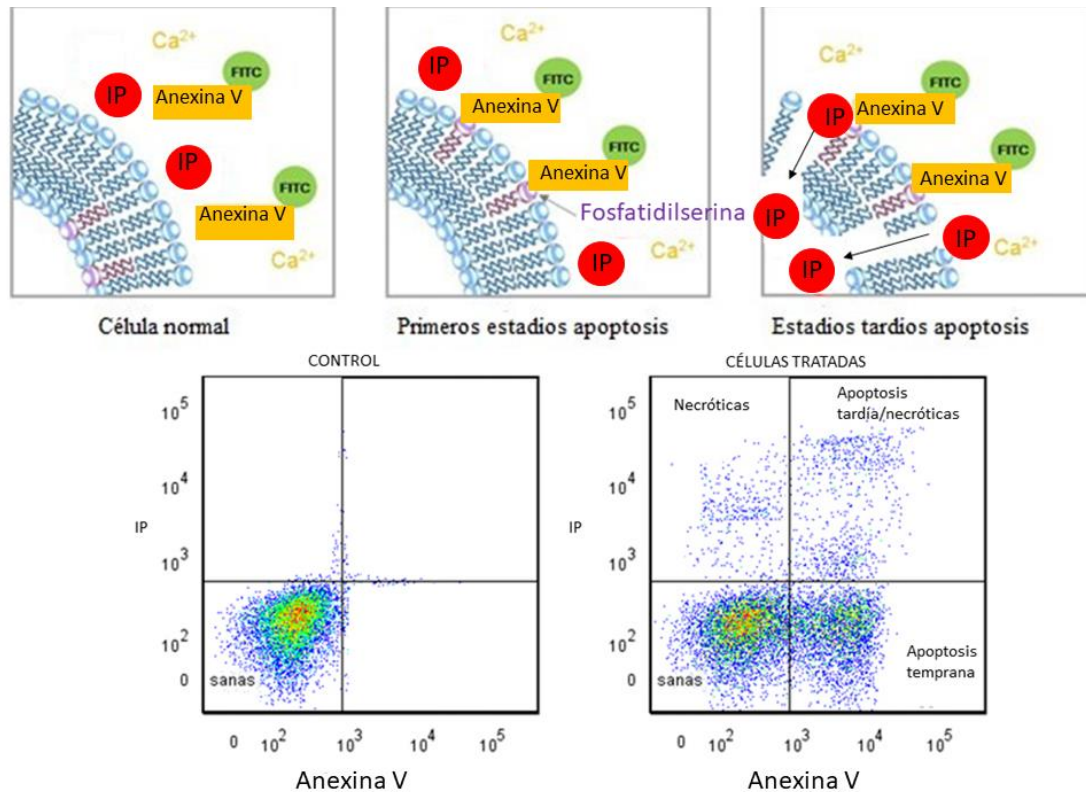


Figura 2.4.2.1. Panel superior representación de la externalización de la fosfatidilserina, y en el panel inferior, dot plot obtenido en el citómetro de flujo.

Se sembraron entre 100.000-150.000 cel/well (placas de 12, 1 ml). Se consideraron un control negativo (células sin teñir), un control de anexina (+) y control de IP (+), sumado al control respectivo del ensayo a largar. Se incubó ON y se realizó el tratamiento con las concentraciones de los complejos correspondientes. Para el sacrificio, se recogió el medio condicionado de los wells y se los colocó en tubos de 15 ml, se lavó con PBS las placas y el sobrenadante se colocó en el mismo tubo. Se agregó 300 µl de tripsina-EDTA o tryple™ en cada well, se incubó 4 min a 37°C y luego se inactivó el tryple™ o tripsina con 600 µl de medio con SFB. Todo se pasó al tubo y se centrifugó a 500 rpm por 5 min. Posteriormente, se eliminó el sobrenadante y se agregaron 500 µl de PBS para el lavado. Se realizó una segunda centrifugación a 500 rpm por 5 min. Para marcar las células con las sondas se eliminó el PBS y se agregó 100 µl de buffer anexina, y luego se adicionó 2

μl de anexina, se incubó 20 min a T° ambiente y en oscuridad. Antes de realizar la medición se adicionó 1 μl de IP (stock: 1 mg/ml) a los tubos. Las medidas se llevaron a cabo en un citómetro de flujo BD Accuri (Instituto Pasteur de Montevideo) y el Facs Calibur (Instituto de Estudios Inmunológicos y Fisiopatológico), en los canales FL1 y FL2, los datos se analizaron con el programa FlowJo, y se usó el Dot plots como gráfico para representar los mismos. Como control positivo, se colocó 25 μM de estaurosporina por 4 hrs.

2.4.2.2 Microscopía de fluorescencia

Otro método para evaluar este proceso es mediante microscopía. Se realiza utilizando colorantes con afinidad a la cromatina. Puede realizarse simplemente una tinción con hematoxilina-eosina, aunque generalmente se prefieren colorantes fluorescentes fundamentado en su mayor sensibilidad. Si se emplean células fijadas, puede emplearse Hoechst, DAPI, IP, etc. Sin embargo, mediante la elección de colorantes adecuados, puede lograrse la identificación de células apoptóticas y necróticas en cultivos frescos, sin fijación previa. Para ello, se utiliza la combinación de Naranja de Acridina (NA), un colorante vital, que penetra en todas las células, y bromuro de etidio (BrEt), el cual solo penetra en las células muertas. La tinción verde del NA permite la identificación de células apoptóticas según los criterios morfológicos del núcleo, es decir condensación y fragmentación nuclear. Este colorante tiñe en menor medida el citoplasma, lo que facilita la observación, ya que puede determinarse al mismo tiempo, redondeamiento celular, burbujeo de la membrana y hasta la expulsión de cuerpos apoptóticos. A diferencia de la célula apoptótica, la célula necrótica, no muestra ninguna de estas características, por lo que la tinción con NA, al menos en los primeros estadios de la necrosis, es indistinguible de una célula viva. Para ello se utiliza una segunda marcación con IP. Si una célula presenta un núcleo no condensado ni fragmentado, y es permeable al IP, esta célula es necrótica. En cambio, si la célula es permeable al IP pero presenta un núcleo condensado, se trata de una necrosis secundaria a la apoptosis y la célula se categoriza como apoptótica, apoptosis tardía. Las siguientes características caracterizan uno u otro proceso:

- Núcleos verdes, pálidos (no condensados), no fragmentados: célula viva.
- Núcleos condensados, posiblemente fragmentados, con tinción verde o casi amarilla: célula apoptótica.
- Núcleo naranja o rojo, no condensado: célula necrótica.
- Núcleo naranja, condensado, fragmentados: necrosis secundaria, se cataloga como apoptóticas.

Para este experimento, las células fueron sembradas a una densidad de 50.000 cel/*well* sobre cubreobjetos, en una placa de 24 wells. Luego de una incubación *overnight*, se trató las células con los complejos a las concentraciones y tiempos deseados. Luego del tratamiento, se elimina el medio de cultivo y se reemplaza por 5 µgr/ml de NA por 1 hr y luego 3 min con IP en PBS. Se lavó con PBS. La evaluación se realizó de inmediato, por lo que se tomó el cubreobjeto y se lo puso contra un portaobjeto, sin medio de montaje. Se analizaron en un microscopio de fluorescencia Arcano, con filtros verde y azul. Se observaron las células apoptóticas cada 500 células totales.

2.4.2.3 Activación de caspasa 3/7

Para el estudio de la activación de la caspasa 3/7 se utilizó un kit comercial de citometría de flujo denominado CellEvent™. Este kit permite la detección por citometría de flujo de caspasa-3 y caspasa-7 en células apoptóticas. El kit incluye el reactivo de detección verde de caspasa-3/7 CellEvent™ de sustratos fluorogénico y el reactivo SYTOX (reactivo B) que discrimina células vivas y muertas. El reactivo de detección verde de caspasa-3/7 CellEvent™ es un reactivo que penetra en las células y que consta de un péptido de cuatro aminoácidos (DEVD) conjugado con un colorante de unión de ácidos nucleicos. Durante la apoptosis, las proteínas caspasa-3 y caspasa-7 están activadas y pueden disociar la secuencia de reconocimiento de caspasa 3/7 codificada en el péptido DEVD. La disociación de la secuencia de reconocimiento y el enlace de ADN por el reactivo, marca las células apoptóticas con una señal brillante fluorogénica que tiene una absorción/emisión máxima de 511/533 nm aproximadamente. Cuando se utiliza junto con la tinción de células muertas SYTOX, las células apoptóticas se pueden discriminar

de las células vivas y necróticas. En la figura 2.4.2.3 se esquematiza el fundamento de este kit de ensayo.

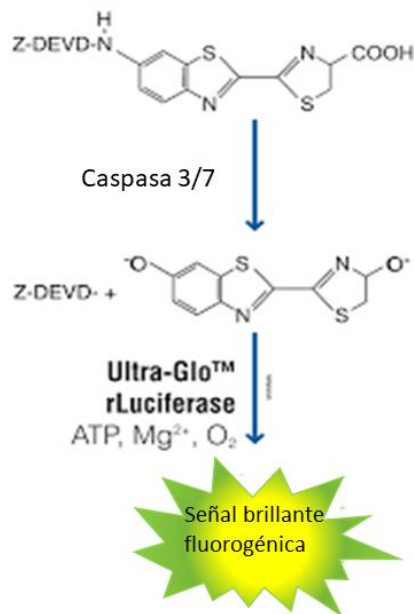


Figura 2.4.2.3. Fundamento del kit de ensayo para determinar la activación de las caspasas 3/7.

Se sembraron 500.000 cel/ml en placa de 12 wells, se incubó ON y se realizó el tratamiento de las mismas con las distintas concentraciones de complejo. Se usó estaurosporina como control positivo. Luego del tratamiento durante el tiempo deseado, se lavaron las placas con PBS, se recogió el sobrenadante en un tubo de 15 ml, se trataron las placas con 100 µl de tryple™ por 5 min y luego se agregaron 200 µl de medio completo. Se levantó todo en el mismo tubo y se centrifugó por 5 min a 1500 rpm. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió con 500 µl de PBS. Se agregó 1 µl del reactivo A (concentración final 500 nM), y se incubó por 45 a 60 min a Tº ambiente, protegido de la luz. Durante los 5 min finales se agregó 1 µl de reactivo B (concentración final 1 µM). Se analizaron las muestras sin fijar, usando una longitud de onda de excitación de 488 nm y colectando la emisión usando el filtro 530 para el reactivo de caspasa y 690 para el reactivo Sytox. Se analizó en el citómetro BD Accury y los datos obtenidos se analizaron en el programa FlowJo.

2.4.3 Potencial Redox

2.4.3.1 Determinación de especies reactivas del oxígeno

Se midió la producción de ERO usando dihidrorodamina 123 (DHR 123) como sonda. El reactivo de permeabilidad celular DHR 123 es un colorante fluorogénico que es útil para la detección de ERO como el peróxido y el peroxinitrito. Después de la captación celular, el DHR 123 se oxida por ERO en un compuesto fluorescente (rodamina 123).

Se llevó a cabo de la siguiente manera, se sembró una placa de 24 *wells* con 100.000-150.000 cel/*well*, volumen final 1 ml. Se incubó ON. Se preparó las soluciones stock de los compuestos a ensayar con el disolvente adecuado (DMSO) a una concentración tal que en la placa el disolvente no supere el 0.5%. El control se realizó solo con el disolvente a una concentración del 0.5%. Se adicionaron los complejos en la placa y se dejó incubando por el tiempo deseado. Pasado el tiempo de incubación, se descartó el medio de cultivo, se lavó con buffer Hanks 1X, y se colocó la sonda DHR123 a una concentración final de 10 μM , y se incubó por 30 min a 37°C en oscuridad. Se lavó con solución de Hanks dos veces, se colocó tritón 0.1% y se incubó en oscuridad por 45 min. Pasado este tiempo, el extracto celular fue analizado para determinar el producto oxidado por fluorescencia. Las longitudes de onda a las cuales se llevó a cabo la medida fueron, λ_{exc} 300 nm y una λ_{emi} 610 nm, en el espectrofluorímetro Shimatzu. Luego se normalizó y corrigió por el contenido proteico por el método de Bradford.

2.4.3.2 Relación GSH/GSSG.

El fundamento de la técnica está representado en la figura 2.4.3.2. El estudio del sistema antioxidante, se llevó a cabo de la siguiente manera, se sembraron alrededor de 100.000 cel/ml en placa de 24 *wells*, se incubó ON, y luego se realizó el tratamiento con los complejos a las concentraciones deseadas por 24 hrs. Se descartó el medio, se lavó con 100 μL de PBS frío, se descartó. Se agregaron 250 μl de tritón X-100 al 0.1%, se incubó en heladera cubierto de la luz por 30 min. Se homogeneizó el lisado celular y se dividió la muestra en 2 partes, una para medir GSH y la otra para medir GSSG. Para medir el

GSH, se colocó en los tubos correspondientes a cada condición, 100 µl de muestra, 1.8 ml de buffer GSH, 100 µl de OPT, se incubó en oscuridad por 15 min, y se determinó la fluorescencia en el fluorómetro Shimatzu a una longitud de onda de excitación de 350 nm y de emisión a 420 nm. Para determinar GSSG, en cada tubo se colocó 100 µl de muestra, 20 µl de NEM (enmascara el GSH), incubar en oscuridad por 20 min. Luego se adicionó 1.8 ml de buffer GSSG y homogeneizar (el GSSG paso a GSH), se adicionaron 100 µl de OPT y finalmente se determinó la fluorescencia a la misma longitud de onda. Para el cálculo de la relación de uso la siguiente fórmula:

$$GSH/GSSG = (IF\ GSH) - (IF\ GSSG) / IF\ GSSG / 2.$$

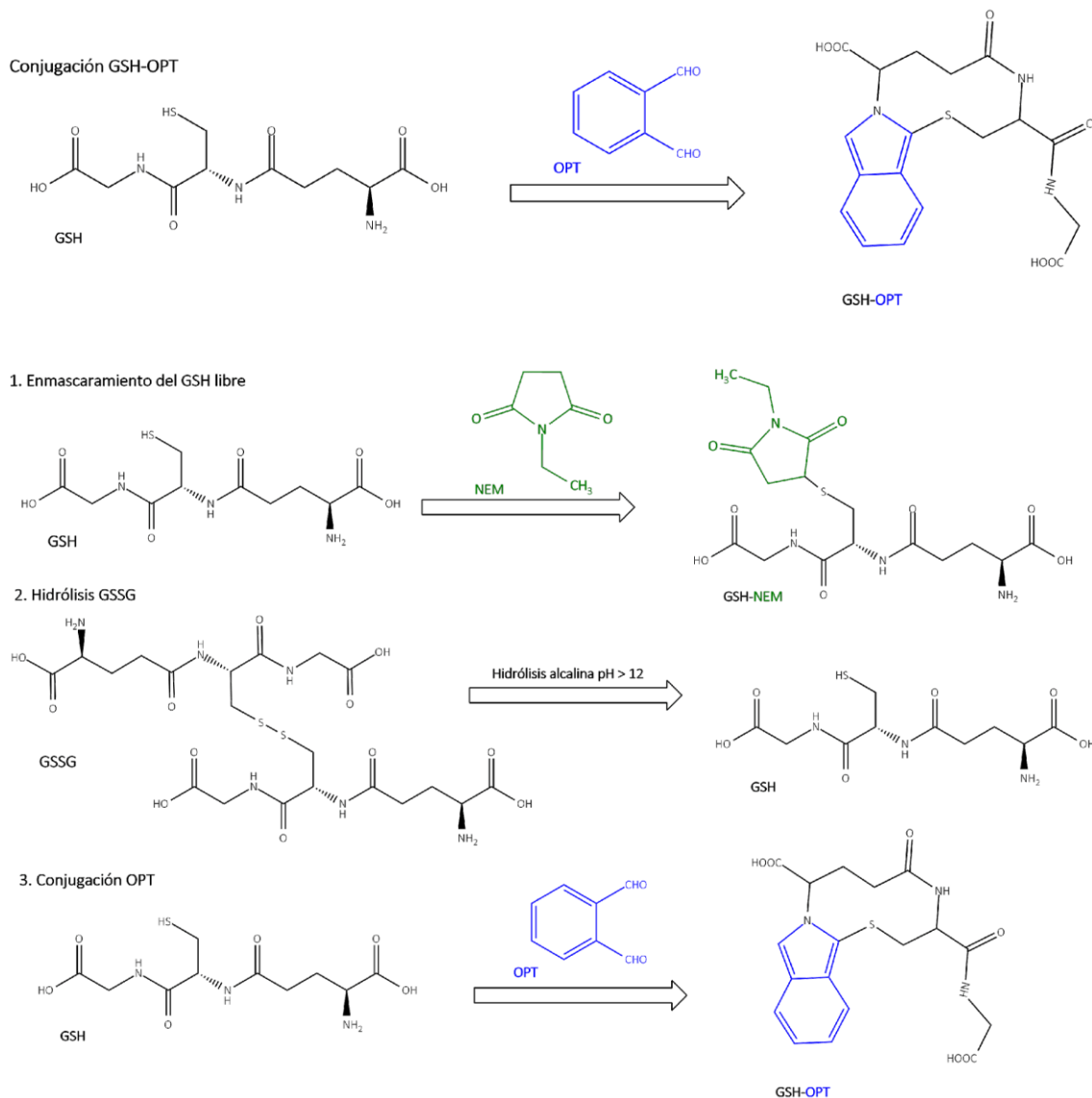


Figura 2.4.3.2 Fundamento del método para determinar la relación GSG/GSSG.

2.4.3.3 Potencial de membrana mitocondrial (PMM).

La evaluación de la despolarización de la membrana mitocondrial es uno de los métodos más usados para la identificación de apoptosis por citometría de flujo.

El PMM se determinó de dos maneras, 1) por espectrofluorescencia, usando la sonda rodamina y DIOC6 2) por citometría de flujo usando la sonda DIOC6.

En el 1er método, se sembraron 150.000 cel/ml en placa de 24 *wells*, se incubaron ON y se realizó el tratamiento correspondiente. Luego del mismo, se descartó el medio y se lavó con PBS la placa. Se incubó con rodamina (5 µgr/ml) por 30 min. Se lavó con PBS frío, y se incubó otros 30 min con DMEM. Se lavó nuevamente con PBS y luego la sonda se extrajo con una mezcla de etanol/agua 1:1. La fluorescencia se leyó a una longitud de onda de 505 y de emisión de 560 nm. Por otro lado, se usó la sonda DIOC6 a una concentración final de 400 nM. Fue agregada a cada *well* e incubada por 30 min a 37°C en 5% de CO₂. Luego de la incubación se lavó las células con PBS, se eliminó el sobrenadante, y se agregó 500 µl de PBS. Se levantaron las células mediante *scrap*.

El segundo método se llevó a cabo usando citometría de flujo, con la sonda DIOC6 (yoduro de 3,3'-dihexiloxacarbocianina). Esta sonda es ampliamente usada como indicador citofluorométrico de las variaciones en el PMM. Es una sonda que permea las células, tienen fluorescencia verde y es selectiva para las mitocondrias cuando es usada a bajas concentraciones. Para producir resultados rigurosos y reproducibles, la concentración de la sonda y el número de células deben ser monitoreados. DiOC₆ es un fluorocromo que se incorpora en mitocondrias con elevado potencial de membrana mitocondrial. Sin embargo, cuando la mitocondria padece un decaimiento de potencial de membrana, se produce una pérdida de este fluorocromo y, consecuentemente, una pérdida de la fluorescencia detectada por citometría de flujo.

El protocolo llevado a cabo fue el siguiente, las células fueron plaqueadas a una concentración de 150.000 cel/ml en una placa de 12 *wells*, se incubaron ON y se llevó a cabo el tratamiento deseado. La sonda se diluyó en PBS para obtener una concentración final de trabajo de 0.1 µM. Se levantaron las células con tryple TM, se trataron las

mismas con la solución de trabajo a 37°C, en oscuridad por 15 min. , y luego se centrifugó 130 g por 5 min. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron las células en PBS a T° ambiente. Se lavó dos veces y se evaluó en un citómetro de flujo Becton Dickinson FACScalibur junto con una sonda de viabilidad, verde de metilo. Los datos se colectaron en los canales FL1 y FL3, y se realizaron histogramas para ver el corrimiento de los picos. Como control positivo de la alteración del PMM se utilizó carbonil cianida clorofenilhidroazona (CCCP). Esta sustancia es un ácido débil, soluble en lípidos y un potente agente de desacoplamiento mitocondrial, ya que aumenta la permeabilidad de protones a través de la membrana mitocondrial interna, disipando así el potencial de la membrana, con la consecuente despolarización mitocondrial (*Carbonyl Cyanide Chlorophenylhydrazone - an overview | ScienceDirect Topics*, n.d.). Las células se expusieron por 30 min a este reactivo a una concentración de 0.5 µmol/l. Los datos fueron analizados en el programa FlowJo 10.0.

2.4.4 Ensayos de genotoxicidad

2.4.4.1 Formación de micronucleo

El ensayo de micronúcleos (MN) puede ser efectivo si pueden identificarse las células que se hayan dividido 1 vez luego de la exposición, porque solo las células en división pueden generar un MN.

Los micronúcleos son cuerpos de cromatina rodeados por membranas y son visibles durante la interface celular. Los MN contienen fragmentos cromosómicos así como cromosomas enteros, luego de una alteración en la segregación cromosómica durante la etapa de anafase. Por lo tanto, su origen está asociado a una mutación cromosómica numérica o estructural. Debido al origen del MN, permite detectar efectos en la estructura del cromosoma, agentes clastogénicos, o errores durante la segregación, agentes aneugénicos. Estudios mostraron que MN puede realizar síntesis de ADN y pueden ser reincorporados a los núcleos, en las mitosis siguientes, dando lugar a cariotipos anormales. Esta síntesis de ADN es defectiva y asincronizada, llevando a daño del ADN post replicativo. Esto produce una fragmentación extensiva del cromosoma en el MN cuando la célula llega a la mitosis, como consecuencia de la compactación de,

cromosoma mientras la replicación aun esta activa, “condensación prematura del cromosoma” (Russo & Degrassi, 2018). En la figura 2.4.4.1 se representa la formación de los micronúcleos.

Experimentalmente, se sembraron 50.000 células en un volumen final de 2 ml en placa de 6 *wells*. Se incubó overnight, y se adicionó la sustancia a testar, en las concentraciones deseadas. Estas diluciones se realizaron en medio de cultivo con suero fetal bovino. El control positivo del ensayo se realizó con un pulso de 30 min de bleomicina (BLM) a una concentración final de 1 µg/ml. Luego de los 30 min, se eliminó la BLM y se adicionó medio de cultivo completo, y a todos los *wells* se adicionó citocalasina B. Luego de una incubación overnight se realizó el sacrificio. Se descartó el medio, se lavó con un 1 ml de PBS y se agregaron 2 ml de solución hipotónica, 0.075M KCl, por 5 min a 37 °C. Luego se realizó una prefijación con 1 ml de una solución 3+1 de metanol/ácido acético, durante 10 min, a T° ambiente. Luego de este tiempo se descartó el sobrenadante y se agregaron 2 ml de metanol frío y se incubó 10 min a -20°C. Luego de este tiempo se descartó el metanol, se dejó secar y se procedió a teñir con Giemsa al 5% durante 10 min. Se lavó con agua, y se dejó secar. Se realizó la observación en un microscopio de contraste de fase, se contaron 1000 células binucleadas a 400x por condición. Los criterios empleados para su identificación fueron reportados por Fenech: los MN son morfológicamente idénticos, pero más pequeños que los núcleos normales, su diámetro es entre 1/16 y 1/3 del núcleo principal, no refractario, no está unido al núcleo principal por un puente nucleoplásmico, y puede algunas veces existir una superposición con el núcleo principal (Fenech, 1993).

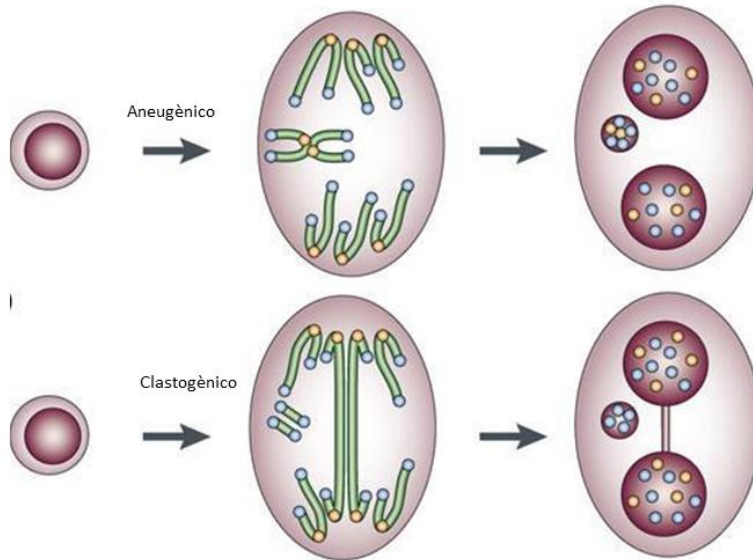


Figura 2.4.4.1. Esquema gráfico de la formación de micronúcleo, como consecuencia de la acción de un compuesto genotóxico, aneugénico o clastogénico.

2.4.4.2 Ensayo cometa

La electroforesis de célula individual (SCGE) o ensayo cometa, desarrollado por N.P.Singh, es un ensayo para detectar rupturas de simple o doble hebra del ADN. Luego fue modificada para detectar una variedad de otras lesiones, como las bases oxidadas, detectadas mediante el uso de Endonucleasa III que detecta pirimidinas oxidadas. Es un ensayo ampliamente usado en humanos para monitorear daño en el ADN como marcador de exposición a agentes genotóxicos o para investigar efectos genoprotectores (Collins *et al.*, 2014; Dhawan *et al.*, 2007).

Las ventajas de esta técnica incluyen: 1) la colección de datos a nivel de célula individual, permitiendo estadística más robusta, 2) se requiere bajo número de células por muestra, 3) la sensibilidad para detectar daño en el ADN y 4) cualquier célula eucariota es capaz de ser analizada. (Dhawan *et al.*, 2007). En la figura 2.4.4.2 se representa, mediante una fotografía, los cometas.

Se preparó agarosa de punto de fusión normal (APFN) al 0.5% en PBS. Se fundió en microondas y se tomó entre 150 a 180 μ l para extenderla sobre portaobjetos. Se dejó solidificar la agarosa en estufa o a T^o ambiente hasta que se seque.

Por otro lado, se sembraron entre 15.000 a 30.000 cel/ml en una placa de 12 wells. Se incubó overnight y luego se realizó el tratamiento correspondiente por 24 h, con dosis en las que la viabilidad de las células es entre un 70 a un 80%. Para el control positivo se realizó un pulso de 20 min con 20 µl de BLM. Luego de este tiempo se tripsinizaron las células, y se inactivó con medio de cultivo completo. Se levantó cada una de ellas en un eppendorf, se centrifugó a 1000 rpm por 5 min y se descartó el sobrenadante. Además, se preparó agarosa de bajo punto de fusión al 0.5% en PBS. Se la fundió y se agregó 75 µl al eppendorf con las células tratadas. De esta mezcla se tomó un volumen de 15 µl y se las colocó sobre el portaobjeto previamente tratado. Luego por encima se colocó un cubreobjetos, se lo dejó en heladera hasta que la capa de agarosa se endurezca (5 a 10 min). Se deslizó suavemente en forma lateral el cubreobjetos y las láminas se sumergieron suavemente en solución de lisis fresca y fría (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, ajustar pH 10 con NaOH, al momento de usar adicionar Tritón X-100 1 ml y DMSO 10 ml colocar a 4-8°C), protegidos de la luz y dejar a 4°C por 1 hr como mínimo. Luego de este tiempo, se retiraron los portaobjetos de la solución y se los colocó en una cubeta horizontal (sumergida en baño de hielo) que contenga el tampón de electroforesis (NaOH 10 M, EDTA disódico 200 mM) a 4°C, protegidos de la luz y se incubó por 20 min para que ocurra el desenrollamiento del ADN. Se corrió la electroforesis durante 30 min a 25 V y 250 mA. Luego se retiraron cuidadosamente las láminas de la cubeta y se efectuaron 3 lavados con tampón de neutralización (Tris-HCl 0.4 M pH 7.5) a intervalos de 5 min y uno final con agua destilada (gota a gota). Se dejó secar a T° ambiente. Los portaobjetos se tiñeron con SYBER Green (1:5000). Para la lectura de las láminas se utilizó un microscopio de fluorescencia, objetivo 40x y con filtros de excitación 515-560 nm con filtro de barrera 590 nm. Se cuantificaron 100 células por tratamiento y se tomaron fotos para medir la longitud del cometa desde el centro del borde delantero hasta el último grado visible en la cola. Para esto se utilizó un software Comet Score™ Freeware v1.5, con el cual se mide el *tail moment* de cada una de las células. La distancia de migración del ADN se usa para medir el grado de daño del ADN.

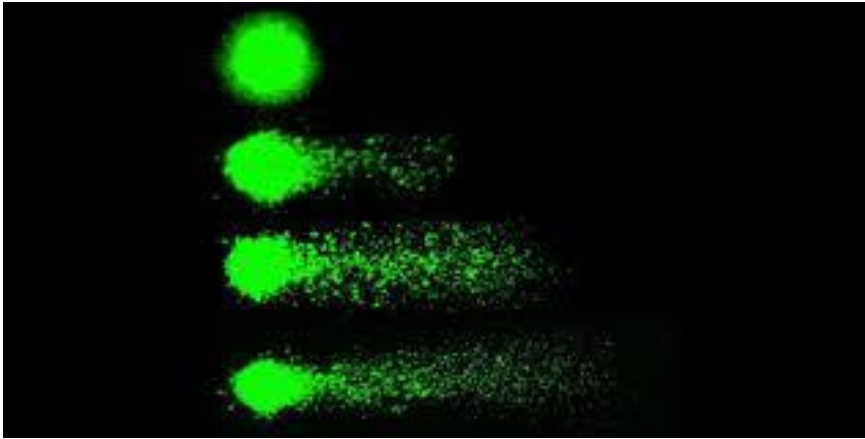


Figura 2.4.4.2 Fotografía de cometas celulares, como consecuencia de la acción de algún compuesto genotóxico.

2.4.5 Ensayos de migración e invasión celular

2.4.5.1 Herida

El ensayo de la herida (traducido del idioma inglés “Wound Healing”) es uno de los ensayos que más se acercan al estudio de este proceso debido a su simplicidad y facilidad para la visualización de las células durante la migración. El fundamento de esta técnica se basa en crear una región libre de células, la cual es generada físicamente eliminando las células de las monocapa. La introducción de esta herida provoca varias respuestas celulares, entre ellas el crecimiento y la migración celular (Riahi *et al.*, 2012).

Experimentalmente se sembraron células en placa de 12 *wells*, el número de células varía de acuerdo a la línea celular. Se dejó crecer por 24 horas o hasta confluencia del 90%. Luego de este tiempo, se eliminó el medio y se realizó la herida con un tip amarillo estéril. Se arrastró por la monocapa con un ángulo de inclinación de 30 grados, guiado por una regla flameada, para lograr una herida lo más recta posible. Se lavó la placa con PBS. En este momento se tomaron fotos de la herida para el tiempo cero (t_0). Luego se colocaron los complejos a las diluciones correspondientes. Se hizo el tratamiento por 24 hrs. Luego se eliminó el medio, se lavó con PBS y se procede a la tinción de las placas. Se fijó con metanol por 10 min, y luego se colocó giemsa al 5% por 10 min. Finalizada la coloración, se tomaron las fotos, (t_{24}). El análisis de las gráficas se hizo con el programa ImageJ, y se utilizó la siguiente fórmula:

$\% \text{ de migración} = ((\text{área de la herida original} - \text{área de la herida a las 24 hrs}) / (\text{área de la herida original})) * 100$

2.4.5.2 Formación de invadopodias

Este protocolo se basa en la utilización del colágeno tipo I, el principal componente de la MEC en tumores sólidos, como soporte para la invasión de las células.

Preparación de las placas: se realizó con una solución de colágeno tipo I a una concentración final de 1 mgr/ml, mezclando colágeno, 0.25M NaHCO₃, medio de cultivo y NaOH 1N. Se obtiene una solución de color violeta debido al rojo fenol, como indicador de pH, mayor a 9. Esta solución se mantuvo en hielo para evitar su gelificación. En una placa de 12 *wells*, que se mantuvo en hielo, se colocaron 750 µl de esta solución, y para permitir la gelificación del colágeno se colocó en estufa a 37°C por 1 hr. Se obtuvo una capa aproximadamente de 250 µm de espesor.

Preparación de células: las células se levantaron con digestión enzimática con tryple TM, a partir de un cultivo con crecimiento exponencial, con un 70% de confluencia. Se contaron las células y se preparó una suspensión celular de 1x10⁵ cel/ml. La suspensión celular se preparó en medio de cultivo con la sustancia a testear. Se sembró la mezcla sobre la superficie del colágeno. Se incubaron las células a 37°C. Luego del tiempo establecido, se calculó el índice de invasión (células con extensiones invasivas vs número total de células * 100) presentes en 10 a 15 campos microscópicos.

Este experimento está representado en la figura 2.4.5.2.

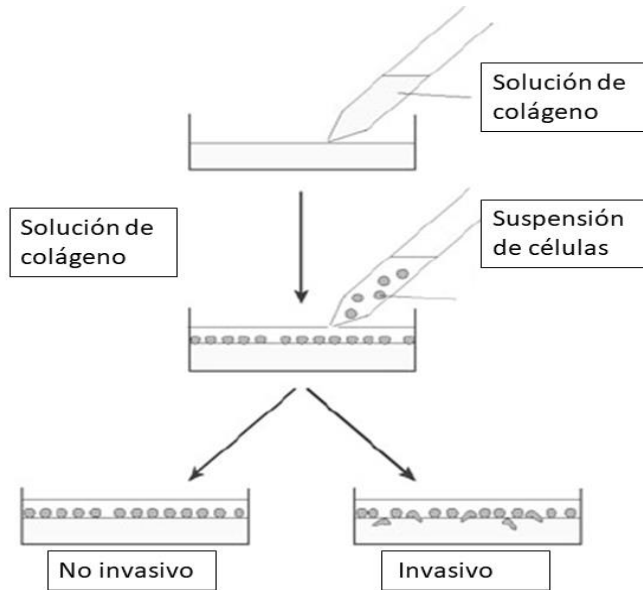


Figura 2.4.5.2. Esquema del experimento llevado a cabo para evidenciar la inhibición de la formación de invadopodias.

2.4.5.3 Zimografía

La zimografía es un ensayo simple para detectar enzimas proteolíticas capaces de degradar gelatina de varias fuentes biológicas. Es particularmente útil para evaluar 2 miembros claves de la familia de las metaloproteinasas, MMP-2 y MMP-9.

Este método se basa en una electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), permite detectar actividad enzimática. El sustrato es copolimerizado con la matriz de poliacrilamida. Las muestras para zimografía, no son expuestas a condiciones reductoras, no deben ser calentadas y tratadas con 2-beta mercaptoetanol (Wilkesman, 2017). Hay varios tipos de zimografía, de acuerdo al tipo de enzima que se desea detectar. En este tipo de zimografía en la que se usa gelatina como sustrato, se puede evaluar: el tipo de gelatinasa presente, su cantidad relativa y el estado de activación en cultivos celulares, tejidos y fluidos biológicos. La habilidad inherente de las gelatinasas de hidrolizar colágeno I, es la base para la detección de las MMPs por zimografía en gelatina. Este ensayo permite la identificación de la actividad gelatinolítica en muestras biológicas usando un gel de poliacrilamida con SDS copolimerizado con gelatina. Para conservar la actividad enzimática, las muestras se someten a electroforesis bajo condiciones no reductoras. Remoción del SDS del gel con Tritón X-100 y la incubación

con buffer de calcio produce la renaturalización de las enzimas, las cuales hidrolizan luego la gelatina del gel. Luego de la tinción del gel con *Coomasie Blue*, la presencia de las enzimas es detectada como bandas transparentes en un fondo azul. Durante la zimografía, la presencia de SDS resulta en una estructura terciaria desnaturalizada y una disociación del pro-dominio del sitio activo. Una vez que el sitio activo es expuesto, la enzima puede iniciar la degradación de la gelatina luego de la renaturalización parcial. El SDS también disocia la unión entre la gelatinasa activa y los inhibidores endógenos. (Toth & Fridman, n.d.).(Wilkesman, 2017).

Experimentalmente se procedió de la siguiente manera, en una placa de 12 *wells*, se sembraron las células, y se dejaron en cultivo a 37°C, hasta que las células estuvieran adheridas a la placa, lo cual depende de la línea celular. Una vez las células estuvieran adheridas, se elimina el medio, se lava con PBS y se colocaron 200 µl de las diluciones del compuesto a testear. Se incubó 24 hrs en estufa gaseada a 37°C. Se preparó un gel de poliacrilamida al 8% con 1% de gelatina. En el ensayo se usó el sobrenadante, el cual se mezcló con buffer de siembra 2x, y se sembraron 20 µl. La muestra se corrió 15 min a 80V y luego 120 min a 100V. Finalizada la electroforesis se lavó 4 veces con el buffer de lavado cada 15 min durante 1 hr. El mismo contiene Tris-HCl 50 mM pH 7.6 y Tritón X-100 al 2%. Luego se eliminó el buffer con agua destilada. Luego de los lavados se incubó el gel con el *Developing Buffer* en agitación durante 30 min. Este buffer consta de Triton-X100 2.5%, Tris-HCl 50 mM pH 7.5, CaCl₂ 5 mM y ZnCl₂ 1 µM. Pasado el tiempo de incubación, se lavó y se colocó *Developing Buffer 2*, y los geles se colocaron a 37°C en estufa sin agitación por 18 a 48 hrs, dependiendo de la actividad de MMPs de las muestras. Este último buffer contiene Tris-HCl 50 mM pH 7.5, CaCl₂ 10 mM, ZnCl₂ 1 µM y NaCl 200 mM. Finalmente, una vez que se desarrolló la actividad gelatinasa se lava el gel con agua destilada y se tiñe con *Commasie Blue* por 1 a 2 hrs, y se destiñe con una mezcla de 10 ml de metanol más 5 ml de HAc y 85 ml de agua destilada.

2.5 Interacción con ADN

Antes de iniciar con este ensayo, se preparó el Ct-ADN y calculó su concentración por espectroscopía U.V. Para ello a 2 g de Ct-ADN se le adicionan 2 ml de NaCl 0.09%. La solución se incubó a 4°C, en ausencia de luz por 12 h para que se disuelva en forma óptima. Para determinar la concentración se preparó una dilución 1:20 empleando 20 µl de la solución de ADN, se midió la absorción en un rango de λ de 200 a 400 nm, sabiendo que tiene una banda característica a 260 nm. Sabiendo que el ADN tiene un coeficiente de extinción molar de 6600 mol.cm², se calculó la concentración de ADN con la siguiente fórmula:

$$A = E * L * C$$

La unión del complejo al ADN, es caracterizada, entre otras, por dos variables: variaciones en la absorbancia (hipo o hiper Cromismo) y por el desplazamiento en la longitud de onda. Estos efectos se deben al modo de interacción entre el cromóforo aromático y los pares de bases del ADN.

2.5.1 Modificación de variables

2.5.1.1 Mantener constante la concentración de Ct-ADN, variar la concentración del complejo de 0 a 500 µM

Para estimar la naturaleza de las interacciones supramoleculares, se monitorearon los cambios en la absorbancia a 260 nm luego de equilibrarlo 10 min a 37°C.

2.5.1.2 Mantener constante la concentración del complejo. Variar la concentración de Ct-ADN de 0 a 500 µM

Para determinar la constante de unión del complejo, K_b , se monitorearon los cambios en la absorbancia. Esto se llevó a cabo usando la ecuación de Wolfe-Shimer (ecuación 1) y los datos fueron analizados por la aproximación de Hildebrand (ecuación 2)

$$[ADN]/(Ea - Ef) = [ADN]/(Eb - Ef) + (1)/(Kb(Eb - Ef))$$

Ecuación 1.

Ecuación 2.

$$\frac{A_0}{A - A_0} = \frac{\epsilon_G}{(\epsilon_H - G) - \epsilon_G} + \frac{\epsilon_G}{(\epsilon_H - G) - \epsilon_G} x^{1/K} [ADN]$$

K: constante de asociación/unión

A₀: absorbancia de la droga

A: absorbancia del complejo con ADN

ε_G: coeficiente de absorción de la droga

ε_{G-H}: coeficiente de absorción de la droga unido al ADN

2.5.1.3 Espectro de fluorescencia

El decaimiento del espectro de emisión y luminiscencia del complejo fue realizado en concentraciones crecientes de Ct-DNA. Los datos fueron analizados de acuerdo a la ecuación de Stern-Volmer.

$$(I_0/I) = 1 + K_{SV}[CtDNA]$$

I₀/I= intensidad de fluorescencia, calculado como la integral bajo todo el espectro en ausencia y presencia de Ct-ADN.

K_{sv}= constante de Stern-Volmer.

Desplazamiento de BrEt: el BrEt es un agente intercalante del ADN. Tras la intercalación en las bases, el BrEt aumenta su fluorescencia aproximadamente 25 veces con respecto a la solución madre. En presencia de un agente intercalante, puede competir y desplazar al BrEt, por lo tanto la fluorescencia del BrEt-ADN-Complejo disminuye. La excitación del

BrEt 540 nm, y se hace un registro en un espectro a 550 a 800 nm en presencia de cantidad crecientes del complejo.

2.6 Captación celular del Cu por Espectroscopía de Absorción atómica acoplada a plasma inducido (ICP-MS)

Se midió la acumulación de Cu intracelular, por la técnica absorción atómica acoplada a plasma inducido (ICP-MS) siguiendo el protocolo de Pierce y colaboradores con algunas modificaciones. (Price *et al.*, 2011).

Se sembraron 2×10^5 células en placas de 10 mm en un volumen final de 8 ml con DMEM completo, hasta 80-90% de confluencia. Llegado a esta confluencia se colocaron los complejos por 24 h. Al día siguiente, se pasó el sobrenadante a tubos de 15 ml, se centrifugó a 500 rpm por 10 min. Se descartó el sobrenadante. Se disgregó la monocapa por tratamiento enzimático, se inactivó con DMEM completo y se transfirió a los mismos tubos. Se centrifugaron las muestras en una centrífuga Rolco CM 2036 de ángulo oscilante a 500 rpm durante 10 min. Se descartó el sobrenadante. Luego se lavó el pellet 2 veces con PBS frío, se centrifugó nuevamente en las mismas condiciones, y se descartó el sobrenadante, sacando la mayor cantidad posible. A cada tubo se agregaron 150 μ l de Tritón X-100 0.1% v/v. Se agitó en vortex por 10 min con el fin de inducir la lisis celular. Se separaron 10 μ l para medir proteínas. Luego a cada muestra se agregó 1 ml de HNO₃ al 20%, para la digestión de las muestras, se homogeneizaron en vortex, y luego se colocaron los tubos en un ultrasonido a 55°C a máxima potencia por 60 min aproximadamente. Luego de este tiempo, se colocó a 4°C por 48 h. Finalmente, las muestras se colocaron nuevamente en ultrasonido a 55°C 2 h. Se centrifugaron las muestras a 3000 rpm por 20 min, y se trasvasaron 1000 μ l a nuevos tubos de centrífuga.

Las muestras fueron analizadas en un espectrómetro de emisión atómica acoplado a plasma Inducido, Shimadzu, modelo ICPE-9820 (Unidad PlaPiMu LaSeSiC CIC-UNLP). Previamente, las muestras fueron trasvasadas cuantitativamente a matraces aforados de 10 ml y llevadas a volumen con agua destilada (Tipo II, conductividad eléctrica a 25°C < 1.0 mS/cm). Posteriormente fueron filtradas con filtros jeringa de 0.45 μ m y analizados

para cobre. La concentración de Cu fue calculada como microgramos de metal por miligramo de proteína basado en la concentración de proteínas del cultivo celular.

2.7 Sistema de cultivo 3D, Esferoides

La formación de los esferoides ocurre espontáneamente en ambientes donde las interacciones célula-célula predominan sobre las interacciones célula-sustrato. Los métodos convencionales para la formación de esferoides incluyen las técnicas: *hanging-drop* o técnica de gota colgante, cultivo de células en superficies no adherentes (LOT), producción en cultivo en suspensión, y estrategias de microfluídica. La capacidad de las células de formar esferoides por una u otra técnica, depende del tipo celular. Carlsson y colaboradores (Carlsson *et al.*, 1983) estudiaron la capacidad de 39 líneas celulares (en suspensión y adheridas) de formar esferoides por la técnica LOT. Los autores descubrieron que 10 de 12 líneas celulares normales y 16 de 27 líneas celulares tumorales, eran capaces de generar esferoides por esta técnica. Los resultados obtenidos además demostraron que la formación de esferoides es independiente del método de cultivo usado, en suspensión o en monocapa (Costa *et al.*, 2018).

En este trabajo de tesis se utilizaron 2 de estas 4 técnicas anteriormente detalladas, LOT (*liquid overlay technique*) y método de la gota colgante. Castachel y colaboradores y Yuhas y colaboradores fueron los primeros autores en describir la técnica de LOT en 1970. Esta técnica se basa en la inhibición de la adhesión celular a la superficie donde las células son cultivadas usualmente. Estas superficies tienen propiedades no adherentes y por lo tanto las interacciones célula-célula son más prominentes que aquellas entre las células y la superficie. Consecuentemente, las células se agregan llevando a la formación de esferoides en 1 a 3 días, para la mayoría de las líneas celulares. Los esferoides producidos a través de esta técnica representan propiedades de tumores sólidos, como lo demostró Amara y colaboradores, quienes observaron que la línea celular MCF7 de cáncer de mama era capaz de crecer como esferoides que simulan las estructuras tubulares y acinares encontrados en un cáncer de mama (Costa *et al.*, 2018b). Las placas son de poliestireno y tratadas con una capa de material no adherente como el polímero poli-HEMA o polímeros naturales como agarosa. Esta capa

reduce la unión de las células a la superficie, lo que facilita la unión entre las células, con la consecuente formación de los esferoides (Langhans, 2018). Agar y agarosa fueron los primeros biomateriales aplicados para el crecimiento de los esferoides por esta técnica y actualmente siguen siendo muy usados por su bajo costo y fácil manipulación. Para la preparación de las placas, el agar o agarosa es disuelta en agua o medio sin SFB, y esterilizados en autoclave. Luego la solución es agregada en el *well* y se deja unos minutos que la solución gelifique a temperatura ambiente (Costa *et al.*, 2018b).

La técnica de gota colgante fue inicialmente desarrollada por Keller y colaboradores, para obtener agregados de células embrionarias y hasta ahora esta técnica ha sido ampliamente usada para obtener esferoides tumorales. En esta técnica los esferoides son producidos manteniendo las células en suspensión dentro de una gota de medio de cultivo. Luego de cierto tiempo, las células empiezan a sedimentar, promoviendo las interacciones célula-célula y la formación de esferoides con tamaños similares (Costa *et al.*, 2018b). El tamaño de los esferoides puede ser controlado por el número inicial de células sembradas. Esta técnica requiere que los esferoides formados en las gotas sean transferidos a una nueva placa con superficie no adherente con un volumen mayor de medio de cultivo para asegurar condiciones óptimas de cultivo con los nutrientes y pH adecuados para asegurar la formación de esferas más grandes a través del tiempo (Langhans, 2018).

La ventaja de estas técnicas es que no requieren equipamiento o material sofisticado o costoso, lo cual hace que sean potencialmente atractivos para aplicar en la producción de esferoides.

Los esferoides se formaron por 2 métodos distintos, dependiendo de la línea celular. Experimentalmente se procedió de la siguiente manera: con las líneas celulares A549, HT-29 y HT29 Nfκβ se utilizó la técnica *Liquid Overlay* y con las líneas celulares MG-63 y MCF7 se utilizó la técnica *Hanging Drop*.

- *Liquid Overlay*: (figura 2.7) se gelificó agarosa al 1.5% durante 30 s a 1 min, en microondas a potencia media. Se colocó 50 μl de la misma en una placa de 96 *wells*, se dejó en el flujo hasta su solidificación. Luego el frasco con las células, se lavó con PBS, se

levantó las mismas con Tryple™ y se adicionó medio completo. Se contaron las células en cámara de Newbauer. Luego se procedió a sembrar 150 µl de la dilución celular en cada *well*. Finalizado el procedimiento se incubó en estufa a 37°C y 5% CO₂. El medio se cambió día por medio. El número de células y el tiempo de incubación requerido para la formación de los esferoides depende de la línea celular usada. En el caso de los esferoides de HT29, la agarosa se diluyó en RPMI.

- *Hanging drop*: (figura 2.7) el frasco con las células, se lavó con PBS, se levantó las mismas con Tryple™, y se adicionó medio completo. Se contaron las células en cámara de Newbauer, para obtener la concentración deseada de células. Una vez realizada la dilución en medio con SFB filtrado, en la tapa de una caja de Petri se realizan gotas de 15 µl, y en parte opuesta se coloca PBS para mantener la humedad. Se incubó la placa en estufa a 37°C y 5% CO₂. Para la línea MG-63 la incubación fue de 2 días y para la línea MCF7 se incubó por 3 días. Pasado este tiempo se preparó una placa de 96 *wells* con agarosa al 1%, se colocaron 150 µl de DMEM completo, y se coloca 1 gota por *well*. Se incubaron por 48 h (MG-63) a 72 h (MCF7) en estufa con CO₂ al 5% a 37°C. En la gota las células confluyen y se unen para iniciar el proceso de formación de los esferoides, y en la segunda incubación se terminan de formar los esferoides.

En ambos casos un microscopio de contraste de fase fue usado para monitorear la formación de los esferoides, tomando fotos cada vez, para examinar su tamaño. Un círculo 2D fue usado para la calibración. A partir de las fotos se midió perímetro y área con el software ImageJ con la herramienta Polígono. La modificación del área del esferoide fue calculada comparando el área de los esferoides tratados con el área de los esferoides control al mismo tiempo. La herramienta Polígono del software ImageJ fue usada para marcar el límite de los esferoides, calcular el área y la circularidad. La circularidad fue calculada con la siguiente ecuación, $(4\pi \times [Area])/[Perimetro]^2$, y los valores van desde 0 para un polígono alargado a 1 para un círculo perfecto.

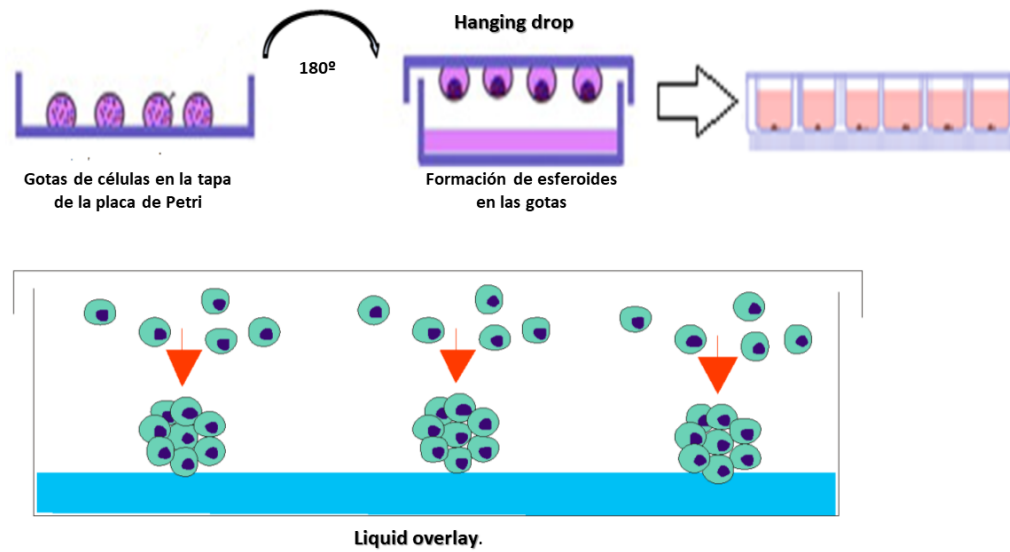


Figura 2.7. Esquema de las distintas técnicas para formas esferoides.

2.7.1 Viabilidad celular en esferoides

Resazurina, es una sonda azul soluble, que es internalizada por las células y es reducida a resorufina, un colorante rosa altamente fluorescente, que es liberado por las células (figura 2.7.1). La fluorescencia es proporcional a la actividad metabólica de la población celular. Es un sistema no invasivo para medir el número de células viables. Este método fue usado para medir la viabilidad de los esferoides ya que no era necesario destruir el mismo, para realizar la medida. La reducción irreversible de resazurina a resofurina, es mediada por diaforasas intracelulares, lo cual genera una señal fluorescente que es medida por un espectrofluórometro. Este ensayo no es tóxico para las células a la concentración y tiempos de incubación. Y es un método indirecto muy útil para medir la cinética de proliferación celular (Uzarski *et al.*, 2017).

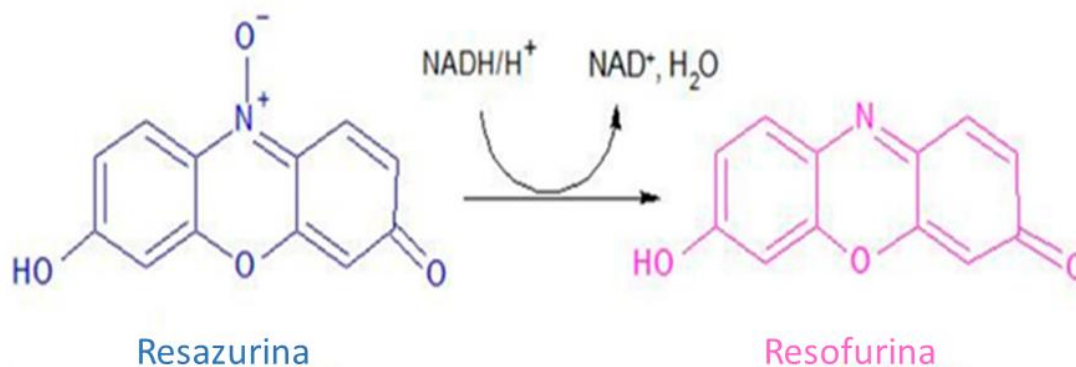


Figura 2.7.1 Fundamento del método de resazurina, para medir viabilidad de los esferoides multicelulares.

Para llevar a cabo este experimento se formaron los esferoides, y luego se trataron con distintas concentraciones de los complejos, por 24 a 48 h. Luego se agregó sobre esa mezcla, 15 μL de resazurina, quedando una concentración final de 400 μM . La resazurina se incubó por 1 a 3 horas, dependiendo de la línea celular con la que se formó el esferoide. Pasado este tiempo, se procedió a la lectura de la fluorescencia en un espectrofluorómetro Shimadzu RF-6000 a una λ_{exc} de 530 nm y de λ_{emi} de 590 nm. Como blanco se realizaron pocillos que contenían agarosa, DMEM y resazurina. La viabilidad fue expresada como porcentaje de las células control.

2.7.2 Microscopía de fluorescencia

Para llevar a cabo esta técnica, se tiñeron los esferoides con 2 sondas, FDA (fluoresceína diacetato) e IP para la evaluación de las células vivas y muertas. FDA es una molécula no fluorescente, la cual al ingresar la célula es hidrolizada por esterasas citoplasmáticas, a una sonda fluorescente, la fluoresceína. Este producto fluorescente es retenido por células que tengan su membrana plasmática intacta, por lo que solo se puede identificar las células viables (figura 2.7.2). Por otro lado, el IP es un agente intercalante fluorescente que se puede usar para teñir células y ácidos nucleicos. IP se une al ADN intercalando entre las bases con poca o ninguna preferencia de secuencia. Las células muertas no pueden acumular o hidrolizar FDA, estas se van a teñir con IP, quien atraviesa las células cuyas membranas han perdido la integridad.

Se prepararon las siguientes soluciones, 1) FDA, solución stock, de 5 mg en 1 ml de acetona (guardar a -20°C), y 2) IP solución stock 2 mg en 1 ml de PBS. La solución de tinción, medio de cultivo sin SFB 6 ml, FDA $10\ \mu\text{l}$ e IP $60\ \mu\text{l}$.

Una vez preparada esta solución se procedió a la tinción de la siguiente manera, se recolectaron los esferoides en una nueva placa, se removió el sobrenadante y se adicionaron $100\ \mu\text{l}$ de la solución de tinción. Se incubaron las muestras a T° ambiente por 4 a 5 min en oscuridad. Se removió la solución de tinción, se lavó con PBS, se agregó PBS a las muestras y se analizaron por microscopía de fluorescencia.

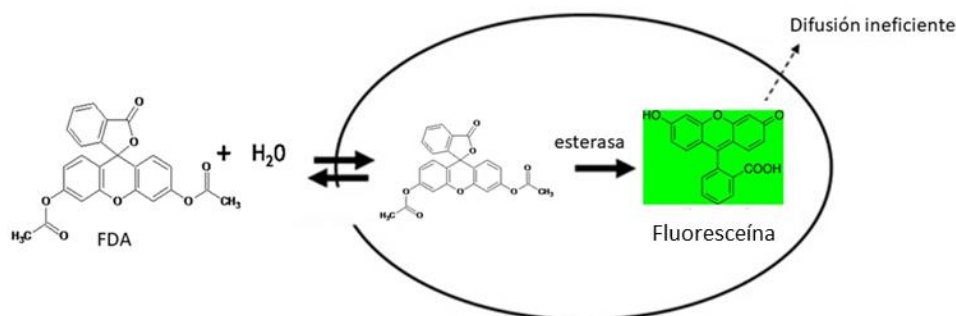


Figura 2.7.2 Fundamento sonda FDA para teñir esferoides.

2.7.3 Invasión en 3D

La naturaleza invasiva de las células cancerígenas está relacionada a su potencial metastásico, este proceso refiere a la migración de las células en MEC. El potencial invasivo y metastásico de las células tumorales son las responsables de la mayoría de las recaídas y presentan un fenotipo más agresivo (Riahi *et al.*, 2012). La capacidad de las células de migrar es un marcador de su transición epitelial-mesenquimal. Los ensayos de migración celular han sido desarrollados para testear drogas y su capacidad para reducir su transición a un fenotipo invasivo y metastásico. Los estudios de invasión son realizados colocando los esferoides en una superficie pretratada con por ejemplo vitronectina, o una placa embebida en geles como colágeno I, y midiendo la invasividad,

así como también analizando factores involucrados en la degradación de la matriz, como las metaloproteinasas (Katt *et al.*, 2016).

Los esferoides son embebidos en una matriz que consiste en colágeno I, simulando la matriz extracelular. Las células cancerígenas emergen del esferoide dentro de esta matriz que la rodea y es monitoreado a través del tiempo. La generación de los esferoides inicialmente restringe el movimiento celular, por lo que esas células luego son incentivadas a moverse luego de esta restricción. Aún más, una vez que esta limitación de movimiento es liberada, las células que egresan lo hacen de una manera uniforme que permite su cuantificación. El colágeno tipo I, comúnmente preparado por una digestión ácida de tendones y otras estructuras densas de colágeno, es mucho más que una simple matriz que sostiene elementos del tejido conectivo y soporta estroma de órganos del cuerpo. Se demostró que las características físicas del colágeno pueden regular comportamientos celulares como la movilidad, por ejemplo, el alineamiento de las fibrillas de colágeno en la interfase estroma-tumor que permite subsecuentemente migrar a las células a lo largo de estas fibrillas cuando invaden el estroma. El efecto de la inhibición o la estimulación de las vías de señalización que controlan la invasión pueden ser monitoreadas luego que los esferoides han sido embebidos en estas matrices (Berens *et al.*, 2015).

Para llevar a cabo este experimento se procedió de la siguiente manera: se generaron los esferoides de las líneas celulares. Una vez que alcanzaron el tamaño deseado, se preparó una placa con colágeno I. La solución de colágeno se preparó con 70% de colágeno I, 10% SFB, 10% NaHCO₃, 10% DMEM 10x, y se adicionó NaOH hasta que la solución tome color lila, indicando que llegó a pH aproximado de 9. En una placa de 12 *wells* se adicionaron 750 µl de esta solución, y se llevó a estufa a 37°C durante 1 h, para su gelificación. Por otro lado, se prepararon diluciones de la sustancia a testear en DMEM. Se colocaron sobre la capa de colágeno gelificada y luego a cada *well* se agregó un esferoide. Se incubaron a 37°C, y se realizaron observaciones cada 24 hrs. Luego de observar invasión, se detuvo el experimento y se tomaron fotografías de los esferoides control y de los tratados. Con el software ImageJ se midió la distancia de las extensiones desde el centro de los esferoides hasta el extremo de la invasión y se realizó la

comparación con los esferoides tratados. Este experimento esta esquematizado en la figura 2.7.3.

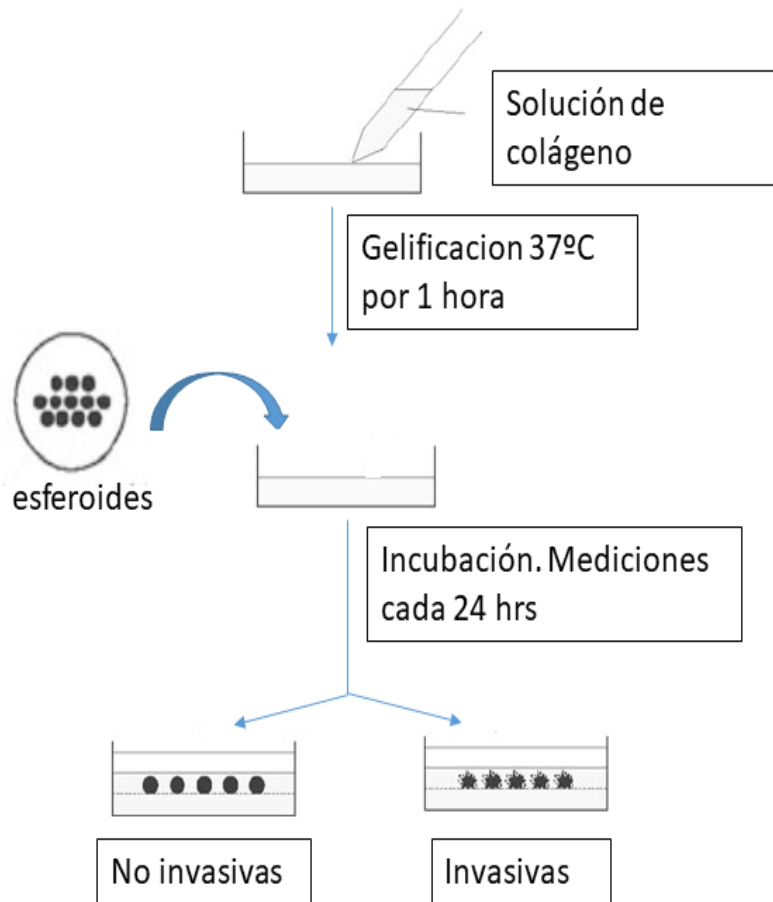


Figura 2.7.3 Esquema de técnica de invasión en colágeno para esferoides multicelulares.

2.8 Inhibición de la vía $\text{NF}\kappa\beta$ en la línea celular HT-29 $\text{NF}\kappa\text{B}$ hr-GFP

Para este ensayo se utilizó la línea HT-29 $\text{NF}\kappa\text{B}$ hr-GFP, tanto en monocapa como en cultivo 3D. Se sembraron 50.000 cel/ml en placa de 96 wells y los esferoides se generaron por el método "liquid overlay". Luego del crecimiento de los mismos, se trataron con las concentraciones de los complejos deseadas, y a las 2 h se realizó una estimulación con $\text{TNF}\text{-}\alpha$ (1×10^{-3} mgr/ml). Luego las placas fueron incubadas por 24 h en estufa gaseada a 37°C.

Para este ensayo se realizaron los siguientes grupos de muestras, 1) células sin estímulo y sin complejo (0% activación de la vía $\text{NF}\kappa\text{B}$) 2) células con estímulo y sin complejo

(100% de activación de vía NFκB), 3) células sin estímulo y con complejos, y 4) células con estímulo y con complejo. Las muestras 2D luego del tiempo de incubación, se trataron con Tryple™ por 5 min, luego se inactivó con medio completo y se recogieron en tubos de 1.5 ml y se les añadió 1 µl de IP, para analizar la muerte celular.

Los esferoides se pasaron a una placa de cultivo con fondo en U, se centrifugaron a 260g por 5 min, se lavó con 100 µl de PBS, se centrifugaron a 260g por 5 min a 4°C, luego se adicionó triple por 10 min y se agregaron 200 µl de medio completo para inactivar. Estos, luego se pasaron a tubos de 1.5 ml y se colocó 1 µl de IP al momento de analizar las muestras.

En ambos casos, las muestras fueron analizadas por citometría de flujo, Attune NxT, Acousting Focusing Citometer, equipados con los lasers 488 nm y 635 nm. La proteína verde fluorescente (GFP) y el ioduro de propidio (IP) fueron detectados con el filtro 530/40 y 613/20, respectivamente. Para cada muestra, 10.000 células fueron analizadas. Solo las células IP negativas fueron consideradas para el resultado, y el porcentaje de células GFP positivas fue normalizado con el porcentaje de células obtenidas con TNF-α.

2.9 Estudios *in vivo*

2.9.1 Evaluación de la actividad antitumoral de metalofármacos de cobre en ratones N:NIH(S) Fox1^{nu}

Dentro de las líneas inmunodeficientes el más empleado es el ratón exocriado N:NIH(S)-Fox1^{nu}. Este ratón, también llamado *nude*, se originó de forma espontánea en 1962, en una colonia cerrada en Escocia. Esta cepa, presenta en estado homocigota, una mutación espontánea lo que le produjo su fenotipo desnudo o sin pelo, característica que le dio el nombre a la mutación. Otra de las características importantes, es que carecen de un timo funcional y producen un número reducido de células T maduras por lo que no rechazan tejidos alo y xenotransplantados, además también contribuye a esto, alteraciones en bazo, linfonódulos y Placas de Peyer. El hecho de que acepten el trasplante de tumores humanos ha sido uno de los descubrimientos más importantes que ha contribuido con el desarrollo de las investigaciones sobre el cáncer, convirtiendo

a estos individuos en el primer modelo de animal de experimentación inmunodeficiente. A través del uso de estos ratones, se hicieron hallazgos importantes en quimioterapia, radioterapia, inmunoterapia, etc. (Carbone & Maschi, n.d.). Los xenotrasplantes en este modelo de ratón, permiten un seguimiento fácil del desarrollo tumoral, ya que generalmente se producen en forma de nódulos móviles, bien irrigados y encapsulados en tejido conectivo. Una característica fundamental que los hace útil para evaluar terapias antineoplásicas, es que retienen las características biológicas y bioquímicas del tumor de origen. La implantación subcutánea de los tumores o inyección de células tumorales es apto ya que al ser piel muy laxa, permite fácilmente el crecimiento tumoral. Este modelo sirve además, para evaluar la citotoxicidad de drogas, para mejorar esquemas de dosificación, estudiar mecanismos de resistencia y para seleccionar drogas para su uso potencial en clínica (<http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/87590>).

Esta etapa experimental, se realizó con la colaboración del bioterio de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata. Por su condición de inmunodeficientes, deben mantenerse en ambientes bajo un sistema de barreras sanitarias absolutas. Su condición microbiológica es la de animales SPF (*Specific Pathogen Free*), esto significa que tienen su flora intestinal normal y que están libres de microorganismos patógenos específicos. Los animales requieren alimento y agua de bebida estéril, humedad relativa entre 40 y 60%, y un fotoperiodo uniforme luz/oscuridad de 14/ 10 horas. El ratón desnudo requiere una temperatura más elevada que las cepas tradicionales, se recomienda entre 25 +/- 1º C. Los animales fueron alimentados *ad libitum*. Las cajas se cambiaban una vez por semana, con renovación de cama (aserrín estéril), alimento y de agua. La manipulación de los animales se realizó bajo cabina de seguridad tipo II.

En una primera etapa, se inocularon 2 ratones hembras N:NIH (S) *Fox1^{nu}*, de manera subcutánea, con 4x10⁶ cel/ml de la línea celular humana HT-29 de adenocarcinoma de colon, en un volumen final de 200 µl. Luego de 2 semanas, se formaron tumores de aproximadamente 0.5 x 0.7 cm de ancho y de largo. Estas hembras fueron sacrificadas, se les extrajo el tumor y fueron cortados en pequeñas porciones para repicar y propagar el tumor al resto de ratones. Se trabajó con 15 ratones hembras N:NIH (S) *Fox1^{nu}*, de 4

semanas de edad. A los ratones se los anestesió con una solución de xilacina (0.02 cm³)/ketamina (0.8 cm³) diluidos en 1 ml de diluyente (cada animal recibió 0.2 cm³). Se esperó 5 min, y se procedió a inocular el tumor.

Luego de 2 semanas se observó crecimiento tumoral de aproximadamente 0.3 x 0.4 cm de ancho y largo. A partir de este momento se dio inicio al tratamiento correspondiente. A los ratones se los dividió en 3 grupos: 1) grupo control, tratados con vehículo (PEG más 0.5% de DMSO), 2) grupo 2 tratados con el complejo de cobre 3 y 3) grupo 3 tratados con el complejo de cobre 4. Las concentraciones de compuestos usados fueron 4 mg/Kg de ratón, disueltas en PEG. El tratamiento consistía en una inyección subcutánea una vez por semana. Por otro lado, se evaluó el tratamiento realizando mediciones, 3 veces por semana, del tamaño tumoral, con un calibre de Vernier, y mediante el peso del ratón. Para el cálculo del volumen tumoral, se utilizó la siguiente fórmula: $Volumen\ tumoral = \frac{largo * ancho^2}{2}$. Entiéndase por largo, la porción más larga del tumor y ancho, la porción más angosta. Estos valores fueron expresados en milímetros. Luego de finalizado el tratamiento, se procedió al sacrificio de los ratones con una mezcla de CO₂/O₂. Se realizó la necropsia en la que se extrajo el tumor, hígado y riñón para su posterior análisis histopatológico.

2.9.2 Análisis de la vía Wnt/ β -Catenina en modelos *Xenopus*

El uso de los ovocitos, huevos y todo el organismo de *Xenopus* en investigación oncológica ha sido ampliamente empleado para el estudio de la biología del tumor, así como para estudiar alternativas terapéuticas. Los ovocitos de *Xenopus* son una herramienta útil para investigar cascadas de señalización, sus efectos en el crecimiento celular y en estudios del metabolismo del cáncer.

Durante el desarrollo embrionario de *Xenopus*, las vías de señalización son usadas por sus múltiples roles incluyendo la formación de ejes, la inducción y la supresión de genes de expresión, la regulación de la migración celular y el control de la proliferación celular. Dicho esto, se concluye que cualquier tratamiento que altere la señalización normal de la vía Wnt, resulta en la formación anormal de los segmentos en este modelo *in vivo*. El índice Dorso-anterior (DAI por sus siglas en inglés) es el sistema para clasificar el grado

de la malformación del eje, desarrollado por Kao y Elinson en 1988. En esta escala, los embriones normales son clasificados grado 5, embriones que pierden las estructuras dorsales (ventralizan) son clasificadas desde 0 a 4, y los embriones con estructuras dorsales exageradas (dorsalizan) son clasificadas del 6 al 10. Si la vía está sobreexpresada, los embriones dorsalizan, con exagerada cabeza y ausencia o reducción del tronco, por el contrario, si la expresión de la vía está disminuida, los embriones ventralizan, es decir pierden las estructuras dorso-anteriores, como la cabeza, la glándula de cemento, el ojo y la vesícula óptica (Amado *et al.*, 2013; Myers *et al.*, 2014)

Este experimento se llevó a cabo, en el Instituto INSIBIO, Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia, Universidad Nacional de Tucumán bajo la asistencia de la Prof.Dra Celeste Tribulo.

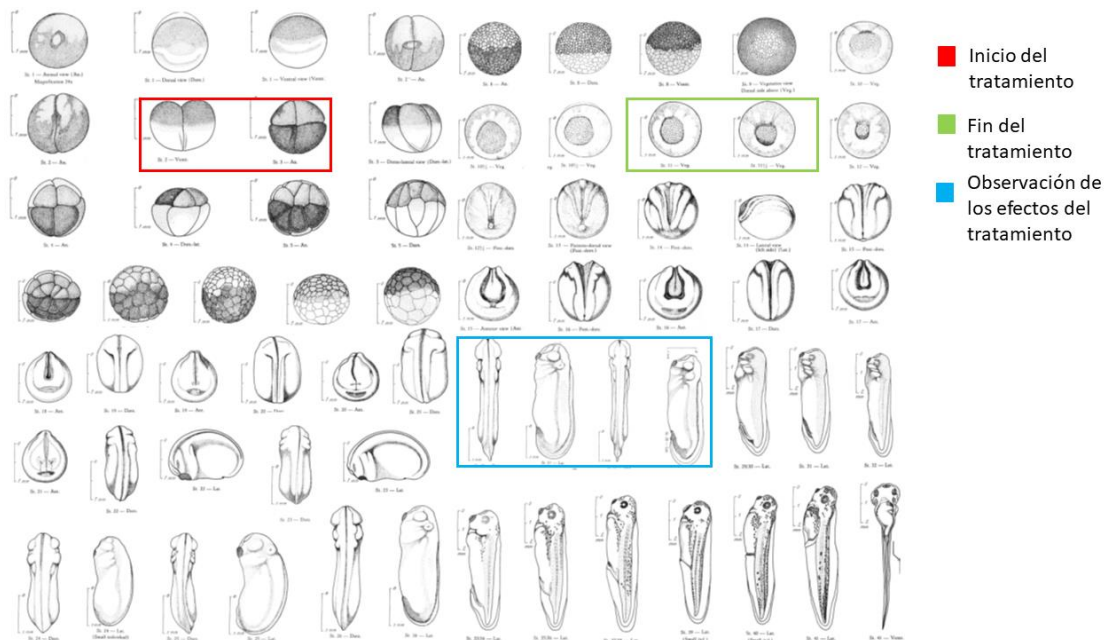
Las ranas de *Xenopus laevis* se mantienen en el bioterio en peceras. Cada pecera contiene un máximo de 8 ranas separadas según el sexo, el agua es previamente declorada, manteniendo un pH entre 6,5-8,5. Las variables físicas se controlan de manera tal de generar las condiciones ambientales que aseguren una temperatura de 18°-20°C, periodos alternados de luz y oscuridad de 10-12 h. Se alimentan periódicamente con carne, suplementando su alimentación con preparados alimenticios comerciales.

Para obtener embriones, primero se debe estimular a las ranas. Para esto, se inyecta la hormona Gonadotrofina Coriónica Humana (hGCH). Su forma de presentación es un polvo liofilizado, el cual se debe mantener a 4°C. Para su uso, debe diluirse en solución fisiológica o agua estéril. La hGCH se inyecta entre el cordón nervioso y la columna vertebral de manera subcutánea. Luego de la estimulación, en un periodo de aproximadamente 8 hrs, las ranas empiezan a ovular. Para la recolección de embriones se utiliza una pipeta Pasteur, los mismos se van depositando en una caja de Petri. Luego se los lava con cisteína al 2% para eliminar la envoltura vitelina que los rodea, luego se enjuaga 3 veces con agua destilada. Finalmente, se los lava con NAM 1/10 y se los coloca a 25°C hasta alcanzar el grado de división deseado.

Experimentalmente, se llevó a cabo de la siguiente manera: se colocaron aproximadamente 75 embriones por *well*, en una placa de 12 *wells*. Se los incubó a 25°C hasta que llegaron al estadio de 2 a 4 células, momento en que se los trato con los complejos a testear. El tratamiento duró hasta el estadio de división 11 ½-12. Momento en el cual, se eliminó el tratamiento mediante lavados, y se los incubó con NAM 1/10. Los embriones se colocaron en cava a 14°C, hasta llegar al estadio de desarrollo 27-28, para la evaluación de su fenotipo. Durante esta incubación, se los monitoreo en la lupa, y se contabilizaron los embriones muertos, los cuales se iban eliminando.

La evaluación fenotípica se hizo en base al índice dorso anterior (DAI), el cual permite hacer una estimación si la vía Wnt/ β - Catenina se ve afectada por los tratamientos.

En la figura 2.9.2. en el panel superior se pueden observar los estadios de desarrollo de *Xenopus laevis*, además están señalados los distintos momentos en que se lleva a cabo los experimentos antes mencionados. En el panel inferior se muestra una fotografía del índice dorso anterior para clasificar las alteraciones en el desarrollo.



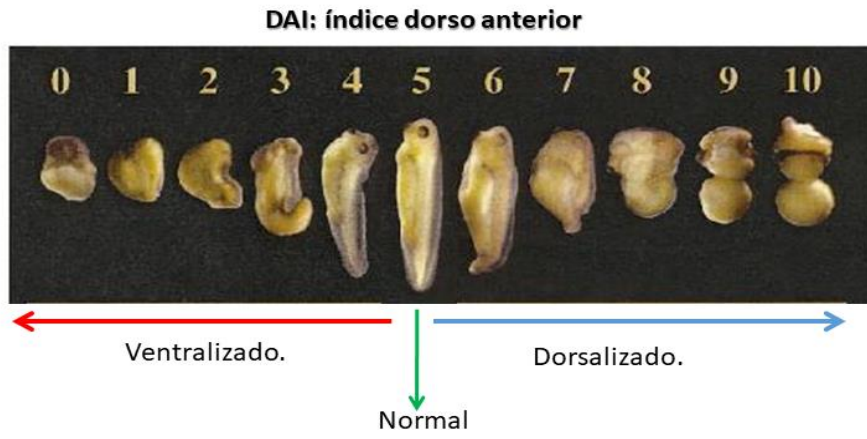


Figura 2.9.2. Panel superior: Estadios de desarrollo de *Xenopus laevis*. Panel inferior. DAI, sistema de clasificación de las alteraciones morfológicas de los embriones.

2.10 Bibliografía

<http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/87590>

1. *Caco-2 [Caco2] ATCC® HTB-37™ Homo sapiens Colon Colorectal*. (n.d.). Retrieved February 23, 2020, from <https://www.atcc.org/Products/All/HTB-37.aspx#characteristics>

Cycle, C. (n.d.). Life , Death , and Cell Proliferation A product guide to Apoptosis , Cell Cycle and Cytotoxicity Table of Contents. *Toxicology*.

ECACC General Cell Collection: 85011425 L929. (n.d.). Retrieved February 24, 2020, from https://www.phe-culturecollections.org.uk/products/celllines/generalcell/detail.jsp?refId=85011425&collection=ecacc_gc

Holliday, D. L., & Speirs, V. (2011). Choosing the right cell line for breast cancer research. In *Breast Cancer Research* (Vol. 13, Issue 4, p. 215). BioMed Central. <https://doi.org/10.1186/bcr2889>

In vitro cultivation of human tumors: Establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. (1973). *Journal of the National Cancer Institute*, 51(5), 1417–1423. <https://doi.org/10.1093/jnci/51.5.1417>

Levenson, A. S., & Jordan, V. C. (1997). MCF-7: The first hormone-responsive breast cancer cell line. In *Cancer Research* (Vol. 57, Issue 15, pp. 3071–3078). American Association for Cancer Research.

LS 174T ATCC® CL-188™ Homo sapiens colon Dukes' type B,colo. (n.d.). Retrieved February 22, 2020, from <https://www.atcc.org/Products/All/CL-188.aspx#characteristics>

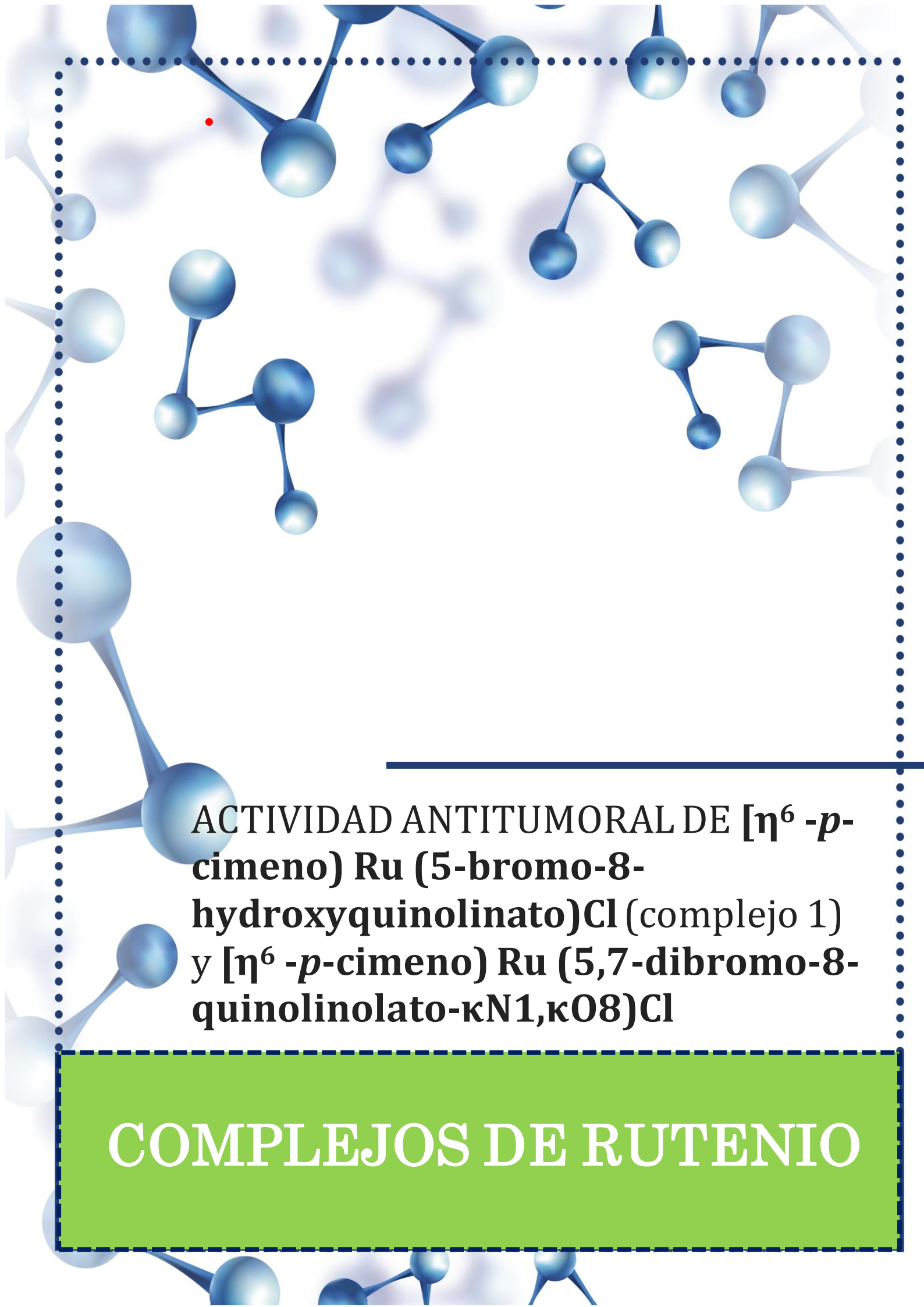
Martínez-Maqueda, D., Miralles, B., & Recio, I. (2015). HT29 cell line. In *The Impact of Food Bioactives on Health: In Vitro and Ex Vivo Models* (pp. 113–124). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-16104-4_11

- Mastropietro, G., Tiscornia, I., Perelmuter, K., Astrada, S., & Bollati-Fogolín, M. (2015). HT-29 and Caco-2 reporter cell lines for functional studies of nuclear factor kappa B activation. *Mediators of Inflammation*, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/860534>
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65(1–2), 55–63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)
- Pautke, C., Schieker, M., Tischer, T., Kolk, A., Neth, P., Mutschler, W., & Milz, S. (2004). Characterization of osteosarcoma cell lines MG-63, Saos-2 and U-2 OS in comparison to human osteoblasts. *Anticancer Research*, 24(6), 3743–3748.
- Phospholipid, J. L. (1973). Characterization of the A549 Cell Line as a Type II Pulmonary Epithelial Cell Model for Drug Metabolism. In *Assessment of Cell Line Models of Primary Human Cells by Raman Spectral Phenotyping*. *Biophys. J* (Vol. 51).
- Rousset, M. (1986). The human colon carcinoma cell lines HT-29 and Caco-2: Two in vitro models for the study of intestinal differentiation. *Biochimie*, 68(9), 1035–1040. [https://doi.org/10.1016/S0300-9084\(86\)80177-8](https://doi.org/10.1016/S0300-9084(86)80177-8)
- Sambuy, Y., De Angelis, I., Ranaldi, G., Scarino, M. L., Stamatii, A., & Zucco, F. (2005). The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: Influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics. *Cell Biology and Toxicology*, 21(1), 1–26. <https://doi.org/10.1007/s10565-005-0085-6>
- Tom, B. H., Rutzky, L. P., Jakstys, M. M., Oyasu, R., Kaye, C. I., & Kahan, B. D. (1976). Human colonic adenocarcinoma cells - I. Establishment and description of a new line. *In Vitro*, 12(3), 180–191. <https://doi.org/10.1007/BF02796440>
- Type, A., & Collection, C. (2011). MTT Assay. *Encyclopedia of Cancer*, 6597, 2384–2384. https://doi.org/10.1007/978-3-642-16483-5_3869
- Uzarski, J. S., Divito, M. D., Wertheim, J. A., & Miller, W. M. (2017). Essential Design

Considerations for the Resazurin Reduction Assay to Noninvasively Quantify Cell Expansion within Perfused Extracellular Matrix Scaffolds HHS Public Access. *Biomaterials*, 129, 163–175. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2017.02.015>

Wang, J., & Yi, J. (2008). Cancer cell killing via ROS: To increase or decrease, that is a question. *Cancer Biology and Therapy*, 7(12), 1875–1884. <https://doi.org/10.4161/cbt.7.12.7067>

Yang, H., Villani, R. M., Wang, H., Simpson, M. J., Roberts, M. S., Tang, M., & Liang, X. (2018). The role of cellular reactive oxygen species in cancer chemotherapy. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, 37(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s13046-018-0909-x>



ACTIVIDAD ANTITUMORAL DE $[\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})\text{Ru}(5\text{-bromo-8-hydroxyquinolinato})\text{Cl}$ (complejo 1) y $[\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})\text{Ru}(5,7\text{-dibromo-8-quinolinolato-}\kappa\text{N1,}\kappa\text{O8})\text{Cl}$

COMPLEJOS DE RUTENIO

3 Complejos de Rutenio

Resultados y discusión complejos de rutenio.

En este trabajo de tesis, se investigaron las propiedades antitumorales de 2 compuestos de Ru, (figura 3.1) $[\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})\text{Ru}(\text{5-bromo-8-hydroxyquinolinato})\text{Cl}$ (complejo 1) y $[\eta^6\text{-}p\text{-cimeno})\text{Ru}(\text{5,7-dibromo-8-quinolinolato-}\kappa\text{N1,}\kappa\text{O8})\text{Cl}$, (complejo 2). Se usaron como ligandos derivados de la 8-hidroxiquinolina. Uno de estos ligandos es sustituido en la posición 5 por un bromo, y el otro ligando derivado es sustituido en la posición 5 y 7 por el mismo halógeno. En la estructura de estos complejos, la quinolina actúa como un ligando quelante y coordina, a través de los átomos del nitrógeno y oxígeno al centro metálico de rutenio, formando un anillo de 5 miembros.

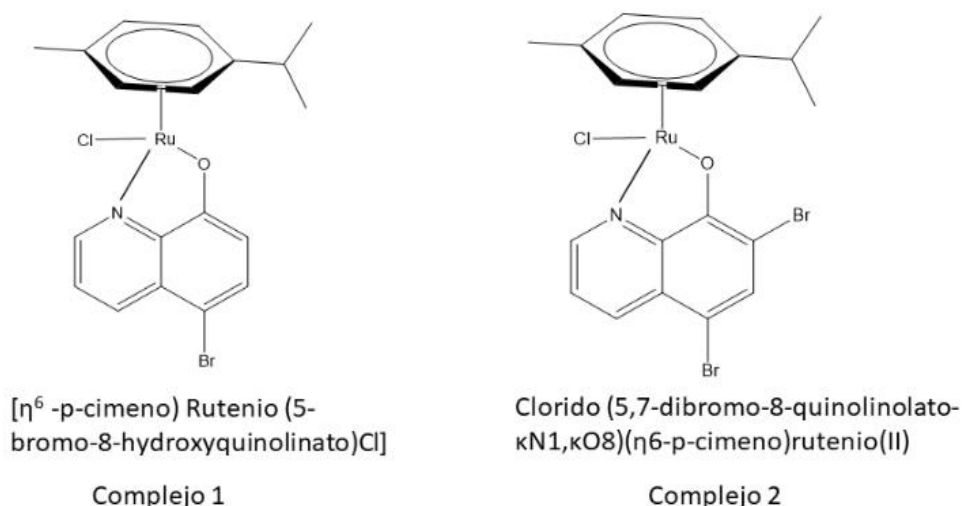


Figura 3.1. Estructura de los complejos de rutenio. Complejo 1, monosustituido en posición 5 por bromo, y complejo 2, bisustituido en posición 5 y 7, por el mismo halógeno.

Para estudiar sus propiedades antitumorales, se utilizaron 5 líneas celulares tumorales, MG-63 (osteosarcoma), MCF-7 (cáncer de mama hormono dependiente), MDA-MB-231 (cáncer de mama triple negativo), A549 (cáncer de pulmón) y HT29 (cáncer de colon), además se usó una línea celular de fenotipo no tumoral, L929 (fibroblastos de ratón). El estudio de estos compuestos abarcó la determinación de la citotoxicidad, la capacidad de inducir apoptosis, la interacción con el ADN, el efecto sobre el ciclo celular y la

capacidad genotóxica. Asimismo, se estudió sus efectos sobre dos características importantes del proceso tumoral, tales como la migración e invasión celular. Por otro lado, en modelos celulares más complejos, esferoides multicelulares, se evaluó las propiedades citotóxicas y anti-invasivas de estos compuestos.

3.1 Estabilidad de los complejos 1 y 2

La estabilidad del complejo que le dio origen a los compuestos estudiados, Ru-clioquinol, fue estudiada y reportada por el grupo del Prof. Dr. Iztok Turel. Este estudio se llevó a cabo en dos soluciones, una solución de DMSO y en solución acuosa de DMSO al 10%. Los resultados mostraron que no hubo modificaciones en el espectro de resonancia magnética nuclear (RMN), la integridad del compuesto se mantuvo intacta en el periodo de tiempo en el cual se llevaron a cabo los experimentos, 24 h. Además, la estabilidad del compuesto fue medida por espectroscopía UV-visible, en buffers fosfatos con valores de pH de 8, 8.5 y 9 y no se observaron modificaciones luego de 24 h (Gobec *et al.*, 2014).

Kubanik y colaboradores estudiaron la estabilidad del complejo 2 en DMSO. El cambio de haluro/agua-ligando en medio acuoso ocurre inmediatamente. Determinaron que la estabilidad de la especie acuosa no mostró cambios en el espectro en un periodo de más de 50 días a temperatura ambiente, en presencia de luz y en el rango de pH en el que fueron estudiados. A su vez demostraron la estabilidad de este compuesto en una solución saturada de DMSO (Kubanik *et al.*, 2015).

3.2 Efecto de los complejos 1 y 2 en las interacciones con Ct-ADN

La afinidad de los complejos 1 y 2 por Ct-ADN fue evaluada usando espectroscopía UV-vis. El objetivo de este ensayo fue buscar un posible blanco molecular, además proveer información sobre su posible mecanismo de acción, debido a que la unión de moléculas orgánicas o inorgánicas al ADN puede influenciar en numerosos procesos biológicos, en los cuales participa el ADN, como la transcripción y replicación. La finalidad de estos estudios es determinar los sitios de unión de la droga, y así poder dilucidar los cambios conformacionales debido a la interacción entre el ADN-droga. Estos cambios se ven reflejados en los cambios de absorción del ADN, en el espectro UV-visible.

En la figura 3.2.1, están representado las variaciones en la absorbancia del ADN, cuando la concentración de ADN varía y la de los complejos se mantiene constante. Se puede observar que ambos complejos aumentan la emisión observada a 268 nm (complejo 1) y 275 nm (complejo 2) sugiriendo un efecto hipercrómico. La constante de unión K_b fue determinada usando la ecuación de Wolfe-Shimer (Matesanz *et al.*, 2018). La constante, K_b , para el complejo 1 fue de $7.43 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ y para el complejo 2 fue de $9.61 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$. Por lo tanto, se podría decir que el orden de afinidad por el Ct-ADN es $K_b(1) < K_b(2)$, indicando que el complejo 2 tiene una unión más fuerte con el ADN que el complejo 1. Estos valores, tomados en los primeros 10 minutos de reacción, parecen indicar que ambos complejos, tienen gran afinidad por Ct-DNA y se unen al mismo de manera no covalente.

El espectro de absorción UV-Vis del ADN tiene un máximo a 260 nm. Este máximo es consecuencia de los grupos cromóforos en las moléculas de purinas y pirimidinas responsables de las transiciones electrónicas. Pequeños cambios en la absorción se deben a cambios en la fuerza iónica del medio. En el caso de atracción electrostática entre el compuesto y el ADN, se observa un efecto hipercrómico, reflejado en un aumento de la absorbancia en el espectro, como consecuencia de los cambios estructurales y conformacionales luego de la interacción ADN-droga. Cuando la droga se une al ADN, las fuerzas de interacción que mantienen la estructura de doble hélice son interrumpidas. La doble hélice se separa en 2 cadenas simples, y la interacción entre las bases es reducida, aumentando la absorbancia ya que muchas bases están en la forma libre y no forman puente de hidrógeno con las bases complementarias. Aún más, el efecto hipercrómico se produce principalmente por la presencia de cationes, los cuales se unen a los grupos fosfatos del ADN, produciendo un daño en la estructura secundaria del ADN. El efecto hipercrómico también se atribuye a un contacto externo o a un desenrollamiento parcial de la hélice de ADN, exponiendo más bases (Aleksić & Kapetanović, 2014) (Sirajuddin *et al.*, 2013).

Adicionalmente, la unión no covalente de las drogas al ADN es reversible, y considerando el metabolismo de las drogas y el posible efecto citotóxico, es un efecto deseado comparado a la unión covalente. La unión no covalente de las drogas con el

ADN puede cambiar la conformación del mismo, la tensión de torsión, interrumpir la unión proteína-ADN, y potencialmente iniciar la ruptura de las cadenas (Aleksić & Kapetanović, 2014). Las metalodrogas son una clase, muy importante, de agentes que interaccionan con el ADN. Un ejemplo son las metalodrogas con quinolinas, las cuales pueden unirse de tres maneras diferentes al ADN, unión al surco mayor y menor, unión electrostática al grupo fosfato e intercalación (Aleksić & Kapetanović, 2014).

La reactividad es diferente que la observada para el CisPt, la cual es covalente, donde preferencialmente se une al nucleótido de guanina, ya que tiene la mayor densidad de electrones. Genera uniones intra o inter cadena a través del cloro con los nitrógenos de las bases de los nucleótidos. Además, produce dos efectos, hipercrómico y batocrómico, este último como consecuencia de la intercalación del CisPt en la doble hebra (Aleksić & Kapetanović, 2014). Asimismo, los compuestos de rutenio se unen más fuertemente al ADN y son menos afectados por los mecanismos de reparación comparados con el CisPt (Gobec *et al.*, 2014).

Evidencias acumuladas a partir de la bibliografía, sugieren que el ADN es la principal molécula *target* de los complejos de rutenio, y por ende la función del ADN se ve afectada. Los compuestos de rutenio que contienen moléculas de areno son los candidatos más promisorios debido a sus uniones no covalentes con el ADN (Liu *et al.*, 2019) (Pal *et al.*, 2018). Muchos compuestos de este tipo han evidenciado ejercer su mecanismo de acción por medio de la intercalación con el ADN, como por ejemplo mer-[Ru(terpy)Cl₃]. Para mejorar la habilidad de intercalarse con el ADN de este tipo de complejos, otros compuestos fueron diseñados usando diferentes ligandos entre ellos derivados de quinolinas (Pal *et al.*, 2018).

Por otro lado, ha sido demostrado que los compuestos de rutenio en los cuales la molécula de areno, es un *p*-cimeno (como en el caso de los complejos estudiados en esta tesis), se unen preferencialmente a los residuos de guanina en la doble hélice del ADN, pero no se produce una intercalación. Al contrario, este ligando, distorsiona la conformación de la doble hélice, y es capaz de reaccionar de manera no covalente,

mediante interacciones hidrófobas, lo que produce en consecuencia, un aumento considerable en la citotoxicidad en las células tumorales. (Brabec & Nováková, 2006).

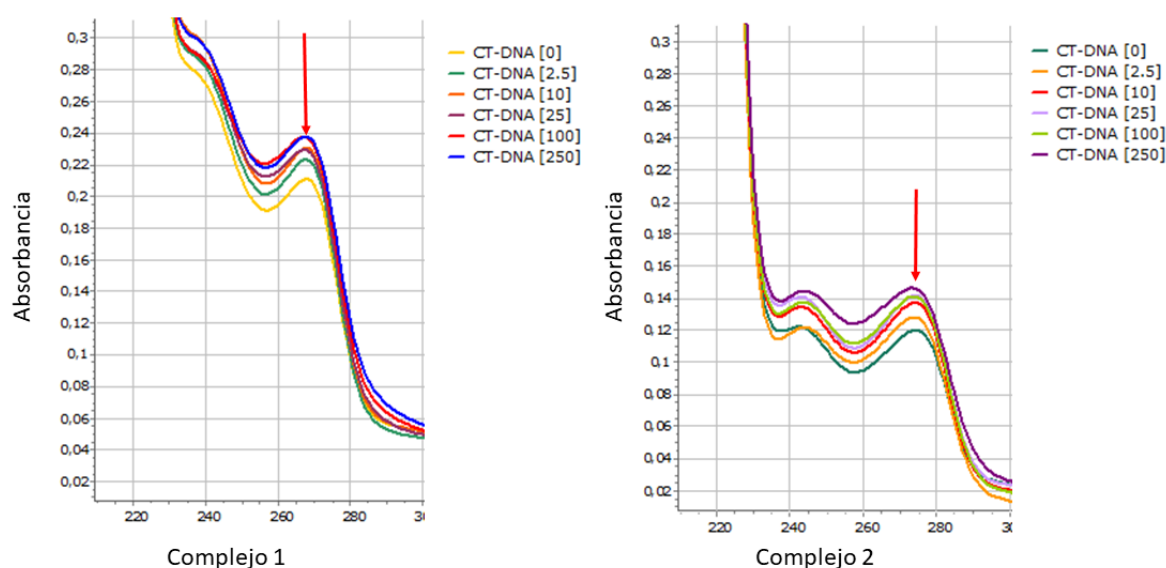


Figura 3.2.1. Espectro UV-Visible. La concentración de ADN es variable (0-250 μM), mientras la concentración de los complejos se mantiene constante (10 μM). En ambos casos hay un aumento de la absorbancia, a 268 nm para el complejo 1 y a 275 nm para el complejo 2, indicado por las flechas rojas en las gráficas.

El segundo ensayo que se llevó a cabo, para evaluar la interacción del ADN con los complejos, consiste en enfrentar el Ct-ADN con bromuro de etidio (BrEt) al complejo, y registrar cómo se modifica la fluorescencia. El BrEt es un intercalante típico del ADN. Al encontrarse intercalado entre las bases del ADN, su fluorescencia aumenta alrededor de 25 veces con respecto a la fluorescencia sin material genético. Previamente se describió que el aumento de su fluorescencia puede ser atenuada por la adición de una segunda molécula (Sirajuddin *et al.*, 2013). En presencia de un intercalador de ADN adicional que puede competir (y desplazar) al BrEt del ADN, la fluorescencia de BrEt-ADN disminuirá conforme el nuevo compuesto desplace al BrEt, como puede verse en la figura 3.2.2. A medida que aumenta la concentración del complejo, disminuye la fluorescencia. Para realizar las medidas de emisión, se excitó el BrEt a $\lambda_{\text{exc}} = 540 \text{ nm}$, donde ninguno de los complejos absorbe.

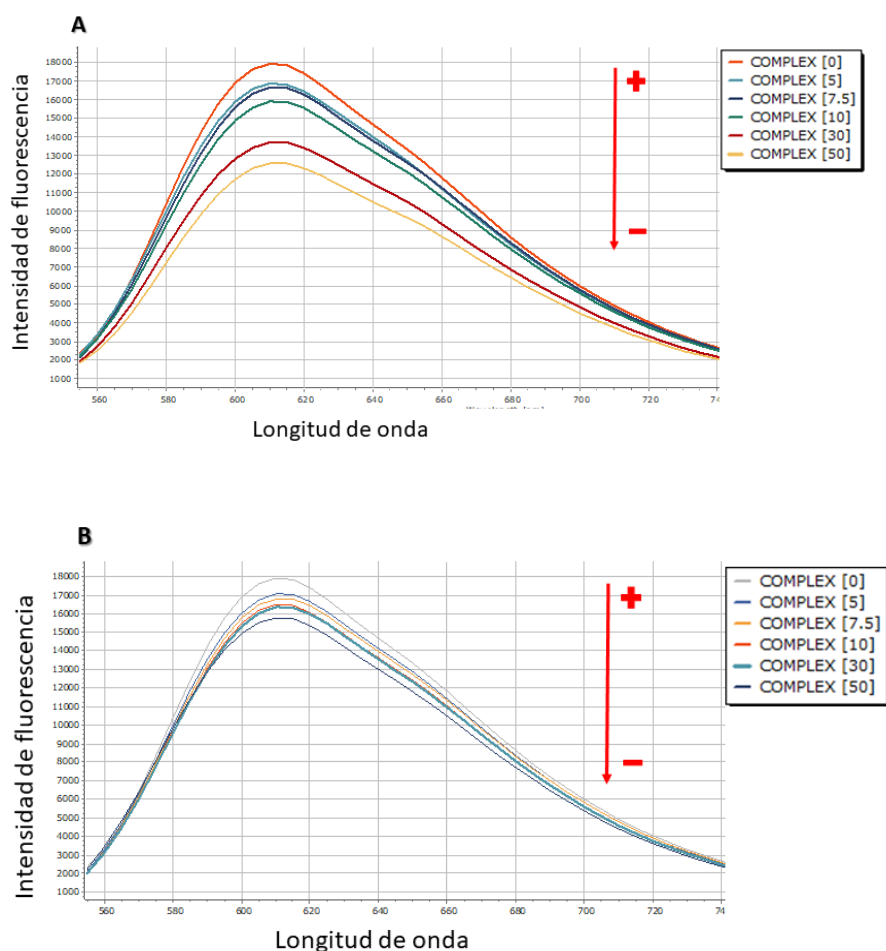


Figura 3.2.2. Desplazamiento del BrEt. A: complejo 1, B: complejo 2. En ambos casos se observa una disminución de la fluorescencia del BrEt, (flecha roja) causado por el desplazamiento del mismo a causa de la interacción del complejo con el ADN.

3.3 Estudio de la actividad anticancerígena de los complejos sobre monocapa celular

3.3.1 Efecto de los complejos 1 y 2 sobre la viabilidad y proliferación celular

Se evaluó la citotoxicidad de los compuestos de rutenio por el método de MTT, sobre un panel de células tumorales que incluyen a la MG-63, MCF-7, A549, MDA-MB-231 y HT-29, y además sobre una línea de fenotipo no tumoral, L929. Las células fueron tratadas por un periodo de 24 h, con un rango de concentraciones entre 2.5 y 100 μM . Debido a la baja solubilidad de los complejos en soluciones acuosas, ambos previamente fueron disueltos en DMSO y luego se realizaron las diluciones en medio de cultivo

DMEM, tal que el contenido de DMSO no supere el 0.05%. El CisPt fue usado como agente antitumoral de referencia.

| Líneas celulares | IC ₅₀ complejo 1 | IS | IC ₅₀ complejo 2 | IS | IC ₅₀ CisPt |
|------------------|-----------------------------|------|-----------------------------|------|--------------------------------------|
| MG-63 | 19.7±0.6 | 2.21 | 12.2±1.4 | 2.26 | 39±1.8 |
| A549 | 50.9±5.3 | 0.85 | 24.9±6.5 | 1.11 | 114±2.3 |
| MCF7 | 45.1±3.1 | 0.96 | 20.5±1.5 | 1.34 | 42 ±3.2 |
| MDA-MB-231 | 31.7±2.3 | 1.37 | 15.4± 0.3 | 1.79 | 131±18 |
| HT-29 | 29.6± 0.8 | 1.46 | 26.4± 1.7 | 1.04 | 181.1±6.1(Leon <i>et al.</i> , 2016) |
| L929 | 43.5±8.5 | | 27.6±3.7 | | |

Tabla 3.3.1.1: Resultados de IC₅₀ (μM) de los complejos de rutenio 1, 2 y del Cisplatino. IS (índice de selectividad), CisPt (cisplatino). Los resultados se expresan como la media ±SEM (n=3).

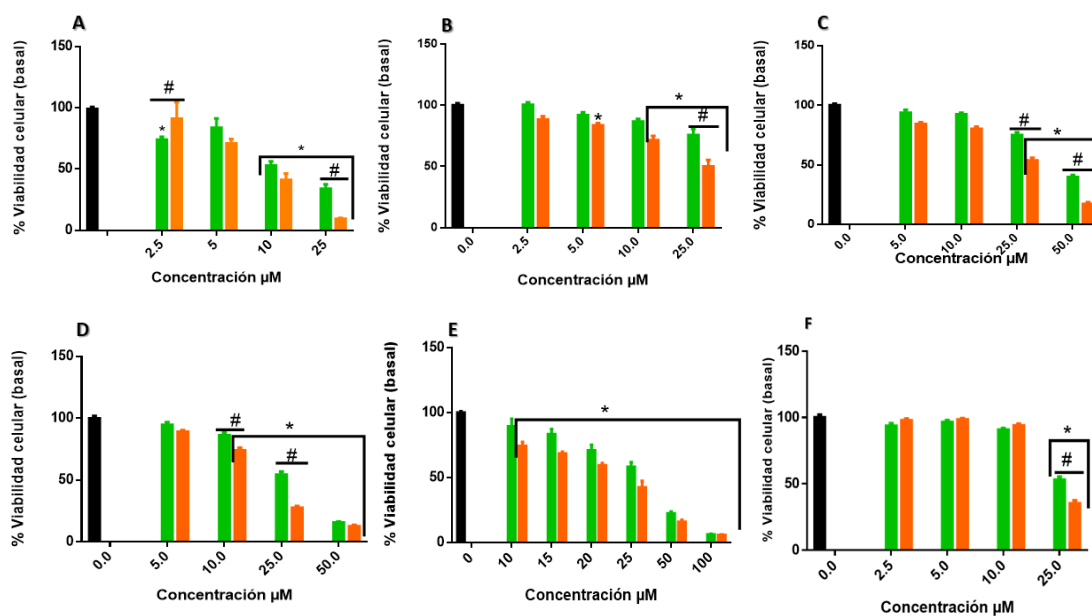


Figura 3.3.1.1: Gráficas de viabilidad celular vs concentración de los complejos. Método MTT. A: MG-63, B: A549, C: MCF7, D: MDA-MB-231, E: HT29, F: L929. Los resultados se expresan como la media ±SEM (n=3). *Diferencia significativa con el control (p<0.05). #Diferencia significativa entre complejo 1 y 2 (p<0.05).

A partir de los resultados de IC_{50} (tabla 3.3.1.1) y de las gráficas de barras de la figura 3.3.1.1, se observa que en todas las líneas celulares, el complejo 2 fue más activo que el complejo 1. Con respecto al complejo 1, el orden de citotoxicidad en las líneas celulares de menor a mayor es: A549<MCF7<MDA-MB-231<HT29<MG-63, y el orden, para el complejo 2 es similar, salvo con la línea HT-29 que mostró mayor resistencia al tratamiento.

Como ya se comentó, los complejos de rutenio fueron diseñados y sintetizados como una alternativa a los complejos de Pt, y en este caso, comparando los valores de IC_{50} , la citotoxicidad de los complejos 1 y 2 es mayor que la impartida por el CisPt (tabla 3.3.1.1).

Para determinar la especificidad de la actividad citotóxica en las líneas celulares tumorales fue necesario obtener información sobre su citotoxicidad en células de fenotipo no tumoral, por lo que estos compuestos fueron probados en la línea celular L929. Luego de calcular el índice de selectividad (IS) (tabla 3.3.1.1), los valores dan cuenta que el complejo 1 tiene una buena selectividad en por la línea MG-63, mientras que el complejo 2 mostró selectividad en las líneas MG-63 y MDA-MB-231.

El punto crucial para identificar sustancias, es el índice de selectividad con acciones biológicas aceptables y despreciable acción citotóxica. Varios análisis han demostrado que numerosos factores, como cambios en la membrana y características de las adhesiones celulares, pueden ser las razones de la citotoxicidad y de la selectividad de los compuestos de rutenio (Thota *et al.*, 2018).

Una de las razones de la citotoxicidad de los compuestos de rutenio, es debido a la presencia de la molécula de areno (*p*-cimeno), Pizarro y colaboradores, expusieron que la misma, actúa como un estabilizador del átomo de Ru y aumenta su lipofilidad, lo que aumenta el ingreso a las células, aumentando su efecto citotóxico (Pizarro *et al.*, 2010). Los complejos de rutenio con areno representan una plataforma versátil para el diseño de las metalodrogas, combina el ligando areno hidrofóbico y el centro metálico hidrofílico con las propiedades específicas de los coligandos adicionales. Para sumar, el

sustituyente areno es relativamente inerte frente al desplazamiento y es capaz de estabilizar el estado de oxidación +2 bajo condiciones fisiológicas (Lenis-Rojas *et al.*, 2018) . Por otro lado, la selectividad y baja toxicidad puede ser en parte explicada, por el hecho que los compuestos de rutenio se unen a las mismas proteínas séricas que el hierro, la transferrina, por lo tanto reducen su concentración como moléculas libres en el plasma. Por otro lado, dado que el número de receptores de transferrina en células tumorales es mayor que en las células normales (está sobreexpresado en el 90% de los tumores) los complejos de rutenio alcanzan mayores concentraciones en células tumorales (Guo *et al.*, 2015; J. Liu *et al.*, 2019; Ndagi *et al.*, 2017).

Además de la citotoxicidad generada por los complejos, se estudió el potencial proliferativo de las células después de recibir el tratamiento, mediante el ensayo clonogénico. Esta prueba estudia la capacidad de una célula única de proliferar y formar una colonia, lo cual es un sello distintivo para las células cancerosas. Este ensayo es clave para evaluar la eficacia de una droga como antitumoral y su potencial uso clínico. Como se observa en la figura 3.3.1.2, las células de MG-63 (A), A549 (B) y MCF-7 (C), fueron tratadas con ambos complejos, utilizando concentraciones de 2.5, 5 y 10 μM .

En la línea MG-63, cuando las células son tratadas con el complejo 1, la fracción de supervivientes, disminuye desde un 74% a 2.5 μM a un 0.64% en la máxima concentración, 10 μM . Con el complejo 2, luego del tratamiento con la menor concentración, se observó una supervivencia sólo del 39%, y a 10 μM , no hubo desarrollo de colonias en la placa. Este efecto queda evidenciado por las fotografías de la figura 3.3.2.1. En la línea A549, las células mostraron mayor resistencia al tratamiento con el complejo 1, ya que, a la mayor concentración evaluada, el porcentaje de la fracción de supervivientes fue del 43%, por el contrario con el complejo 2, a partir de la concentración 5 μM , no se observaron colonias (figura 3.3.2.1). En el caso de la línea MCF-7, a 2.5 μM , el porcentaje de fracción de supervivientes es similar para ambos compuestos. A 5 μM , solo se observa un 5% de porcentaje de células sobrevivientes, luego del tratamiento con el complejo 1, siendo nula la formación de colonias a 10 μM , en ambos casos. En conclusión, en las 3 líneas celulares, se observa que el complejo 2 tiene mayor capacidad de inhibir el crecimiento celular que el complejo 1, y la misma

aumenta en función de la concentración, con una diferencia significativa con respecto al control ($p < 0.05$) en todo el rango de concentración usado. Estos resultados son acordes a los que se observaron en el ensayo de viabilidad.

El ensayo clonogénico se considera una prueba precisa, ya que tiene en cuenta la muerte reproductiva celular. Este es un parámetro importante para ser utilizado, dado que se pueden determinar las concentraciones no citotóxicas para los ensayos *in vitro* (de Camargo *et al.*, 2019).

Hasta el momento se sintetizaron, muchos complejos de rutenio, solo unos cuantos mostraron selectividad, como por ejemplo el $[(\eta^6\text{-bz})\text{Ru}(\text{L4})\text{Cl}]\text{PF}_6$, el cual contiene un anillo fenilo. Esta modificación aumentó su citotoxicidad, consecuencia del aumento de su lipofilidad y su *uptake*, haciéndolo selectivos para las células tumorales, A549 y HeLa, con IC_{50} bajos, y por el contrario en las células normales (BEAS-2B y 16-HBE) sus IC_{50} fueron mayores a $100 \mu\text{M}$ (Tian *et al.*, 2017).

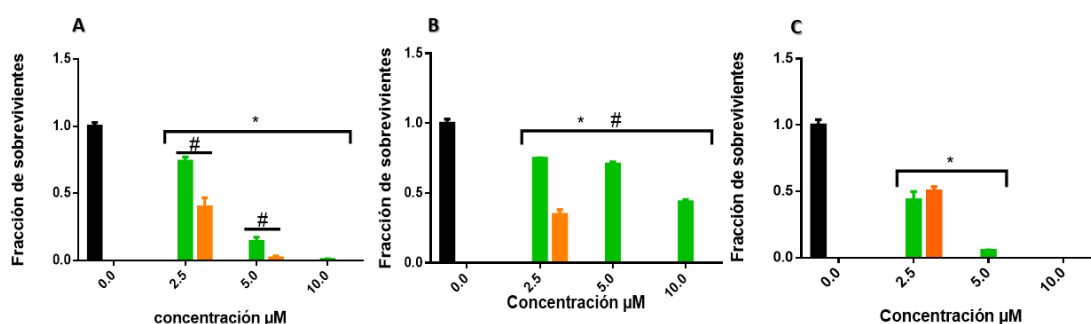


Figura 3.3.1.2. Ensayo Clonogénico. A: MG-63, B: A549, C: MCF-7. Los resultados se expresan como la media \pm SEM ($n=3$). * Diferencia significativa con el control ($p < 0.05$). # Diferencia significativa entre complejo 1 y complejo 2. ($p < 0.05$)

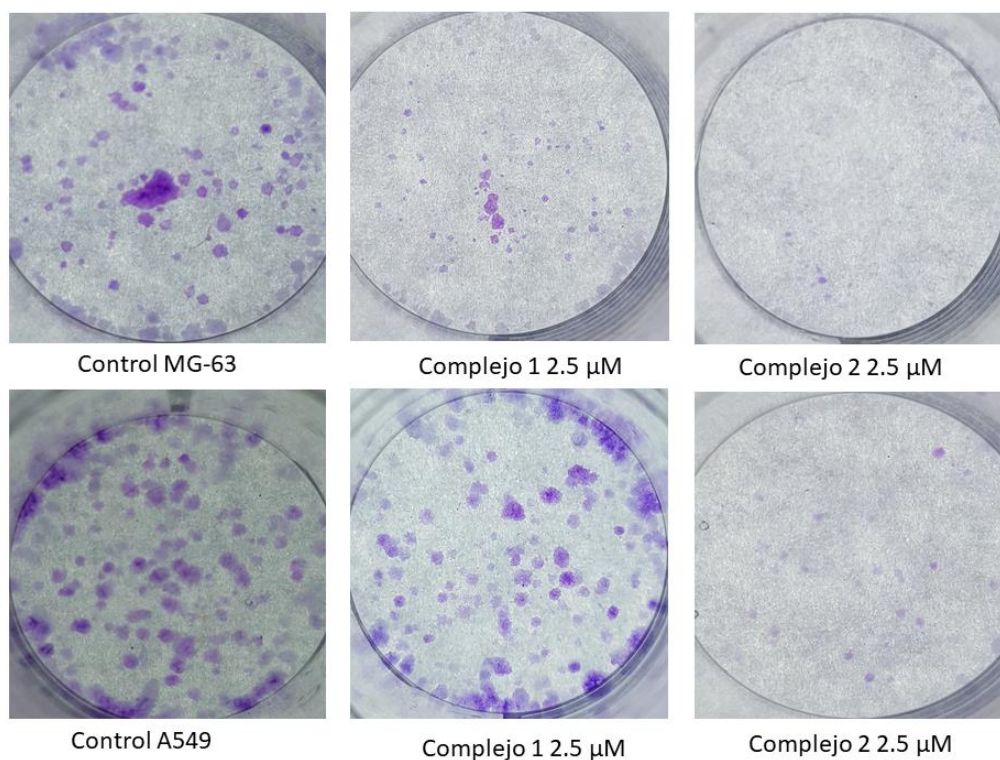


Figura 3.3.2.1: Fotografías de las placas del ensayo clonogénico de las líneas celulares MG-63 (panel superior) y A549 (panel inferior). En ambas líneas se puede observar la disminución de la formación de colonias luego del tratamiento.

3.3.2 Efectos de los complejos sobre la migración e invasión celular

Por otro lado se evaluó, el efecto de los complejos 1 y 2, sobre dos características claves en el proceso de carcinogénesis, la migración y la invasión de las células tumorales. La migración se evaluó mediante el ensayo de la herida. Las líneas celulares usadas fueron MG-63, A549 y MCF-7. Los resultados se resumen en la figura 3.3.2.1, así como también se pueden observar en las fotos de la figura 3.3.2.2.

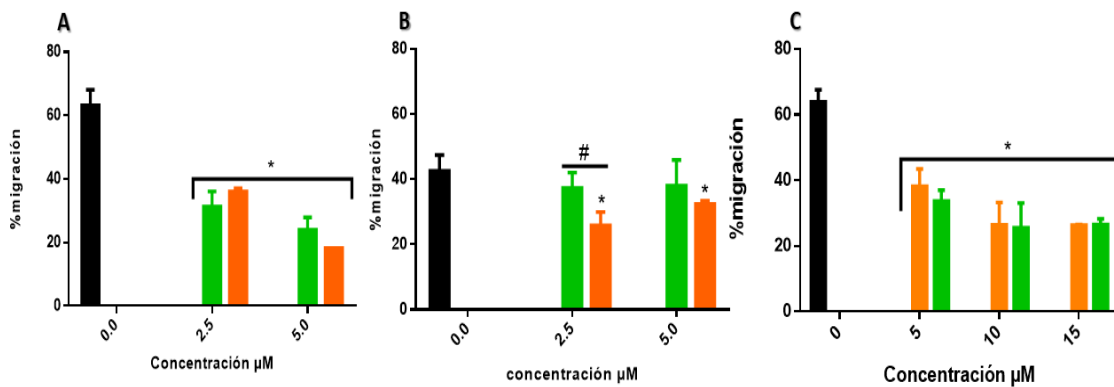


Figura 3.3.2.1. Ensayo de la herida. Gráficas de barras que representan el porcentaje de migración de las células tumorales en función de la concentración de los complejos. A: MG-63, B: A549, C: MCF7. Los resultados se expresan como la media \pm SEM ($n=3$). *Diferencias significativas con el control ($p<0.05$). #Diferencias significativas entre complejo 1 y 2 ($p<0.05$).

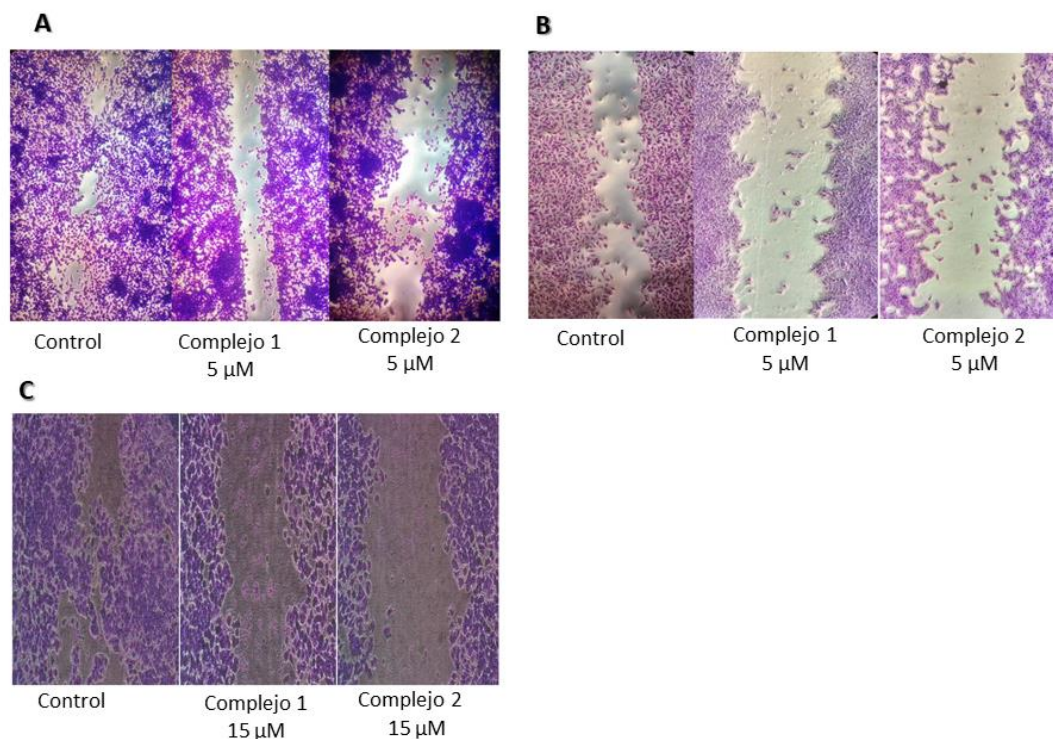


Figura 3.3.2.2. Fotos de la herida, luego del tratamiento por 24 hrs. Las células fueron teñidas con Giemsa al 10%, y luego observadas al microscopio óptico, con un objetivo de 40x. A: MG-63, B: A549, C: MCF7.

Los datos arrojados por la figura 3.3.2.1 y 3.3.2.2, demostraron que ambos complejos disminuyen la migración celular. Específicamente en la línea de osteosarcoma humano, se puede observar que a la mínima concentración usada (2.5 μM), la migración disminuye a casi un 50% con respecto a la herida control ($p<0.05$). Por el contrario, este mismo efecto, en la línea tumoral de mama se alcanza a una concentración 4 veces

mayor (10 μM). En la línea tumoral A549 solo el compuesto 2 inhibe la migración celular a 2.5 y a 5 μM .

Con respecto al proceso de invasión, el mismo se estudió por la capacidad de inhibir la formación de invadopodias, en una matriz de colágeno I. Las células, se cultivaron en simultáneo con los compuestos, durante un periodo de 24 h, con un rango de concentraciones entre 2.5 a 25 μM . Luego del tratamiento se evaluó, mediante microscopía óptica, si las células que fueron capaces de formar prolongaciones citoplasmáticas para embeberse en la matriz de colágeno. Los resultados están representados en la figura 3.3.2.3.

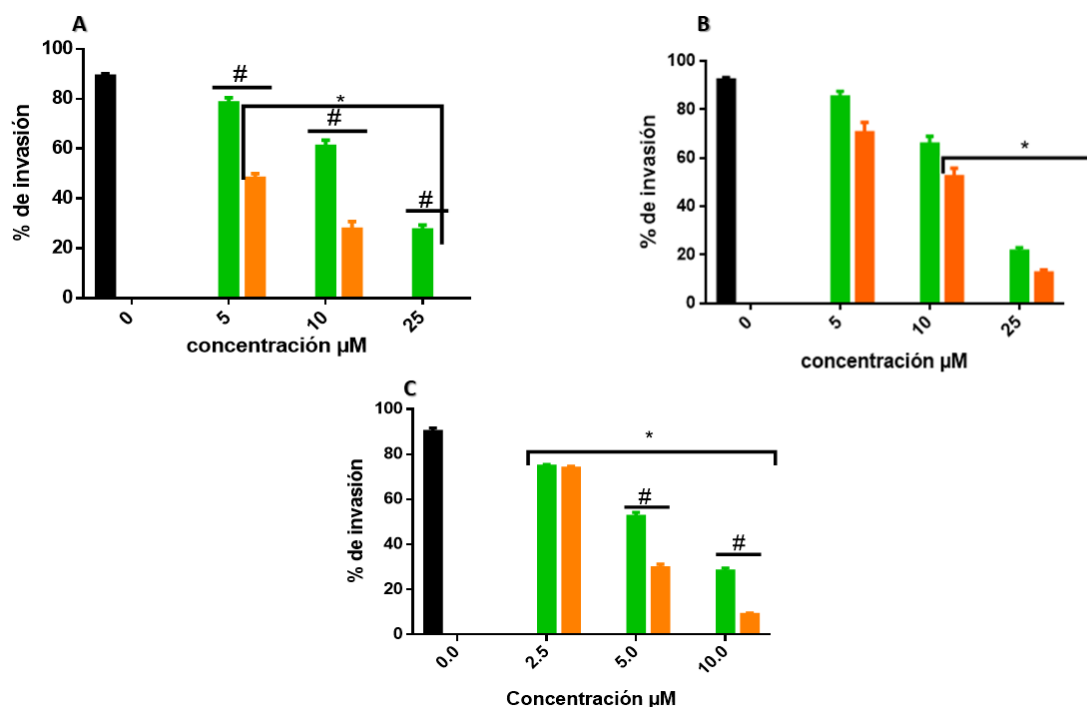


Figura 3.3.2.3. Formación de invadopodias. Gráficas de barras que representan el porcentaje de invasión de las células tumorales en función de la concentración de los complejos. A: MG-63, B: A549, C: MCF-7. Los resultados se expresan como la media \pm SEM (n=3)*Diferencias significativas con el control ($p < 0.05$). #Diferencias significativas entre los complejos 1 y 2 ($p < 0.05$).

En la línea tumoral de hueso, MG-63 (figura 3.3.2.3 A), se observa que el complejo 2, con la mínima concentración evaluada, inhibió alrededor de un 50% la formación de invadopodias con respecto al control ($p < 0.05$). La línea que menos se vio afectada por ambos compuestos, fue la línea celular de pulmón (figura 3.3.2.3 B). Por el contrario, en la línea tumoral MCF-7 (figura 3.3.2.3 C), el complejo 2 mostró gran efectividad en la

inhibición del proceso de invasión, ya que a 5 μM , disminuyó la formación de invadopodias en aproximadamente un 70% con respecto al control ($p < 0.05$). A partir de estos resultados, se puede obtener un orden de inhibición más específico en las células, $\text{MCF-7} > \text{MG-63} > \text{A549}$.

Las propiedades antimetastásicas de un compuesto son atribuidas, en base a ensayos *in vitro*, usando modelos y condiciones experimentales que imiten este proceso, como la migración y la invasión. Estos experimentos analizan, por ejemplo, la inhibición de una enzima que contribuye a la diseminación tumoral, la modificación de los filamentos de actina, entre otros. Estudios previos demostraron la acción de un complejo de rutenio con una molécula de areno, $[(\eta^6\text{-C}_6\text{H}_6)\text{Ru}(\text{H}_2\text{iip})\text{Cl}]\text{Cl}$, este complejo afecta la formación de invadopodias, la migración y la invasión de la línea celular MDA-MB-231 (Bergamo & Sava, 2015).

Otra droga de rutenio reportada, NAMI-A, único compuesto que llegó a ensayos clínicos, tiene la capacidad de inhibir el crecimiento metastásico originado de tumores sólidos. Este complejo previene el desarrollo y crecimiento de metástasis en todos los modelos tumorales en los que fue probado como en cáncer de pulmón, carcinoma mamario y melanoma. Dicho comportamiento es observado en ausencia de inhibición del crecimiento del tumor primario, lo cual confiere especial selectividad del complejo por las células metastásicas. NAMI-A inhibe los principales procesos de diseminación celular, desprendimiento de las células desde el tumor primario, secreción de enzimas proteolíticas, migración e invasión, y la adhesión de las células en el sitio de crecimiento secundario (Bergamo & Sava, 2015) (Liu *et al.*, 2019).

En general, la recaída metastásica, casi siempre está asociada a un mal pronóstico, ya que a la misma se le ha atribuido resistencia farmacológica y a la colonización de sitios metastásicos adicionales, comprometiendo la función de órganos vitales. Por lo que la erradicación de las metástasis tumorales, es el desafío actual para científicos y oncólogos. Las nuevas terapias antitumorales se basan en conocer el comportamiento molecular y celular del tumor, y particularmente, de su progresión metastásica (Bergamo & Sava, 2015).

A partir de los resultados obtenidos hasta el momento, se puede decir que el complejo 2 tiene gran capacidad citotóxica. Además de inhibir dos sellos distintivos del proceso de tumorigénesis, como lo es la migración y la invasión celular. A diferencia del compuesto ya probado, NAMI-A, este compuesto es capaz de inhibir las células del tumor primario. Se puede concluir también, que las células de osteosarcoma y de mama, parecen ser más susceptibles, que las células de cáncer pulmonar.

3.3.3 Efectos genotóxicos de los complejos de Rutenio 1 y 2

Los efectos genotóxicos fueron estudiados, en las tres líneas celulares (MG-63, A549 y MCF-7), mediante la evaluación del aumento en la frecuencia de micronúcleos.

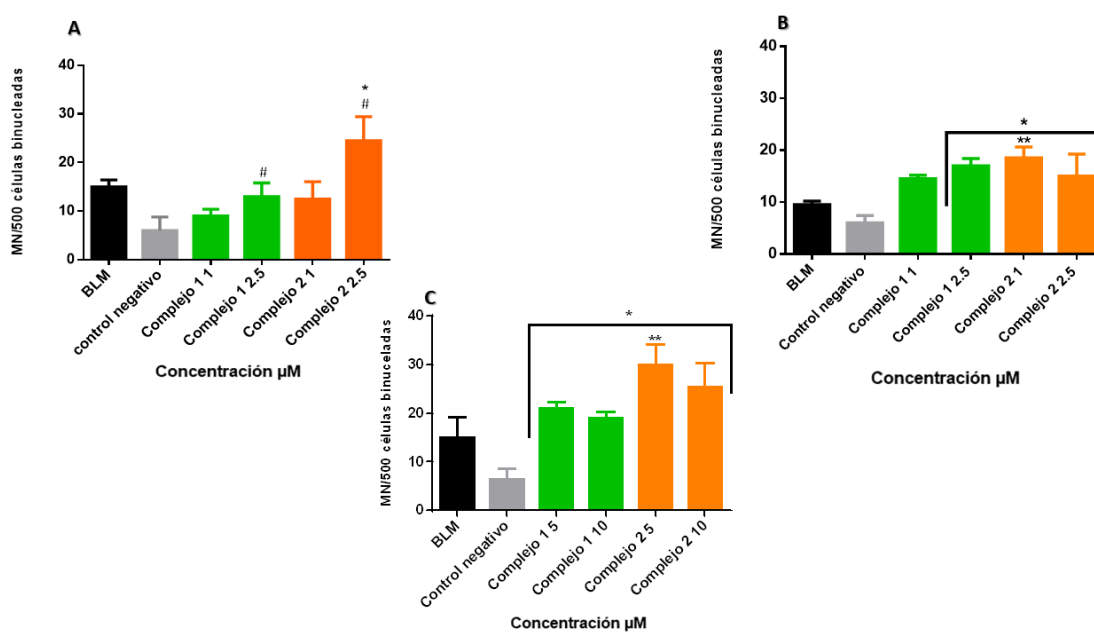


Figura 3.3.3.1. Ensayo de micronúcleo. Gráfica de barras que representan la frecuencia de aparición de MN con respecto a la concentración de los complejos. A: MG-63, B: A549, C: MCF-7. Las células fueron tratadas por 24hrs. Los resultados se expresan como la media \pm SEM (n=3). BLM: bleomicina, fue usada como control positivo. *Diferencias significativas con el control $p < 0.05$. **Diferencia significativas con el control positivo bleomicina (BLM) $p < 0.05$. # Diferencias significativas entre el complejo 1 y complejo 2 $p < 0.05$.

Las células fueron tratadas con los complejos por un periodo de 24 h. Las concentraciones elegidas para el tratamiento corresponden al 80% o más de viabilidad

celular con el fin de evitar el enmascaramiento de los efectos genotóxicos por los citotóxicos.

A partir de la figura 3.3.3.1(A) podemos destacar que, en la línea celular de osteosarcoma, el complejo 1 indujo la formación de MN a 2.5 μM , no obstante, la diferencia con el control negativo no es significativa estadísticamente. El complejo 2, también generó un efecto genotóxico, desde 1 μM , en la que se observa una respuesta dosis-dependiente ($p < 0.05$), alcanzando a 2.5 μM mayor proporción de MN que el inducido por BLM, y además presenta diferencia significativa con respecto al control ($p < 0.05$).

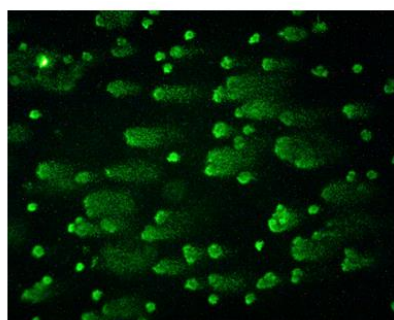
En la línea A549 (figura 3.3.3.1 B), ambos complejos generaron la formación de MN en el rango de concentraciones testeadas, 1 y 2.5 μM . Pero a diferencia del complejo 1, los efectos genotóxicos provocados por el complejo 2 se hicieron evidentes con la mínima concentración probada.

Por último, en la línea celular MCF-7, la aparición de micronúcleos se observa a partir de los 5 μM , pero no se observa una respuesta dosis dependiente ($p < 0.05$). En este caso el complejo 2 indujo mayor proporción de MN con 5 y 10 μM , a la generada por el tratamiento con BLM, y la frecuencia de aparición de los MN es significativamente diferente con respecto al control ($p < 0.05$). Estos datos están representados en la figura 3.3.3.1 C.

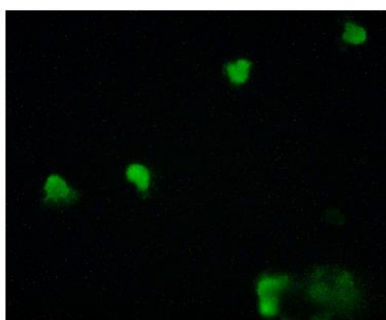
A nivel molecular, las lesiones en el ADN producen rupturas de doble cadena, estrés en el proceso de replicación o erosión de los telómeros, lo que resulta en puentes de cromatina o en fragmentos acéntricos en la etapa de anafase, los cuales van a formar los micronúcleos al final de la mitosis. Por otro lado, diferentes eventos de alteración de en la segregación, pueden explicar el origen de un cromosoma formando un micronúcleo, incluyendo interacción con el cinetocoro, daño en el cinetocoro, alteración del huso mitótico o inhibición de la citoquinesis. (Russo & Degrassi, 2018).

Por otro lado, se llevó a cabo el ensayo cometa con la línea MG-63. El mismo es un método simple y rápido para evaluar daño en el ADN generado por agentes que tienen

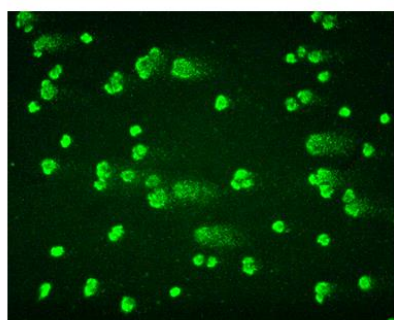
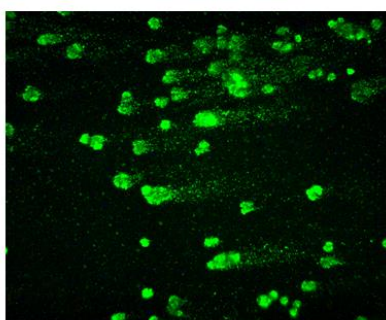
como blanco el ADN en células únicas, y el largo de la cola del cometa representan el nivel de daño en el material genético. Las células fueron tratadas por 24 h con tres concentraciones, 1, 2.5 y 5 μM , y como control positivo se usó bleomicina. Se puede observar en las fotos de la figura 3.3.3.2, que en el control, las células no tienen apariencia de cometa, pero a medida que aumenta la concentración, aumenta la cantidad de células con daño en su ADN, lo que está reflejado gráficamente en un incremento del *tail moment*. A 5 μM , se puede observar que hay mayor cantidad de cometas con el complejo 1, pero esto se debe a una disminución de la cantidad de células al ser tratadas con la misma concentración del complejo 2, dada su mayor citotoxicidad.



Control positivo. (BLM)



Control negativo.

Complejo 1 1 μM .Complejo 2 1 μM .

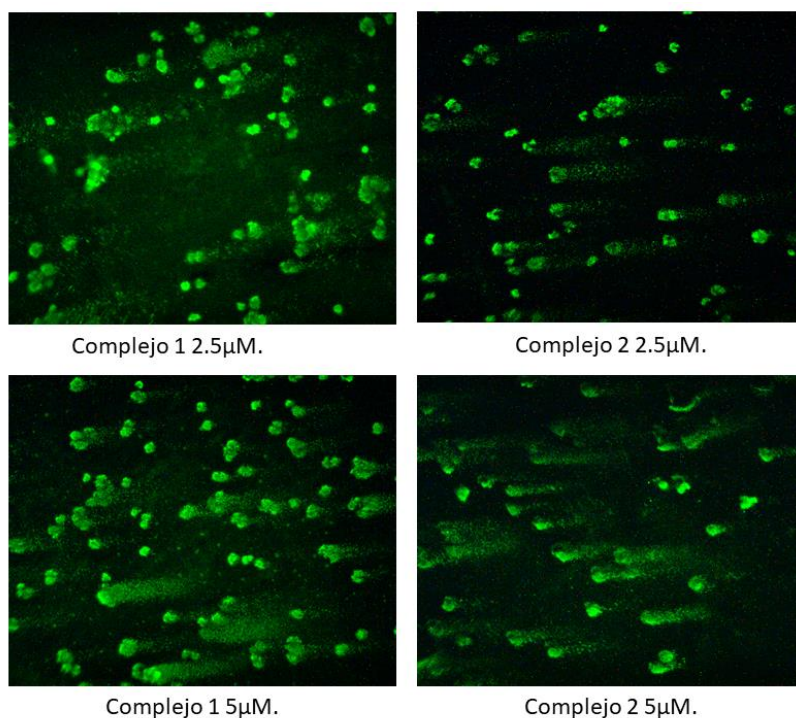


Figura 3.3.3.2. Fotos del ensayo cometa en la línea celular MG-63, tratada con diferentes concentraciones de los complejos por 24 hrs. Las células están teñidas con syber-green y observadas bajo microscopio de fluorescencia con un objetivo 40x.

Todos estos resultados, demuestran que ambos complejos son genotóxicos en las 3 líneas celulares tumorales a bajas concentraciones. Lo cual concuerda con el resultado anterior, en el que se demuestra que el ADN podría ser uno de los blancos moleculares relacionado con la actividad antitumoral de estos compuestos. Muchos grupos de investigación, han reportado que el mecanismo de acción de muchos complejos de rutenio, es vía interacción con el ADN, induciendo clivajes, ruptura e intercalación entre las cadenas de ADN (Thota *et al.*, 2018). La mayoría de agentes antitumorales son diseñados para actuar en la proliferación celular mediante la inhibición de la síntesis de ADN, por dos mecanismos: 1) la droga interactúa directamente con la molécula de ADN y frena su replicación, y 2) interfiere directamente con moléculas requeridas para la polimerización del ADN y el inicio de su replicación (De Camargo *et al.*, 2016). En este caso, a partir del experimento con el Ct-DNA y la inducción de efectos genotóxicos, el mecanismo de acción de los compuestos de rutenio sintetizados, sería por la interacción de las moléculas del complejo con el ADN.

3.3.4 Alteración del ciclo celular e Inducción de apoptosis

Luego de tratar las células MG-63, A549 y MCF-7 con los complejos de rutenio por 24 hrs, las células fueron teñidas con IP, y se analizó la progresión del ciclo celular mediante citometría de flujo.

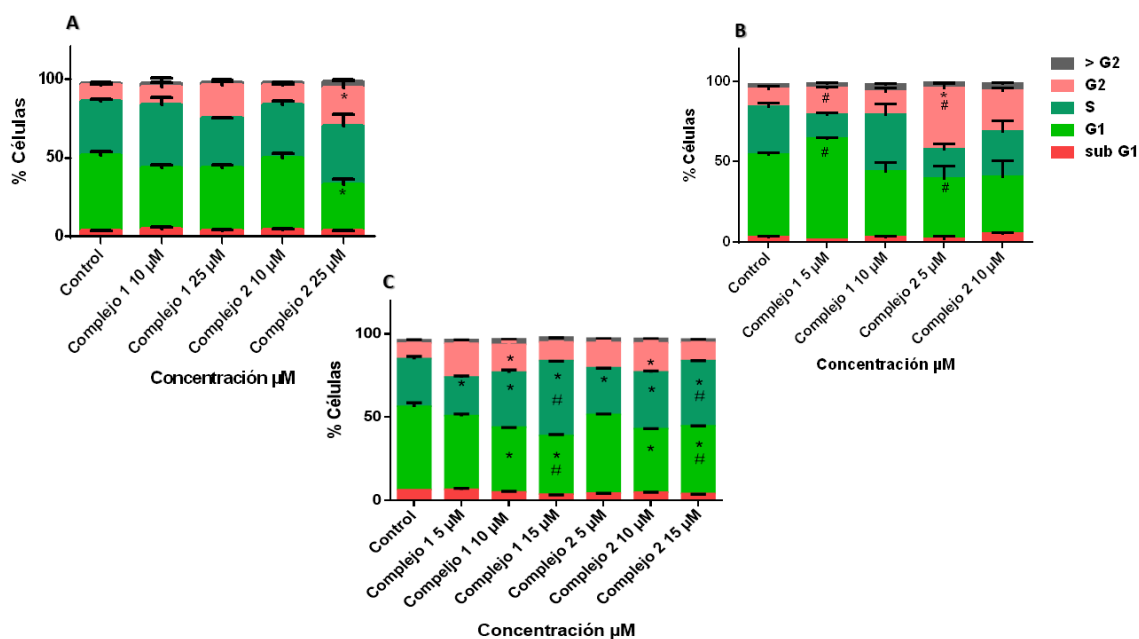


Figura 3.3.4.1. Análisis del ciclo celular. Gráficos de barras, representan en análisis del ciclo celular luego del tratamiento, en las 3 líneas de celulares, A: MG-63, B: A549 y C: MCF7.

En la figura 3.3.4.1 se pueden ver los resultados expresados mediante gráficos de barra. En la [figura 1](#), del anexo, se pueden observar los histogramas de frecuencia obtenidos en el citometro de flujo. La línea celular A549 (figura 3.3.4.1 B) fue tratada con 5 y 10 μM de ambos complejos. Con el complejo 1 se puede observar que hay un arresto en la fase G₁ a bajas concentraciones, con un aumento de la población del 13.15% con respecto al control, a expensas de la población en fase S (disminuye un 16% aproximadamente con respecto al control). Al aumentar la concentración, aumenta la población de células en la fase S un 6% con respecto al control, y un 21% con respecto a la concentración anterior, a expensas de la disminución de la población celular en fase G₁. Esta población disminuye un 10% con respecto al control y un 23% aproximadamente con respecto a la menor concentración. Mientras que el complejo 2 produce un arresto

en la fase G₂, efecto que se observó con ambas concentraciones testeadas. A 5 μM, la población G₂ sufre un aumento estadísticamente significativo, un 27% con respecto al control ($p < 0.05$), provocando una disminución en la proporción de células en fase G₁ y S, a 10 μM, el aumento es menor, de un 14.5%, a expensas de la fase G₁ solamente.

Las células derivadas de cáncer de hueso (figura 3.3.4.1 A), fueron tratadas con 10 y 25 μM. Con el complejo 1, a 10 μM, se observa un aumento en la población de células en fase S, de un 6% aproximadamente, con una disminución de células en fase G₁. A 25 μM, hay un arresto en la fase G₂, la frecuencia celular aumenta un 11% aproximadamente con respecto al control, a expensas de la fase G₁.

Con el complejo 2, a 10 μM, hay un aumento leve en la proporción de células en fase G₂, mientras que a 25 μM, se produce un aumento estadísticamente significativo con respecto al control ($p < 0.05$), del 14.5% aproximadamente, a expensas de la fase G₁, que disminuye alrededor del 19% con respecto al control ($p < 0.05$).

En la línea celular MCF-7 (figura 3.3.4.1 C), con el complejo 1, se observa que a 5 μM hay un aumento significativo (11%) en la población de células en fase G₂ ($p < 0.05$), a expensas de la fase G₁ y S. A 10 μM aumenta la población en fase S y G₂, un 5 y un 7% aproximadamente, a expensas de la fase G₁. A la máxima concentración estudiada, hay un aumento significativo estadísticamente en la fase S, del 16.3%, a expensas de la fase G₁, mientras la población celular en G₂, se mantiene constante.

Con el complejo 2, el efecto es similar en las concentraciones estudiadas. A 5 μM, hay un aumento de la frecuencia celular en G₂ del 6%, a expensas de la fase G₁. A medida que aumenta la concentración, la población en la fase S y G₂ aumenta, un 5 y un 8% respectivamente, a expensas de la fase G₁ ($p < 0.05$), a 10 μM. A 15 μM, se produce un aumento significativo en la fase S, del 11%, con respecto al control ($p < 0.05$), a expensas de la fase G₁.

Las células fueron arrestadas considerablemente en las fases S y G₂/M en general, mientras la población de células en la fase G₁ fue significativamente reducida. Este fenómeno fue notorio en la línea MG-63 luego de ser tratada con el complejo 2.

Uno de los eventos estudiados en este trabajo de investigación, fue la capacidad de los complejos de inducir la muerte celular programada. Para ello se trataron las células (MG-63, A549 y MCF7), por un periodo de 24 h, con un rango de concentraciones de entre 2.5 y 15 μM . Este proceso se estudió usando citometría de flujo, mediante el uso de la doble tinción con Anexina V-FITC e yoduro de propidio (IP) como marcadores. Los resultados están representados en la figura 3.3.4.2 gráficas de barras. En el anexo además se pueden observar las tablas con los porcentajes celulares en cada población, así como los dot plots ([figuras 2](#) del anexo).

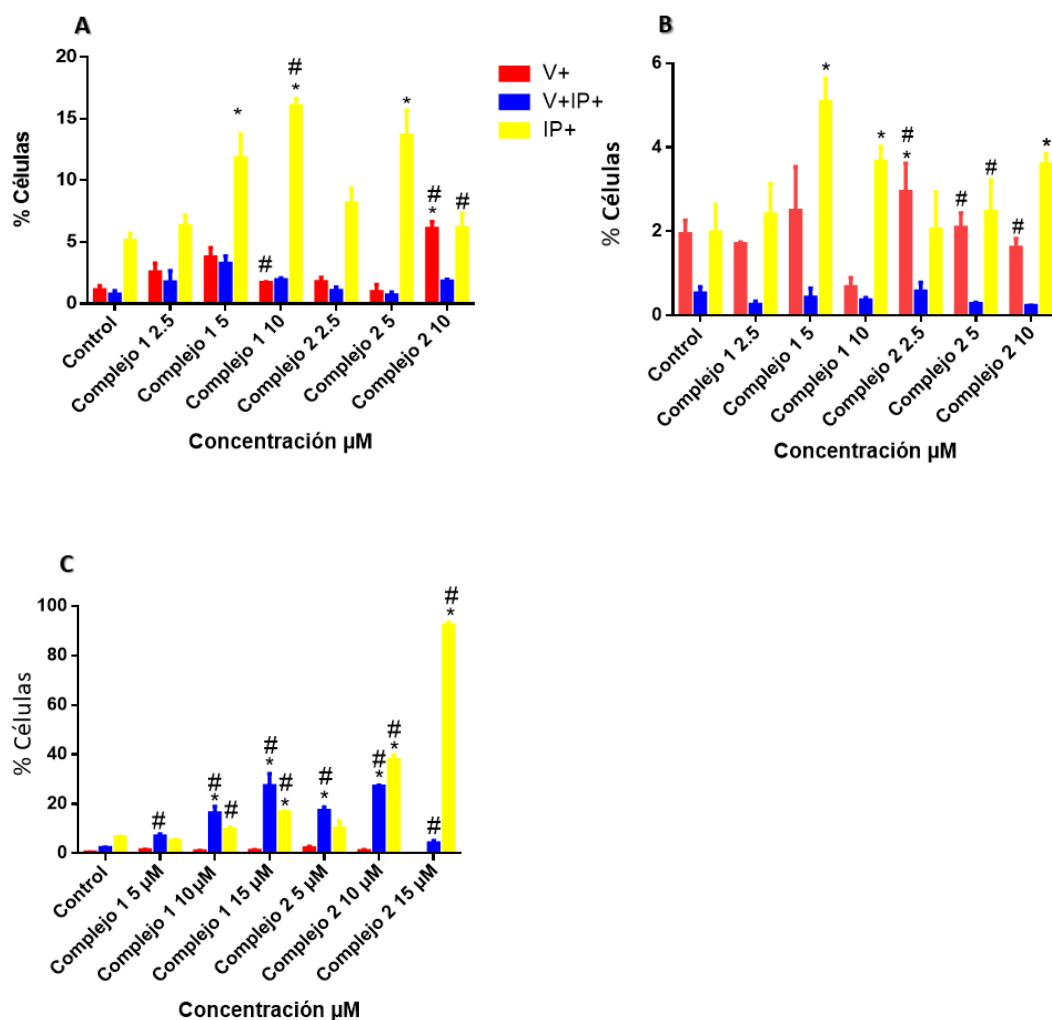


Figura 3.3.4.2. Evaluación de apoptosis. Tablas y gráficas de barras, representando las distintas poblaciones celulares debido al tratamiento de las células. Se evaluó en las tres líneas celulares, A: MG-63, B: A549, C: MCF7. Los resultados se expresan como el promedio \pm SEM ($n=3$). *Diferencias significativas con el control $p<0.05$. # Diferencias significativas entre el complejo 1 y complejo 2 $p<0.05$.

Como puede observarse, en la línea de osteosarcoma (figura 3.3.4.2 A), el tratamiento con el complejo 1 a 2.5 y a 5 μM provocó un aumento en las poblaciones de apoptosis temprana (anexina V +) y tardía (anexina V+/ IP+) con respecto al control, a 10 μM se observa que hubo un aumento abrupto en la población de células necróticas. Con el complejo 2 este aumento se observa a 5 μM , en donde la población necrótica (anexina V-/ IP +) corresponde a un 13.5% aproximadamente.

En la figura 3.3.4.2 B, se puede observar que en la línea A549 con el complejo 1 no hay incremento de la población de células en apoptosis, en el rango de concentraciones estudiadas, pero a 5 y a 10 μM , se observa un incremento de la población celular en necrosis. Por el contrario con el complejo 2, se observa un incremento de la población celular en apoptosis temprana, y a medida que aumenta la concentración de complejo, aumenta la población de células IP (+) y disminuye la población de células Anexina V (+).

En la línea de cáncer de mama, MCF7, (figura 3.3.4.2 C) el efecto con el complejo 2 fue mayor que con el complejo 1. Con ambos complejos se observa un aumento en las células apoptóticas tardías (anexina V+/ IP+), pero al ser tratadas con la mayor concentración (15 μM) del complejo 2 se observa un 90% aproximadamente de células IP+.

Los complejos 1 y 2 produjeron muerte celular programada en la línea celular de osteosarcoma y en la de cáncer de mama. El efecto sobre la línea derivada de pulmón, fue menor luego del tratamiento por 24 h.

Por otro lado, se midió el potencial de membrana mitocondrial (PMM) en la línea MG-63, luego del tratamiento con los complejos por 24 h. En la figura 3.3.4.3, se puede observar que hay una disminución del PMM, como consecuencia de la despolarización de la membrana mitocondrial, dependiente de la concentración ($p < 0.05$). Cuando las células son tratadas con 2.5 μM del complejo 1 y 2, se produce una disminución del PMM un 21 y un 10% aproximadamente. Al aumentar esta concentración, el PMM

disminuye un 43.45 y un 36.32%, respectivamente. Sin embargo, no existe diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos.

Esta disminución indica una alteración de la membrana de dicha organela. La despolarización de la membrana mitocondrial es una de las causas, del disparo del proceso de apoptosis (Eduardo, 2012).

El estrés oncogénico, como una proliferación incontrolada o daño en el ADN, disparan el mecanismo de apoptosis, que en consecuencia previene el cáncer. La muerte celular juega un rol clave en el tratamiento del cáncer, muchos de ellos inducen la muerte celular a través de varios mecanismos. Cabe mencionar las células cancerígenas son más sensibles a la muerte celular que los tejidos normales. Muchos estímulos inducen apoptosis por la vía de la mitocondria, que es causada por la permeabilización de la membrana mitocondrial. Esta alteración, permite la salida del citocromo C, y la consecuente activación de las caspasas. Además del citocromo C, se liberan otras proteínas que promueven la activación de las caspasas como SMAC/Diablo (Lopez & Tait, 2015).

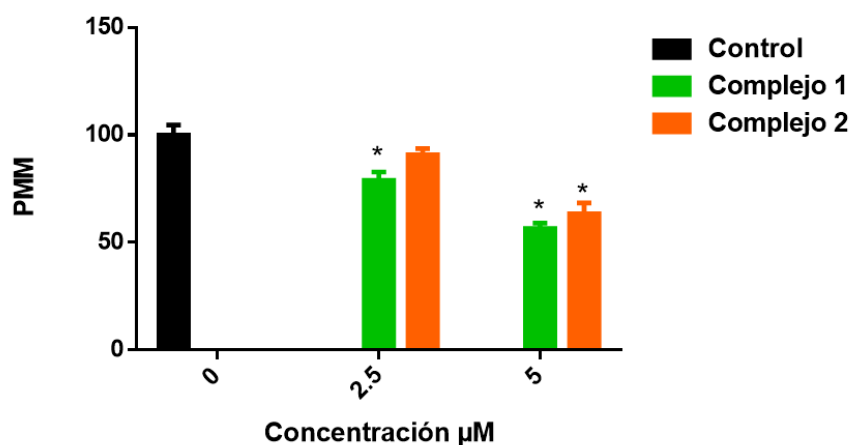


Figura 3.3.4.3. Gráfica de barras que representan la disipación del potencial de membrana mitocondrial, en función de la concentración, en la línea MG-63, luego de 24 hrs de tratamiento. * Diferencia significativa con el control. $p < 0.05$. Los resultados se expresan como el promedio \pm SEM ($n=3$).

Muchos compuestos antitumorales ejercen su efecto inhibitorio por arresto del ciclo celular o por inducción de apoptosis o por un efecto combinado de ambos procesos,

estrategias importantes para eliminar células cancerígenas. Además, la regulación del ciclo celular y la apoptosis se consideran enfoques efectivos en el desarrollo de terapias contra el cáncer. La alteración del ciclo celular fue asociada con una inhibición de la proliferación, lo cual resulta en concordancia con los resultados obtenidos en el ensayo clonogénico. Por otro lado, un incremento en la fase G₂/M indica que la doble cadena de ADN ha sido dañada, lo cual es compatible con el mecanismo de acción propuesto, de interacción de los complejos con el material genético. Durante esta fase, las células tumorales pueden intentar reparar el ADN, llevando a una activación de las vías de señalización que disparan el proceso de apoptosis (Czarnomysy *et al.*, 2018).

La replicación del ADN tardía e incompleta representa un riesgo para la segregación de cromosomas. Esto es así para aquellos sitios llamados “sitios frágiles comunes” que son replicados de manera tardía durante el ciclo celular. Estos sitios se presentan cuando los cromosomas de metafase muestran huecos o roturas, estos factores llevan a la micronucleación. La ruptura de los cromosomas representa un problema para las células mitóticas, ya que la segregación de los fragmentos resultantes es aleatoria en ausencia de mecanismos compensatorios. Otro factor relacionado es la activación de STAT1 (*Signal transducer and activator of transcription 1*) inducida por la ruptura de doble cadena se correlaciona con la aparición de micronúcleos aberrantes. (Hustedt & Durocher, 2017).

Muchos complejos de rutenio reportados, exhibieron propiedades antitumorales provocando apoptosis en las células cancerígenas, por ejemplo, [Ru(dppz)₂(CppH)]²⁺ demostró actividad sobre las células HeLa, [Ru(bpy)₂(addppn)]²⁺ tiene efectos citotóxicos e induce apoptosis sobre la línea celular BEL-7402 y [Ru(DIP)₂(1Py-βC)](PF₆)₂ demostró tener mejor actividad que el CisPt. Además se reportó un complejo de rutenio con tiofenos como ligandos, Δ/Λ-[Ru(bpy)₂(pscl)]²⁺, cuyo mecanismo de acción es través de daños en el ADN, que provocan la muerte celular por apoptosis (Chen *et al.*, 2018). Otro complejo reportado fue [Ru(dip)₂(bpy/bpy-2-nitrolm)]²⁺ que ha mostrado elevada toxicidad en las líneas A549 y 4T1, mediante la inducción de apoptosis mediada por el arresto del ciclo celular en la fase S (Pal *et al.*, 2018).

3.4 Estudios en modelos 3D

Con el objetivo de seguir estudiando la capacidad antitumoral de estos complejos, se utilizaron sistemas celulares más complejos, como los esferoides multicelulares. Se estudiaron dos propiedades principales, citotoxicidad, mediante el ensayo de la resazurina, y la capacidad de inhibir la invasión de las células de los esferoides dentro de una matriz de colágeno tipo I.

Se generaron esferoides de la línea MG-63 y MCF7 por el método *hanging drop*, y los esferoides de la línea celular de pulmón, A549, por el método *liquid overlay*. Ambos métodos han sido expuestos en la sección de materiales y métodos.

3.4.1 Evaluación de la citotoxicidad de los compuestos en modelos 3D

Los esferoides de las 3 líneas celulares, fueron expuestos a ambos complejos, en un rango de concentración de 50 a 500 μM , por un periodo de 48 h. Finalizado el mismo se adicionó resazurina, por 3 h, y se procedió a leer la fluorescencia en un espectrofluorómetro.

| Línea Celular | IC ₅₀ Complejo 1 | IC ₅₀ complejo 2 | IC ₅₀ CisPt |
|---------------|-----------------------------|-----------------------------|------------------------|
| MG-63 | 251.2± 14.7 | 360.9± 7.9 | 65.1± 5.6 |
| A549 | 103.9± 10.8 | 213.6± 8.6 | > 500 |
| MCF7 | 158.3± 5.8 | 364.2± 6.3 | 129.5± 9.3 |

Tabla 3.4.1.1. Valores de IC₅₀(μM) obtenidos para cada línea celular luego de 24 hs.

En la tabla 3.4.1.1 ([figura 3](#) en anexo, están representado mediante gráficos de barra), se pueden observar los valores de IC₅₀ que se obtuvieron para las distintas líneas. Para la línea celular MG-63, la viabilidad disminuye un 32.15%, 55.19% y 79.5% a medida que aumenta la concentración del complejo 1, obteniéndose un valor de IC₅₀ de: 251.2 μM . Los valores que se obtuvieron para el complejo 2, fueron de 17.07%, 33.34% y 70.75%,

y el IC_{50} que se obtuvo fue de: 360.9 μM . Con ambos complejos se observa que la viabilidad disminuye en función que aumenta la concentración, hay un efecto dosis dependiente ($p < 0.05$).

En la línea A549, los valores de IC_{50} fueron de 103.9 μM para el complejo 1, y 213.6 μM para el complejo 2. Con ambos complejos la viabilidad es dependiente de la concentración ($p < 0.05$). A 50, 200 y 300 μM , existe una diferencia significativa entre ambos complejos ($p < 0.05$). A 50 μM , con el complejo 1 la viabilidad disminuye aproximadamente un 36.37%, mientras que con el complejo 2, no se produce tal efecto. A 200 μM la viabilidad disminuye un 69.45% y un 44.93% con el complejo 1 y 2 respectivamente, y a 300 μM la viabilidad disminuye un 74.82% con el complejo 1 y un 58.05% con el complejo 2.

Por último, en la línea de mama, los valores de IC_{50} fueron de 158.27 μM y de 364.24 μM , para los complejos 1 y 2 respectivamente. Se observa una diferencia significativa entre ambos complejos a las concentraciones de 100 y 200 μM ($p < 0.05$), en la cual la disminución de la viabilidad obtenida fue de 43.48% y 51.4% con el complejo 1, y de 7.24% y 19.21% para el complejo 2. Estos resultados obtenidos para la línea de cáncer de mama denotan un mayor efecto citotóxico para el complejo 1. Además, el efecto citotóxico es concentración dependiente ($p < 0.05$).

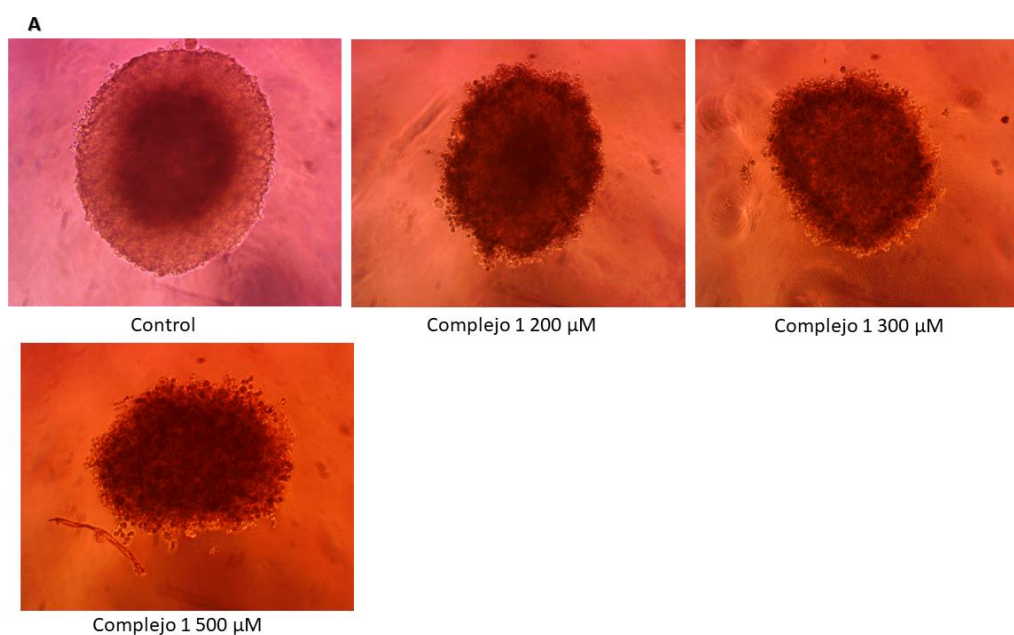
En este modelo multicelular, a diferencia de lo que se observó en monocapa, el complejo 1 mostró mayor efecto citotóxico que el complejo 2. El orden de menor a mayor citotoxicidad en el modelo 3D, para ambos complejos sería: MG-63 < MCF7 < A549.

Sobre la línea A549 el complejo 1 fue más efectivo como antitumoral, a diferencia de lo que se observó en monocapa, donde esta línea manifestó mayor resistencia al tratamiento. El valor de IC_{50} del complejo 1 en el modelo 3D con respecto al de monocapa, fue casi del doble, y este valor para el complejo 2, fue de 8 veces mayor, indicando la resistencia de este modelo a este último complejo.

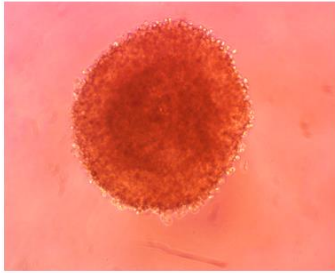
Las líneas MG-63 y MCF7, mostraron mayor resistencia al tratamiento con el complejo 2, ya que la relación entre ambos IC_{50} para la línea MG63 fue de 30 veces y en la línea

MCF7 el IC_{50} fue 17 veces mayor. Vale la pena señalar, que la citotoxicidad del complejo de galio KP46 y el complejo derivado del rutenio KP1339 fue más alto en el modelo 3D que en monocapa, con valores de IC_{50} de $0.44 \mu M$ (2D) vs $133 \mu M$ y $135 \mu M$ (2D) vs $244 \mu M$ (3D), respectivamente (Schreiber-Brynzak *et al.*, 2015).

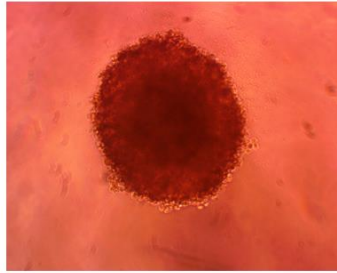
La resistencia de las células al tratamiento puede ser resultados de la exposición limitada de las células dentro del esferoide multicelular, la pobre penetración del complejo 2 o la sensibilidad limitada de las células del interior del esferoide al tratamiento, debido a una reducción de la proliferación celular y/o una resistencia asociada a la adhesión celular (Dickreuter & Cordes, 2017). Por lo general los esferoides son más resistentes a los compuestos antiproliferativos debido a la diferencia en la penetración de la droga y las variaciones en el microambiente (como el pH, hipoxia, matriz extracelular) dentro del esferoide. De manera similar a los tumores *in vivo*, la región hipóxica dentro del esferoide reduce la tasa de división celular, lo que perjudica los efectos antiproliferativos de drogas como el CisPt (De Grandis *et al.*, 2019).



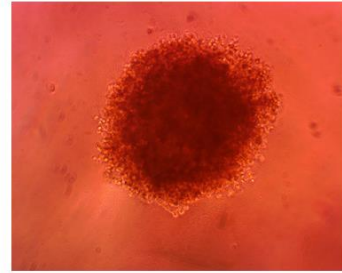
A



Complejo 2 200 μ M

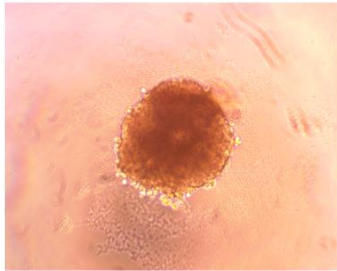


Complejo 2 300 μ M

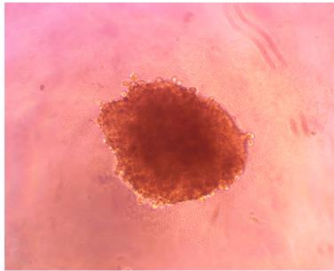


Complejo 2 500 μ M

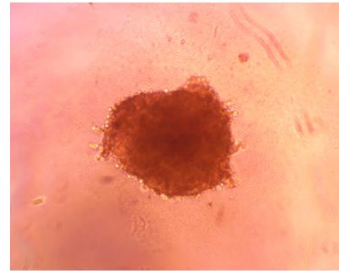
B



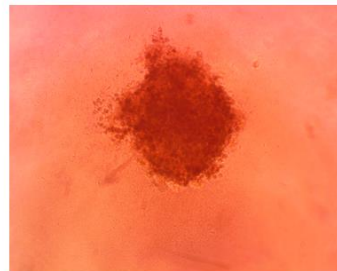
Control



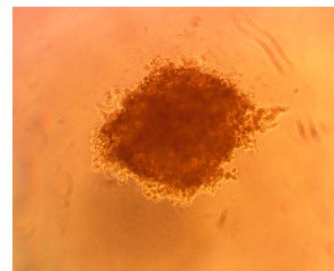
Complejo 1 50 μ M



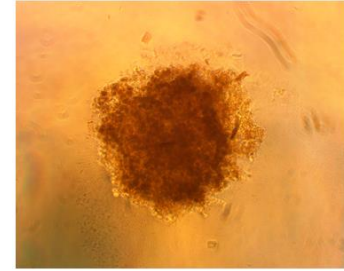
Complejo 1 100 μ M



Complejo 1 200 μ M

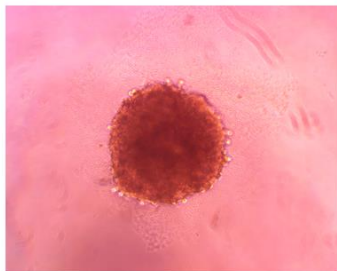


Complejo 1 300 μ M

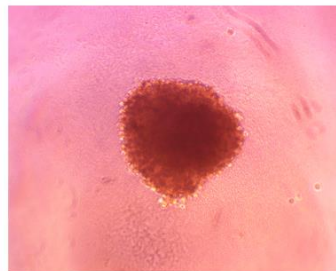


Complejo 1 500 μ M

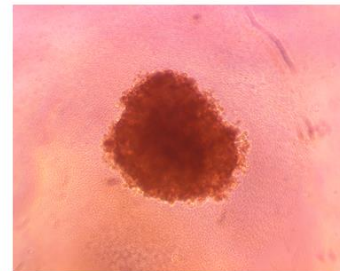
B



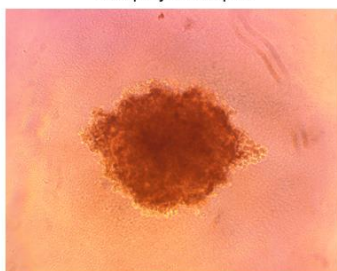
Complejo 2 50 μ M



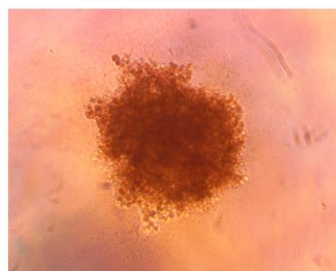
Complejo 2 100 μ M



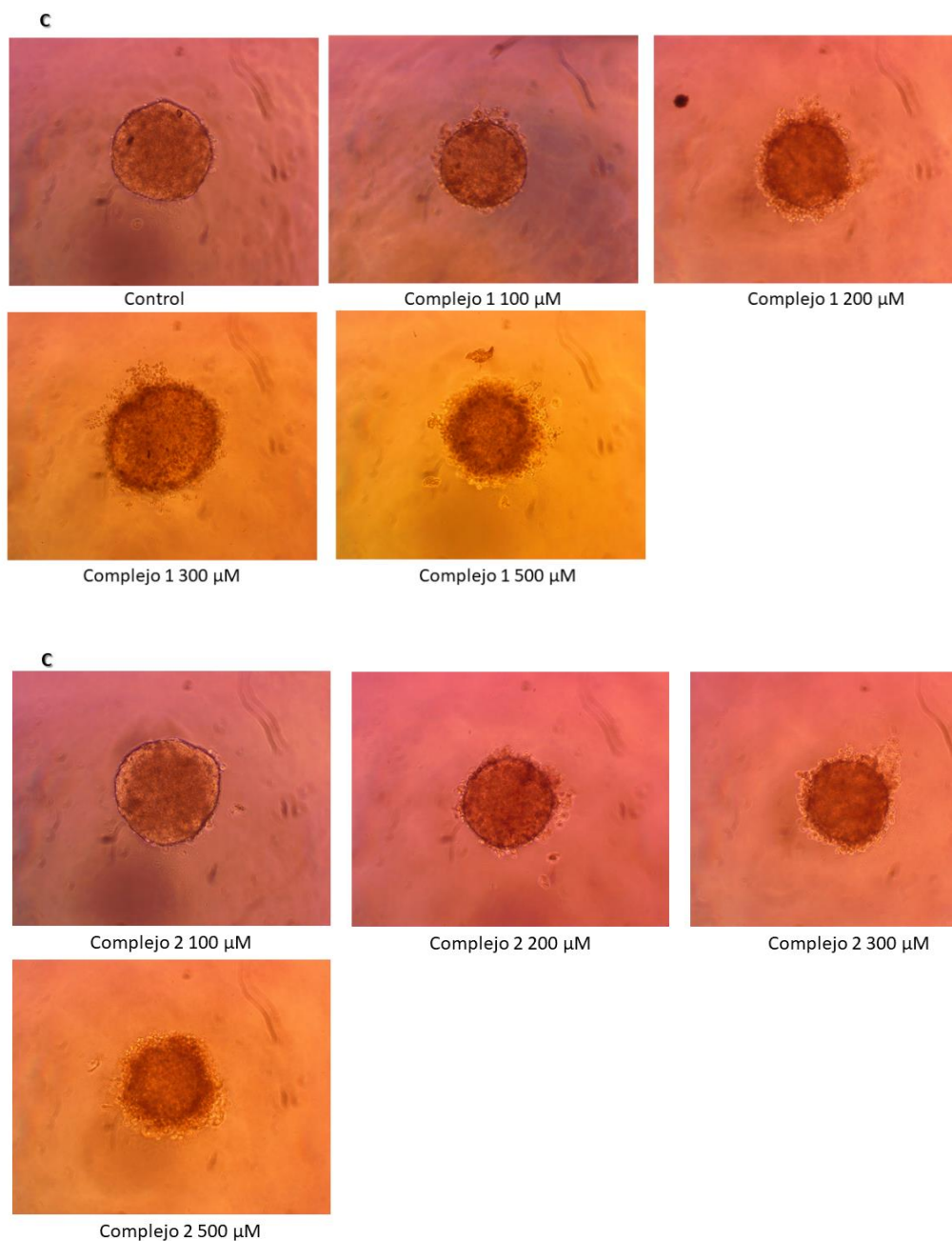
Complejo 2 200 μ M



Complejo 2 300 μ M



Complejo 2 500 μ M



Figuras 3.4.1.1. Fotos de esferoides de la línea MG-63(A), A549 (B) y MCF7 (C). Fotografías tomadas con el microscopio óptico Olympus BX50, con un objetivo 40x luego del tratamiento con ambos complejos con diferentes concentraciones.

Por otro lado, se tomaron fotos de los esferoides al finalizar el tratamiento para evaluar su morfología con respecto al tumor (figura 3.4.1.1). En los tres casos, los esferoides no experimentaron cambios en su volumen con respecto al control, pero sí se observó que a medida que aumentaba la concentración de los complejos, los esferoides cambiaron su forma, perdieron su compactación y las células del exterior se desprendieron, alterando el borde externo de los mismos. La alteración en la agregación celular,

resultando en la presencia de debris luego del tratamiento, sugiere una disrupción en las interacciones en la célula-matriz extracelular.

3.4.2 Efecto de los complejos sobre la capacidad de invasión

Otro de los estudios que se llevó a cabo fue la capacidad de los complejos de inhibir la invasión de las células sobre una matriz de colágeno I, uno de los componentes de la matriz extracelular (MEC). El proceso de invasión es fundamental durante la tumorigénesis, debido a que es un paso clave del proceso de metástasis.

Los esferoides se los sembró sobre una matriz de colágeno I, fueron tratados con ambos complejos y luego se evaluó la capacidad de los complejos de inhibir este proceso, midiendo las proyecciones celulares de los esferoides. Las fotografías fueron tomadas al finalizar el tratamiento con un microscopio óptico Olympus BX50 con una cámara digital acoplada (resolución de 10 megapíxeles).

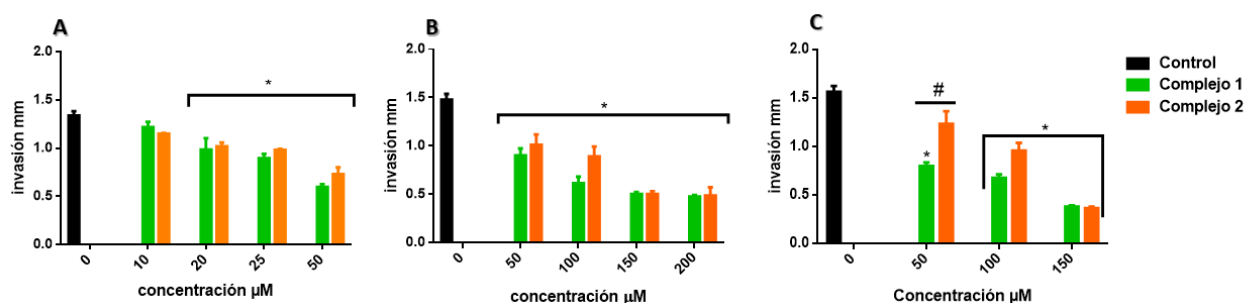


Figura 3.4.2.1 Resultados de la invasión de los esferoides sobre una matriz de colágeno I, luego del tratamiento. A: MG-63, B: A549, C: MCF7. *Diferencia significativa con el control $p < 0.05$. # Diferencias significativas entre el complejo 1 y 2 $p < 0.05$. Los datos se representan como la media \pm SEM con $n=3$.

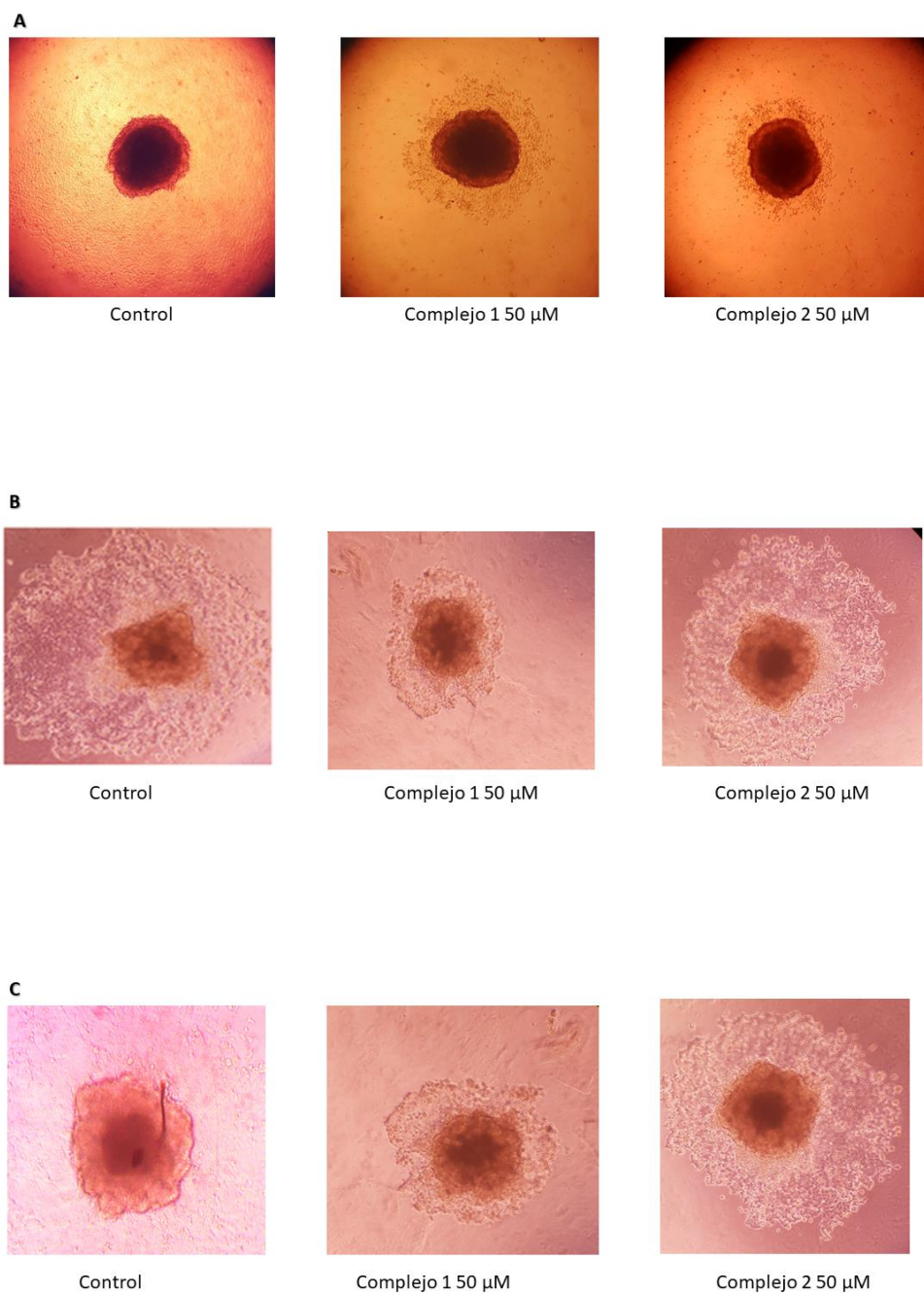


Figura 3.4.2.2. Fotos tomadas con el microscopio óptico Olympus BX50 A: MG-63, B: A549, C: MCF7.

Como puede interpretarse a partir de la figura 3.4.2.1 y de las fotos de la figura 3.4.2.2, la inhibición de la invasión es mayor con el complejo 1 que la impartida por el complejo 2, en los tres casos. Particularmente, la línea MG-63 (Figura 3.4.2.1A) y A549 (Figura 3.4.2.1B), presentaron una disminución de la invasión de casi el 50% a 50 μ M, con el complejo 1. En la línea de pulmón, a las concentraciones más altas evaluadas, la disminución de la invasión es debido a efectos citotóxicos del complejo. En la línea MCF7

(Figura 3.4.2.1C), a 50 μ M hay una diferencia significativa entre ambos complejos ($p < 0.05$), siendo el complejo 1 más activo.

En este modelo 3D, de esferoides multicelulares, el complejo 1 reveló mayor actividad citotóxica y anti-invasiva que el complejo 2, a diferencia de lo que ocurría en el sistema 2D. Además se observa que con ambos complejos, hay un efecto dosis dependiente ($p < 0.05$).

A partir de lo expuesto se puede decir que en el sistema 3D, las drogas actúan de manera diferente que en monocapa. Este sistema de esferoides multicelulares son una mejor aproximación del estado de las células cancerígenas en su medio fisiológico, lo cual puede ser usado para estimar mejor el potencial terapéutico de las drogas (Mikhail *et al.*, 2013). Esto puede deberse a varios motivos relacionados a la complejidad de los esferoides multicelulares. Como expusieron Hamilton y colaboradores, el contacto célula-célula es preservado en los esferoides, e influye en la sensibilidad a las drogas a través de diferentes mecanismos, resumidos como “fenotipo resistoma”. Distintas proteínas como las integrinas, quinasas, proteínas adaptadoras, han sido identificadas como determinantes clave del resistoma, basado en la adhesión celular que comprende la resistencia a medicamentos mediado por adhesión celular. Asimismo, la estructura del esferoide es una de las razones principales que lleva a diferenciarse de la monocapa, debido a que permite una expresión diferencial de genes de supervivencia, proliferación, diferenciación y quimioresistencia, que demuestra que los esferoides son similares a tumores *in vivo*, más que un cultivo en monocapa (Hamilton & Rath, 2019). Lovitt y colaboradores compararon la citotoxicidad con doxorrubicina en modelos en monocapa y 3D, los esferoides exhiben 5 veces más resistencia al tratamiento comparada con la monocapa, además se observó que la mayor concentración de la droga estaba en la capa externa, demostrando limitaciones en la penetración de la misma hacia la parte interna del esferoide. Otra de las razones por las cuales hay diferencias en la actividad citotóxica de las drogas, es la distribución de las mismas, siendo más homogénea en monocapa, y es más heterogénea en esferoides debido a sus diferentes capas formadas por diferentes poblaciones celulares. La hipoxia es otra de las razones por las cuales hay diferencia en la actividad de una droga entre cultivo 2D y 3D,

lo cual fue revelado por compuestos de Pt(II), las cuales dependen del grado de reducción bajo hipoxia para impartir su acción citotóxica. En este sentido, Göschl y colaboradores, estudiaron la capacidad citotóxica de compuestos de Pt(IV), derivados del oxaliplatino, bajo condiciones de normóxica e hipoxia en modelo 2D y 3D de células de carcinoma de colon. Este estudio revela que los compuestos de Pt(IV), en los esferoides hipóxicos, eran menos tóxicos comparadas con la monocapa normóxica en todas las líneas celulares testeadas, especialmente el oxaliplatino, con una diferencia aproximada de 13 a 64 veces menos activo en los esferoides. Los gradientes del potencial redox dentro del esferoide reflejan alteraciones en el metabolismo celular (Göschl *et al.*, 2017).

El crecimiento de las células en 3D afecta el comportamiento celular, la forma, la polaridad, la expresión de genes y proteínas, el crecimiento, la motilidad, la diferenciación así como la quimio y radio sensibilidad. El crecimiento de células como esferoides modifica sus propiedades invasivas. Muriel Affoué dit Faute y colaboradores, demostraron que la línea celular MCF7 aumentaba sus propiedades invasivas cuando era cultivada como esferoide, que cuando lo hacía como monocapa. A su vez se observa diferencia en la expresión de las metaloproteinasas, activador tisular del plasminógeno (tPA) y uroquinasa (uPA), enzimas necesarias para el proceso de invasión, entre monocapa y esferoide, siendo mayor en este último. Esto puede ser causa del fenómeno de hipoxia establecido en los esferoides, este efecto estimula la invasión debido a que induce la sobreexpresión del receptor de uroquinasa (Affou *et al.*, 2013).

Cuando las células tumorales crecen en un soporte, hay un soporte estructural y señales importantes que ayudan el crecimiento en 3D, lo cual a su vez conduce una mayor resistencia a la quimioterapia.

El colágeno tipo I es uno de los principales componentes de la matriz extracelular (MEC), en este sentido es una buena matriz para ensayar procesos de invasión, al mismo tiempo tiene una excelente biocompatibilidad con la mayoría de las células tumorales. Numerosos investigadores han demostrado que el colágeno mantiene la estructura y la viabilidad celular. Estudios en cáncer de mama demostraron que además de inducir la

diversificación de morfologías celulares, también extiende las prolongaciones celulares y aumenta la expresión de factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) y metaloproteinasas (Lv *et al.*, 2017). Señales del microambiente tumoral, por ejemplo de la MEC, han mostrado tener efectos en la morfología y función celular, a través de la modulación de la arquitectura y de los eventos de señalización celular. Las interacciones con el microambiente, especialmente entre la MEC y los receptores de las células tumorales han demostrado regular señalizaciones intracelulares y el fenotipo tumoral. Weaver y colaboradores, demostraron que al bloquear las interacciones entre la MEC y las integrinas con anticuerpos producen una reversión de una morfología maligna a una normal. A su vez, Wang y colaboradores demostraron que bloqueando esta misma interacción se produce una reversión del fenotipo metastásico de células cancerígenas de mama a un fenotipo más epitelial y relativamente benigno, caracterizado por la disminución del potencial invasivo (LaBarbera *et al.*, 2012).

La resistencia mediada por la adhesión celular limita el éxito de las terapias contra el cáncer y es un gran obstáculo a superar en la clínica. Desde los años 90' se conoce que la adhesión de las células tumorales a la MEC es un importante factor de resistencia a la radio y quimio-terapias. Molecularmente, las integrinas se unen a proteínas de la MEC formando unnexo estructural, además de influir sobre cascadas de señalización. Estos nexos son llamados adhesiones focales y consisten en una gran variedad de proteínas transmembranas, integrales y citoplasmáticas. Funciones celulares, como supervivencia, proliferación, migración e invasión y muerte celular son reguladas como consecuencia de estas uniones. Respecto a la resistencia a las terapias, la plasticidad de las células cancerosas permite una reorganización y adaptación rápidas para eludir los efectos citotóxicos de la radioterapia y la quimioterapia. Diferentes integrinas, proteínas adaptadoras y citoplasmáticas han sido identificadas como determinantes de la resistencia mediada por adhesión. Particularmente, las integrinas son receptores que facilitan la adhesión de las células a la MEC, con fibronectina, colágeno o laminina. Estas proteínas tienen una función clave en el desarrollo de la resistencia a quimio y radioterapia, lo cual se vio en variados tipos de cáncer como de pulmón, mama, leucemia, colon hepatocelular, etc. Un mediador clave además del proceso es FAK (focal

adhesión quinasa). La interacción de FAK con cortactin es crucial para la radioresistencia y para la movilidad celular. (Lv *et al.*, 2017)

3.5 Conclusiones

El objetivo de este capítulo fue estudiar las propiedades antitumorales de dos complejos de rutenio con *p*-cimeno y ligando de 8-hidroxiquinolinas con 1 o 2 átomos de bromo, dilucidar su mecanismo de acción y estudiar su efecto sobre los procesos de migración e invasión celular. Para llevar a cabo este objetivo, se utilizaron dos sistemas de cultivo, el sistema monocapa (2D) y el de esferoides multicelulares (3D).

A partir de los resultados observados podemos concluir que ambos complejos tienen efectos citotóxicos sobre las líneas celulares empleadas siendo un posible mecanismo de acción la interacción con la molécula de ADN, demostrado por su interacción con el Ct-ADN, la generación de micronúcleos y la ruptura de la hebra de ADN, evidenciado por el ensayo cometa. Esto desencadena un arresto del ciclo celular en la fase S y G₂/M, finalmente induciendo apoptosis celular. Además, estos complejos inhiben dos procesos muy importantes relacionados al proceso de metástasis, como ser la migración y la invasión. Estos complejos cuando son estudiados en el sistema 3D, cambian su comportamiento, siendo más efectivo el complejo 1, exhibiendo mejores propiedades frente a la línea celular de pulmón, con el IC₅₀ más bajo de las 3 líneas tumorales estudiadas. Igualmente, demostró una mejor inhibición del proceso de invasión. Este estudio sugiere que el microambiente de las células tumorales puede alterar notablemente la susceptibilidad de las células al tratamiento con drogas antitumorales. Tal como se mencionó anteriormente, los esferoides expresan genes asociados a la supervivencia, proliferación, diferenciación y resistencia a los antitumorales de manera diferente a una monocapa. Cabe destacar que el gradiente que se genera en los esferoides multicelulares de pH, CO₂, metabolitos, desechos, etc., afectan el comportamiento celular, incluido la radio y quimiosensibilidad. Lo expuesto anteriormente es lo que en parte podría explicar las diferencias en la respuesta a los complejos de Ru 1 y 2.

Por otro lado, se verifica la hipótesis planteada, a partir de datos obtenidos en la bibliografía para sales de rutenio y sus ligandos, como antitumorales. Se encontraron valores de IC_{50} mayor a $800 \mu M$ cuando fueron tratadas con p-cimeno para líneas celulares tumorales derivadas de fibrosarcoma (J. Z. Li *et al.*, 2016).

El uso de cultivo celular *in vitro* es crítico para el descubrimiento y formulación de nuevas drogas, para la identificación rápida de candidatos e investigar sus mecanismos de acción a nivel celular y molecular. En contraste a un estudio en modelos tumorales *in vivo*, el sistema *in vitro* está mejor adaptado para estudios sistemáticos en un ambiente altamente controlado. Sin embargo, los efectos citotóxicos observados en una monocapa convencional, algunas veces no se traducen en efectos similares cuando son trasladadas a sistemas *in vivo*. Las razones son porque el sistema 2D no tiene la capacidad de reflejar los mecanismos de resistencia y restricciones de transporte a las drogas relacionados con el microambiente tumoral del sistema de cultivo 3D. Por esta razón hay un elevado interés en aplicar sistema 3D *in vitro* que permita un rápido screening de formulaciones para seleccionar posibles candidatos para evaluaciones *in vivo* (Lv *et al.*, 2017).

3.6 Bibliografía.

- Affou, M., Laurent, L., Ploton, D., & Poupon, M. (2013). <Faute et al. (2001).pdf>. 21–32.
- Aleksić, M. M., & Kapetanović, V. (2014). An overview of the optical and electrochemical methods for detection of DNA - Drug interactions. *Acta Chimica Slovenica*, 61(3), 555–573.
- Bergamo, A., & Sava, G. (2015). Linking the future of anticancer metal-complexes to the therapy of tumour metastases. *Chemical Society Reviews*, 44(24), 8818–8835. <https://doi.org/10.1039/c5cs00134j>
- Brabec, V., & Nováková, O. (2006). DNA binding mode of ruthenium complexes and relationship to tumor cell toxicity. *Drug Resistance Updates*, 9(3), 111–122. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2006.05.002>
- Chen, J., Zhang, Y., Li, G., Peng, F., Jie, X., She, J., Dongye, G., Zou, Z., Rong, S., & Chen, L. (2018). Cytotoxicity in vitro, cellular uptake, localization and apoptotic mechanism studies induced by ruthenium(II) complex. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 23(2), 261–275. <https://doi.org/10.1007/s00775-017-1528-2>
- Czarnomysy, R., Surazyński, A., Muszynska, A., Gornowicz, A., Bielawska, A., & Bielawski, K. (2018). A novel series of pyrazole-platinum(II) complexes as potential anti-cancer agents that induce cell cycle arrest and apoptosis in breast cancer cells. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 33(1), 1006–1023. <https://doi.org/10.1080/14756366.2018.1471687>
- Czarnomysy, R., Surazyński, A., Popławska, B., Rysiak, E., Pawłowska, N., Czajkowska, A., Bielawski, K., & Bielawska, A. (2017). Synergistic action of cisplatin and echistatin in MDA-MB-231 breast cancer cells. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 427(1–2), 13–22. <https://doi.org/10.1007/s11010-016-2894-8>
- De Camargo, M. S., Da Silva, M. M., Correa, R. S., Vieira, S. D., Castelli, S., D’Anessa, I.,

- De Grandis, R., Varanda, E., Deflon, V. M., Desideri, A., & Batista, A. A. (2016). Inhibition of human DNA topoisomerase IB by nonmutagenic ruthenium(II)-based compounds with antitumoral activity. *Metallomics*, 8(2), 179–192. <https://doi.org/10.1039/c5mt00227c>
- de Camargo, M. S., De Grandis, R. A., da Silva, M. M., da Silva, P. B., Santoni, M. M., Eismann, C. E., Menegário, A. A., Cominetti, M. R., Zanelli, C. F., Pavan, F. R., & Batista, A. A. (2019). Determination of in vitro absorption in Caco-2 monolayers of anticancer Ru(II)-based complexes acting as dual human topoisomerase and PARP inhibitors. *BioMetals*, 32(1), 89–100. <https://doi.org/10.1007/s10534-018-0160-0>
- Dragutan, I., Dragutan, V., & Démonceau, A. (2015). Editorial of special issue ruthenium complex: The expanding chemistry of the ruthenium complexes. In *Molecules* (Vol. 20, Issue 9, pp. 17244–17274). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/molecules200917244>
- Gobec, M., Kljun, J., Sosič, I., Mlinarič-Raščan, I., Uršič, M., Gobec, S., & Turel, I. (2014). Structural characterization and biological evaluation of a clioquinol-ruthenium complex with copper-independent antileukaemic activity. *Dalton Transactions*, 43(24), 9045–9051. <https://doi.org/10.1039/c4dt00463a>
- Göschl, S., Schreiber-Brynzak, E., Pichler, V., Cseh, K., Heffeter, P., Jungwirth, U., Jakupec, M. A., Berger, W., & Keppler, B. K. (2017). Comparative studies of oxaliplatin-based platinum(IV) complexes in different in vitro and in vivo tumor models. *Metallomics: Integrated Biometal Science*, 9(3), 309–322. <https://doi.org/10.1039/c6mt00226a>
- Hamilton, G., & Rath, B. (2019). Applicability of tumor spheroids for in vitro chemosensitivity assays. *Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology*, 15(1), 15–23. <https://doi.org/10.1080/17425255.2019.1554055>
- Hustedt, N., & Durocher, D. (2017). The control of DNA repair by the cell cycle. *Nature Cell Biology*, 19(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/ncb3452>

Kljun, J., León, I. E., Peršič, Š., Cadavid-Vargas, J. F., Etcheverry, S. B., He, W., Bai, Y., & Turel, I. (2018). Synthesis and biological characterization of organoruthenium complexes with 8-hydroxyquinolines. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 186(2017), 187–196. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2018.05.009>

Ruiz

LaBarbera, D. V., Reid, B. G., & Yoo, B. H. (2012). The multicellular tumor spheroid model for high-throughput cancer drug discovery. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 7(9), 819–830. <https://doi.org/10.1517/17460441.2012.708334>

Leon, I., Cadavid-Vargas, J., Di Virgilio, A., & Etcheverry, S. (2016). Vanadium, Ruthenium and Copper Compounds: A New Class of Nonplatinum Metallodrugs with Anticancer Activity. *Current Medicinal Chemistry*, 24(2), 112–148. <https://doi.org/10.2174/0929867323666160824162546>

Liu, J., Lai, H., Xiong, Z., Chen, B., & Chen, T. (2019). Functionalization and cancer-targeting design of ruthenium complexes for precise cancer therapy. *Chemical Communications*, 55(67), 9904–9914. <https://doi.org/10.1039/c9cc04098f>

Lopez, J., & Tait, S. W. G. (2015). Mitochondrial apoptosis: Killing cancer using the enemy within. *British Journal of Cancer*, 112(6), 957–962. <https://doi.org/10.1038/bjc.2015.85>

Lv, D., Hu, Z., Lu, L., Lu, H., & Xu, X. (2017). Three-dimensional cell culture: A powerful tool in tumor research and drug discovery. *Oncology Letters*, 14(6), 6999–7010. <https://doi.org/10.3892/ol.2017.7134>

Mansouri-Torshizi, H., Rezaei, E., Kamranfar, F., & Majd, M. H. (2016). Investigating the apoptosis ability of ethylenediamine 8- hydroxyquinolinato palladium (II) complex. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 6(3), 449–453. <https://doi.org/10.15171/apb.2016.058>

Meier-Menches, S. M., Gerner, C., Berger, W., Hartinger, C. G., & Keppler, B. K. (2018).

Structure-activity relationships for ruthenium and osmium anticancer agents-towards clinical development. *Chemical Society Reviews*, 47(3), 909–928. <https://doi.org/10.1039/c7cs00332c>

Mikhail, A. S., Eetezadi, S., & Allen, C. (2013). Multicellular Tumor Spheroids for Evaluation of Cytotoxicity and Tumor Growth Inhibitory Effects of Nanomedicines In Vitro: A Comparison of Docetaxel-Loaded Block Copolymer Micelles and Taxotere®. *PLoS ONE*, 8(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062630>

Ndagi, U., Mhlongo, N., & Soliman, M. E. (2017). Metal complexes in cancer therapy – An update from drug design perspective. In *Drug Design, Development and Therapy* (Vol. 11, pp. 599–616). Dove Medical Press Ltd. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S119488>

Pal, M., Nandi, U., & Mukherjee, D. (2018). Detailed account on activation mechanisms of ruthenium coordination complexes and their role as antineoplastic agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 150, 419–445. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.03.015>

Russo, A., & Degrassi, F. (2018). Molecular cytogenetics of the micronucleus: Still surprising. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 836, 36–40. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2018.05.011>

Sirajuddin, M., Ali, S., & Badshah, A. (2013). Drug-DNA interactions and their study by UV-Visible, fluorescence spectroscopies and cyclic voltametry. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 124, 1–19. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2013.03.013>

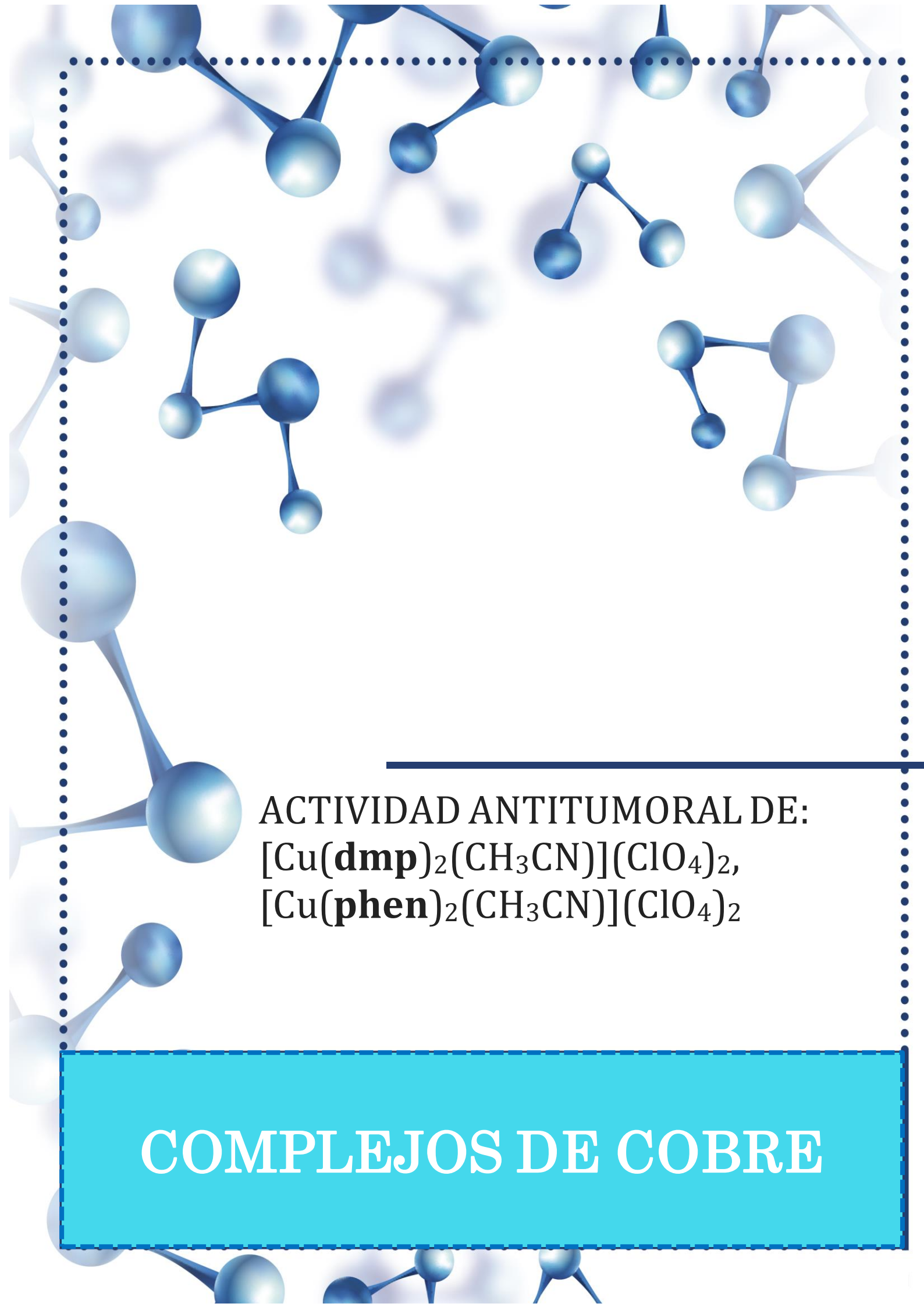
Suwanjang, W., Prachayasittikul, S., & Prachayasittikul, V. (2016). Effect of 8-hydroxyquinoline and derivatives on human neuroblastoma SH-SY5Y cells under high glucose. *PeerJ*, 2016(8). <https://doi.org/10.7717/PEERJ.2389>

Thota, S., Rodrigues, D. A., Crans, D. C., & Barreiro, E. J. (2018). Ru(II) Compounds: Next-

Generation Anticancer Metallotherapeutics? [Review-article]. *Journal of Medicinal Chemistry*, 61(14), 5805–5821.
<https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.7b01689>

Tian, M., Li, J., Zhang, S., Guo, L., He, X., Kong, D., Zhang, H., & Liu, Z. (2017). Half-sandwich ruthenium(ii) complexes containing N[^]N-chelated imino-pyridyl ligands that are selectively toxic to cancer cells. *Chemical Communications*, 53(95), 12810–12813. <https://doi.org/10.1039/c7cc08270c>

Wang, X., Wang, X., Jin, S., Muhammad, N., & Guo, Z. (2019). Stimuli-Responsive Therapeutic Metallodrugs. *Chemical Reviews*, 119(2), 1138–1192.
<https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00209>



ACTIVIDAD ANTITUMORAL DE:
 $[\text{Cu}(\mathbf{dmp})_2(\text{CH}_3\text{CN})](\text{ClO}_4)_2$,
 $[\text{Cu}(\mathbf{phen})_2(\text{CH}_3\text{CN})](\text{ClO}_4)_2$

COMPLEJOS DE COBRE

4 Complejos de cobre

Resultados y discusión de los Complejos de Cobre.

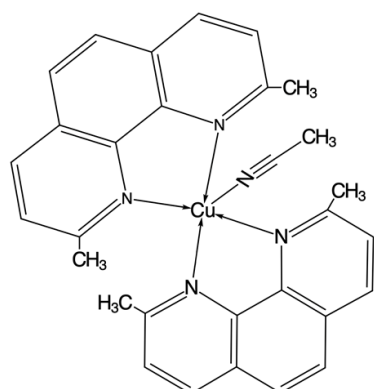
En este trabajo se sintetizaron y caracterizaron dos complejos de cobre, uno de ellos tiene como ligando a la 2,9 dimetil-1,10 fenantrolina, $[\text{Cu}(\text{dmp})_2(\text{CH}_3\text{CN})](\text{ClO}_4)_2$, (**complejo 3**), y el otro complejo tiene como ligando a la 1-10- fenantrolina, $[\text{Cu}(\text{phen})_2(\text{CH}_3\text{CN})](\text{ClO}_4)_2$, (**complejo 4**). Sus estructuras están representadas en la figura 4.1. En este capítulo, se evaluó la actividad antitumoral por múltiples ensayos, entre ellos MTT, ensayo clonogénico, efectos sobre el proceso de migración celular mediante el ensayo de la herida y zimografía. Además, se estudió su capacidad de producir especies reactivas de oxígeno (ERO). Estos ensayos se llevaron a cabo en un panel de células cancerígenas que incluyen MG-63, A549 y 2 líneas tumorales de mama, MDA-MB-231 y MCF7.

Por otro lado, se empleó el uso de esferoides multicelulares, de las líneas MG-63, A549 y MCF7, sobre los que se evaluaron la viabilidad celular usando resazurina como sonda, y además se determinó la capacidad de los complejos de interferir sobre la invasión de células tumorales sobre una matriz de colágeno I.

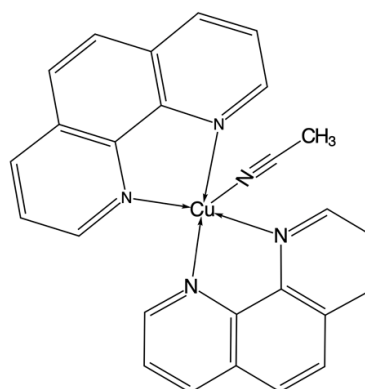
Sobre 3 líneas celulares derivadas de cáncer colorrectal humano, HT-29, CACO2 y LS174T, además de realizar los ensayos ya mencionados, se analizó la capacidad de estos complejos de inducir apoptosis, mediante citometría de flujo, así como la alteración del ciclo celular. Específicamente en la línea HT-29, se evaluó la vía de señalización NF κ B con el uso de la línea celular transfectada HT-29-NF KB-GFP en monocapa y en el sistema celular 3D.

Para agregar a la caracterización biológica de estos compuestos, se llevaron a cabo estudios *in vivo*, usando dos sistemas. Uno de ellos en embriones de *Xenopus laevis*, para estudiar la inhibición de la vía Wnt/ β -Catenina, y luego se realizó un estudio sobre la actividad antitumoral sobre ratones N:NIH(S) *Fox1^{nu}*, a los que se le generaron

tumores subcutáneo con la línea celular HT-29.



Complejo 3. $[Cu^{II}(dmp)(CH_3CN)_2](ClO_4)_2$.



Complejo 4. $[Cu^{II}(phen)(CH_3CN)_2](ClO_4)_2$.

Figura 4.1. Estructura de los complejos de cobre, $[Cu(dmp)_2(CH_3CN)](ClO_4)_2$, Complejo 3, y $[Cu(phen)_2(CH_3CN)](ClO_4)_2$, complejo 4.

4.1 Experimentos en monocapa

4.1.1 Ensayo de viabilidad. MTT Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio.

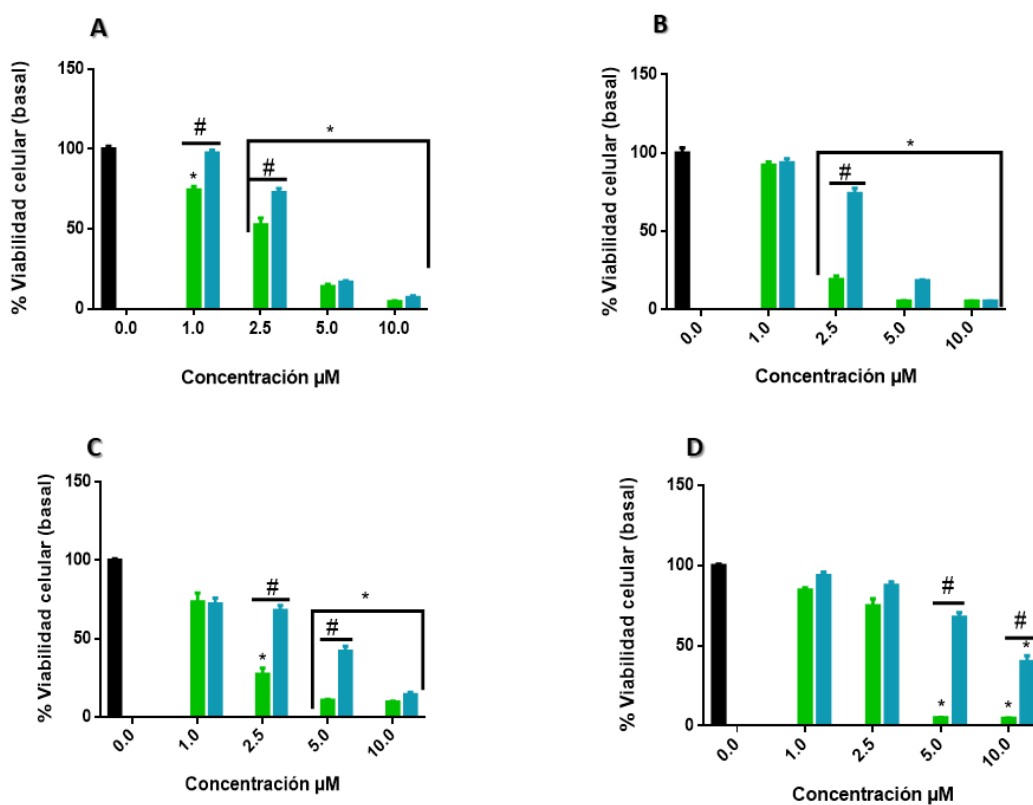
Se evaluó la citotoxicidad de los complejos de cobre mediante el ensayo MTT. Las líneas tumorales, de osteosarcoma (MG-63), pulmón (A549), mama (MDA-MB-231 y MCF-7) y de cáncer colorrectal (HT-29, CACO2 y LS174T) fueron tratadas por un periodo de 24 hrs.

Los resultados se pueden observar en la tabla 4.1.1.1 y en las gráficas de barra de la figura 4.1.1.1.

| Línea Celular | IC ₅₀ complejo 3 | IC ₅₀ complejo 4 | IC ₅₀ CisPt |
|--------------------------|-----------------------------|-----------------------------|------------------------|
| <u>MG-63</u> | 2.94 ± 0.27 | 3.14 ± 0.18 | 39 ± 1.8 |
| <u>A549</u> | 1.90 ± 0,04 | 4.00 ± 0.85 | 114 ± 2.3 |
| <u>MDA-MB-231</u> | 2.04 ± 0.19 | 4.74 ± 0.45 | 131 ± 18 |
| <u>MCF-7</u> | 2.99 ± 0.17 | 6.01 ± 0.45 | 42 ± 3.2 |

| | | | |
|----------------------|-------------|-------------|---|
| <u>Caco-2</u> | 2.32 ± 0.30 | 6.48 ± 1.10 | 120.9 ± 7.0 (León <i>et al.</i> , 2016) |
| <u>LS174T</u> | 1.44 ± 0.26 | 2.54 ± 0.15 | 4.3 ± 0.3 (Sonawane <i>et al.</i> , 2019) |
| <u>HT-29</u> | 1.45 ± 0.36 | 3.08 ± 0.24 | 181.1 ± 6.1 (León <i>et al.</i> , 2016) |

Tabla 4.1.1.1.1: Resultados de IC₅₀ (μM) de los complejos de cobre y CisPt en las líneas tumorales estudiadas. Los resultados se expresan como media ± SEM (n=3).



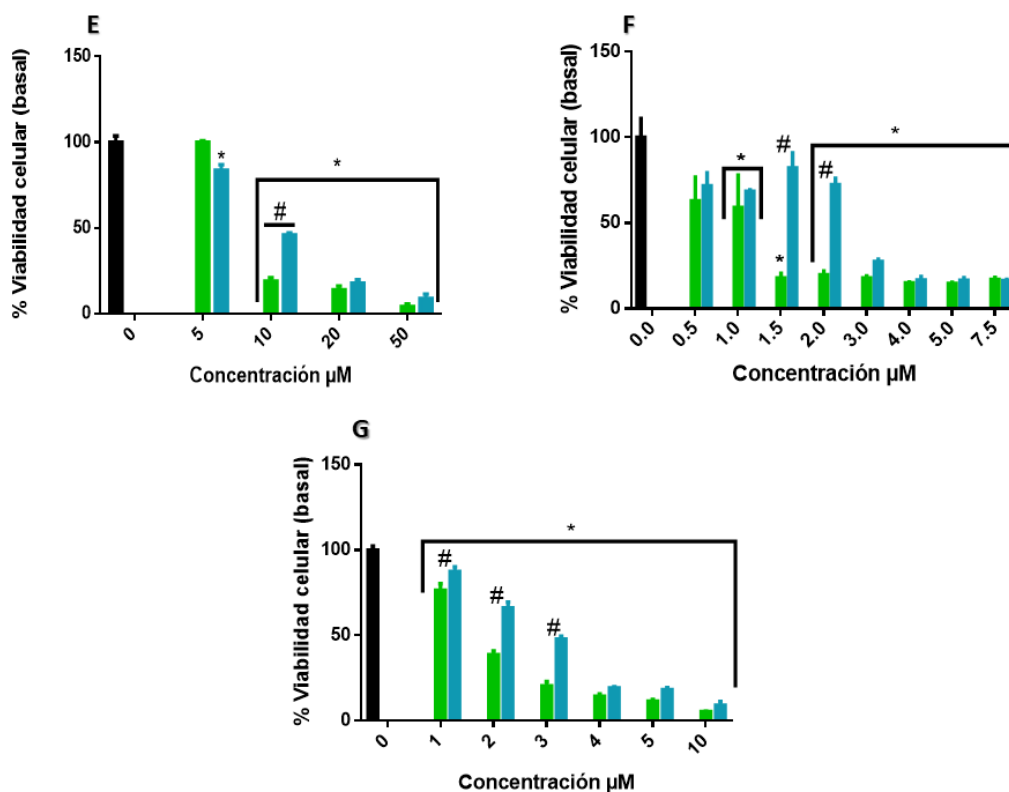


Figura 4.1.1.1. Gráficas de viabilidad celular. Método MTT. A: MG-63, B: A549, C: MDA-MB-231, D: MCF-7, E: CACO2, F: LS174T, G: HT29. Los resultados se expresan como la media \pm SEM ($n=3$). *Diferencia significativa con el control ($p<0.05$). #Diferencia significativa entre complejo 3 y 4 ($p<0.05$).

En la tabla 4.1.1.1, se resumen los valores de IC_{50} obtenidos para cada línea celular. Se puede apreciar que ambos complejos exhibieron actividad citotóxica sobre todas las líneas tumorales. Los valores de IC_{50} son relativamente bajos, entre 1.44 y 6.48 μM , sin embargo, el complejo 3 mostró mayor potencial citotóxico. En ambos casos, las líneas más sensibles al tratamiento fueron las derivadas de colon: HT-29 y LS174T. Para el complejo 3, un orden de acción de menor a mayor citotoxicidad sería: MCF-7>MG-63>CACO2>MDA-MB-231>A549>HT-29>LS174T. Para el complejo 4, sería: CACO-2>MCF-7>MDA-MB-231>A549>MG-63>HT-29 y LS174T.

En las gráficas de la figura 4.1.1.1, se puede observar, a bajas concentraciones, diferencias estadísticamente significativas en la actividad citotóxica impartida por los complejos, no así a medida que aumenta la concentración, donde el efecto es similar ($p<0.05$).

Por otro lado, ambos complejos tienen IC_{50} menores que el compuesto CisPt, que fue usada como droga de referencia. La diferencia entre los valores de IC_{50} del CisPt y los complejos 3 y 4 es entre 18 a 124 veces mayor, registrándose la mayor diferencia para la línea HT-29 al ser tratada con el complejo 3.

Las drogas quimioterápicas de primera línea usadas para el cáncer de colon, incluye entre otras al oxaliplatino. Al comparar los IC_{50} obtenidos para el complejo de cobre 3 con esta droga, para la línea HT-29, 1.45 μ M vs 2 μ M (Lu *et al.*, 2017), los resultados evidencian valores similares de actividad antitumoral. Otro grupo de investigación reportó un valor de 5 μ M, luego de 48 h de exposición al oxaliplatino (Attoub *et al.*, 2018). Al igual para la línea CACO-2, la bibliografía reporta datos de IC_{50} en un rango de 10 a 13.8 μ M para el oxaliplatino (Gu *et al.*, 2018)(Biswas *et al.*, 2019)(Y. Shi *et al.*, 2012), aproximadamente 6 veces más que para el complejo 3 y el doble para el complejo 4. Y para la línea LS174T, el valor de IC_{50} reportado es de 29.94 μ M, 20 veces mayor que el complejo de cobre 3 y 11 veces mayor que el complejo 4 (Gu *et al.*, 2018). Estos resultados resaltan la importancia de la actividad de estos compuestos de Cu.

Por otro lado, la modificación de la estructura de un compuesto puede cambiar la absorción, la duración del efecto, la toxicidad, solubilidad, entre otros beneficios potenciales (Deng *et al.*, 2018). Este efecto es muy notable en entre estos complejos de cobre, donde la adición de grupos metilos, aumenta la toxicidad así como los efectos pro-apoptóticos sobre las células tumorales

Estos resultados son muy importantes ya que estos complejos de Cu testeados en esta tesis demuestran tener un perfil de actividad antitumoral más eficaz en las líneas celulares de cáncer colorrectal que la droga de referencia utilizada actualmente en la clínica.

Compuestos simples de cobre tienen baja toxicidad en comparación con otros metales de transición. La toxicidad de los compuestos está conectada con los ligandos orgánicos con los cuales el metal coordina, las cuales son propiedades requeridas para los agentes terapéuticos. Adicionalmente, muchos complejos metálicos usados como agentes bioactivos son escasamente solubles en agua, lo cual limita sus aplicaciones en estos

sistemas. La combinación de las sales metálicas, ligandos orgánicos y contraiones puede resultar en un amplio espectro de actividad biológica y una buena solubilidad en agua. Entre los ligandos donantes de N relevantes para producir compuestos metálicos bioactivos, las polipiridinas representan una buena elección debido a que presentan una amplia variedad de funciones biológicas. Los ligandos N,N aromáticos como la 2,9-dimetil-1,10-fenantrolina, son objeto de investigación debido a su acción en diversos sistemas biológicos (Śliwa *et al.*, 2020).

La hipótesis planteada en este trabajo de tesis Doctoral propone que la complejación de un metal con un ligando puede aumentar la actividad de los compuestos o bien adquirir nuevos mecanismos de acción. Esto quedó demostrado al tratar las células tumorales de mama (MDA-MB-231 y MCF-7) con una sal de cobre, CuCl_2 , resultando valores de IC_{50} mayor a $100 \mu\text{M}$ (Balsa *et al.*, 2020). Otros grupos de investigación trataron las células de la línea HT-29 y Caco-2 con CuSO_4 , para evaluar la citotoxicidad del metal, obteniendo resultados de IC_{50} mayor a $200 \mu\text{M}$ y $161.45 \mu\text{M}$ respectivamente (Ude *et al.*, 2017) (Xiao *et al.*, 2016). Cai y colaboradores estudiaron el efecto citotóxico de un complejo de cobre con fenantrolina, sobre células tumorales de hígado, Bel-7402. El valor de IC_{50} obtenido fue de $20 \mu\text{M}$ para el complejo, en cuanto al cobre, no se observó disminución de la viabilidad en el rango de concentración usado, de 20 a $150 \mu\text{M}$ (Cai *et al.*, 2007). Asimismo, los efectos benéficos de la complejación fueron demostrados por un complejo de cobre con 6-metoxiquinolina, sintetizado por Cadavid Vargas y colaboradores. Obtuvieron un efecto citotóxico deseable sobre la línea celular A549, con un IC_{50} de $57.9 \mu\text{M}$. Por el contrario no se produjo efecto alguno, cuando las células de la línea tumoral fueron tratados con el ligando libre y sus sales metálicas, con valores mayores a $100 \mu\text{M}$ (J. F. Cadavid-Vargas *et al.*, 2019). Cabe mencionar que el uso combinado del ligando 1,10 fenantrolina, un quelante bivalente, con diferentes iones metálicos ha aumentado su acción debido a una gran toxicidad frente a células tumorales (Alves *et al.*, 2019). Estudios recientes han demostrado, que complejos metálicos que usan como ligando 1,10 fenantrolina, tienen potencial como antiproliferativo, e incluso mantienen esta actividad cuando no están coordinados con el centro metálico. Sin embargo, como antes se mencionó, al complejar el metal con el ligando aumenta su actividad, lo que quedó demostrado, al encontrar en la literatura

valores de IC₅₀ elevados para los ligandos. Por ejemplo los valores de IC₅₀ reportados por Sliwa y colaboradores, para el ligando dimetilfenantrolina, para la línea celular HeLa fue de 720 μM y para la línea LoVo (línea celular de cáncer de colon) fue de 360 μM (Śliwa *et al.*, 2020). Otra evidencia, fue reportada por el grupo de Porchia, que reporto para el ligando phen un IC₅₀ de 68.31 μM y de 61.8 μM para las líneas tumorales HeLa y SMMC-7221, líneas celulares de hepatocarcinomas, y al ser complejados con Zn los valores de IC₅₀, disminuyeron sus valores de entre 10 μM y 44 μM, dependiendo de los sustituyentes (Porchia *et al.*, 2020). Estos resultados están en concordancia a los obtenidos, demostrando que la complejación del metal con el ligando, en este caso cobre con fenantrolina o dimetilfenantrolina, juega un rol clave en la citotoxicidad impartida por los complejos metálicos.

Deng y colaboradores, diseñaron 5 compuestos de cobre, con tiosemicarbazona como ligando, a los cuales le adicionaron diferentes modificaciones, entre ellos 2 grupos metilos. De esta manera lograron incrementar más de 14 veces la actividad del complejo contra células tumorales (Deng *et al.*, 2018). Otros complejos reportados de cobre con fenantrolina como ligando, como [Cu(phen)(aa)(H₂O)]NO₃, varia su actividad de acuerdo con el aminoácido sustituyente, encontrando valores de IC₅₀, entre 6.2 y 8.5 μM en la línea celular MDA-MB-231. Cabe destacar que los complejos con aminoácidos metilados, presentan valores de IC₅₀ más bajos (Ng *et al.*, 2014). Estos resultados se ajustan a los obtenidos con los complejos de cobre 3 y 4, ya que el complejo 3, el cual tiene los grupos metilos, es más activo contra las células tumorales, demostrando que el efecto de un compuesto mejora mediante la modificación de su estructura. Resulta interesante comparar la actividad de los complejos 3 y 4 con otros complejos de cobre descritos en la literatura. Compuestos de cobre con bases de Schiff como [Cu₂(sal-D,L-glu)₂(isoquinoline)₂·2EtOH, [Cu(sal-5-met-L-glu)(H₂O)]·H₂O, [Cu(EtOH)₂(imidazole)₄], and [Cu₂(sal-D,L-glu)₂(imidazole)₂], mostraron efectos citotóxicos débiles, con valores de IC₅₀, mayores a 100 μM sobre la línea tumoral A549. Otros complejos de Cu(II) con guanidina y como ligando grupos aromáticos o alifáticos, fueron citotóxicos para MCF7 y A549 pero en dosis mayores, 61.1 y 370 μM respectivamente (Śliwa *et al.*, 2020). Para agregar, Ganeshpandian y colaboradores, reportaron la actividad citotóxica de complejos de Cu(II) con dimetil fenantrolina, [Cu(L)(dmphen)][ClO₄]₂ (L = sustituto

derivado de aminas), sobre la línea celular de mama MCF-7. Los resultados que obtuvieron, fueron en el rango de entre 16.7 y 22.1 μM , valores más altos comparados con los obtenidos para los complejos 3 y 4 (Ganeshpandian *et al.*, 2014). En función de estos estudios, se puede decir que los compuestos de cobre estudiados en esta tesis, parecen ser potenciales agentes antitumorales, debido a los valores de IC_{50} obtenidos.

4.1.2 Efecto sobre la migración celular. Ensayo de la herida y Zimografía.

Luego se evaluó los efectos de los complejos 3 y 4 sobre la migración celular mediante el ensayo de la herida en un panel de líneas celulares tumorales, MG-63, A549, MDA-MB-231, MCF-7 y HT-29. En la figura 4.1.2.1, podemos observar que el porcentaje de cierre de la herida a lo largo de un área definida representa la habilidad migratoria de las células luego del tratamiento con los complejos de cobre.

Como puede observarse a partir de la figura 4.1.2.1, el complejo 3 produjo una mayor inhibición del proceso de migración en las 4 líneas celulares evaluadas. En la línea derivada de osteosarcoma (A), a la concentración de 1 μM se observa que hay una diferencia significativa en la inhibición de la migración con el control y entre ambos complejos ($p < 0.05$). Con el complejo 3, se vio una inhibición aproximadamente del 90%, y con el complejo 4 esta inhibición fue del 22%, con respecto al control ($p < 0.05$).

En la línea celular A549 (B), el proceso de migración se vio afectado a la concentración de 1.5 μM con el complejo 3, donde se observó una inhibición significativa de la migración, casi total (98%), con respecto al control ($p < 0.05$). Por el contrario, con el complejo 4 el porcentaje de inhibición de este proceso fue del 36% aproximadamente, con respecto al control ($p < 0.05$).

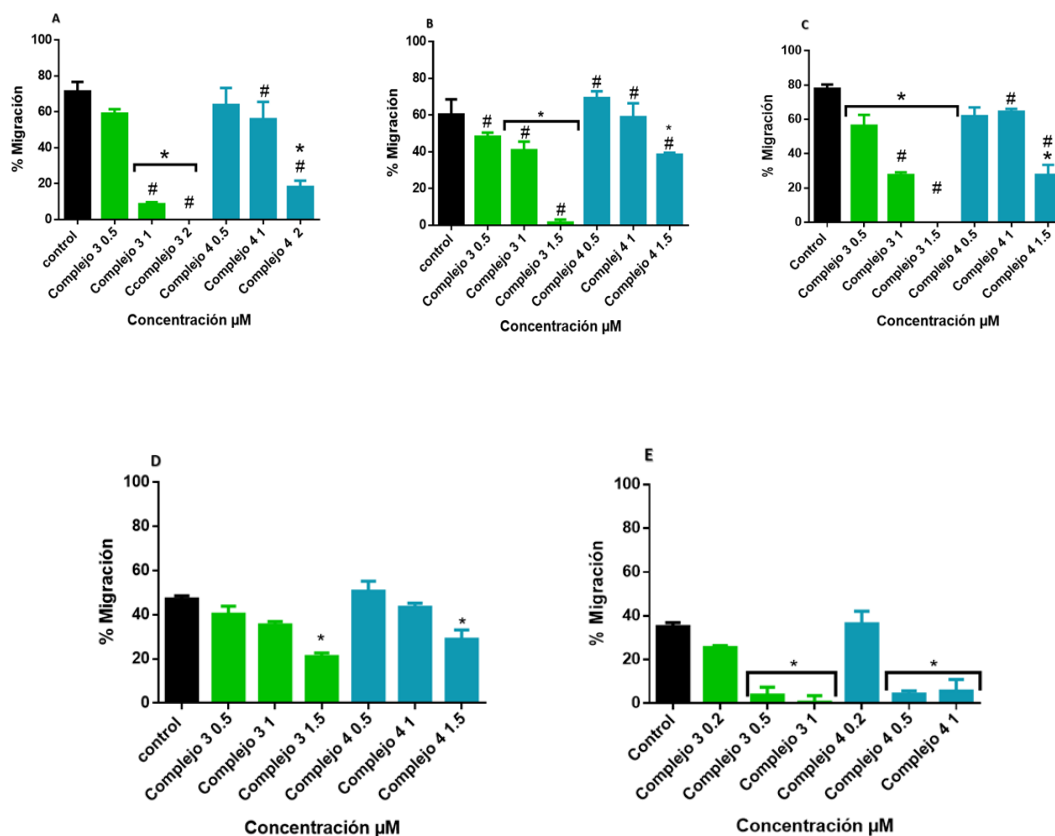
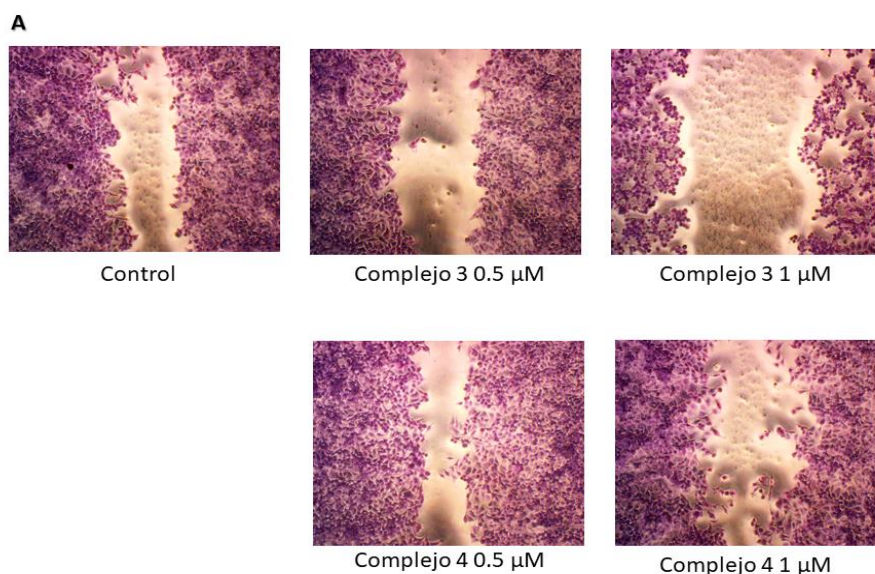


Figura 4.1.2.1: Ensayo de la herida en 5 líneas tumorales, luego de un tratamiento por 24 hrs. A: MG-63, B: A549, C: MDA-MB-231, D: MCF-7, E: HT-29. Los resultados se expresan como la media \pm SEM (n=3). *Diferencia significativa entre control y los complejos. # Diferencia significativa entre complejos 3 y 4.

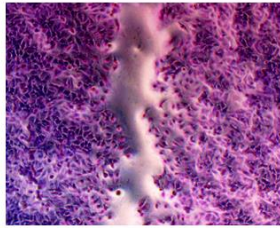
Con respecto a las líneas derivada de mama, MDA-MB-231 (C), es una línea altamente invasiva a comparación de la línea MCF-7 (D). Los efectos de la inhibición de la migración en la línea MDA-MB-231, se produjeron cuando las mismas, fueron tratadas con 1 μM del complejo 3, donde se produjo una inhibición de la migración celular del 70% aproximadamente ($p < 0.05$). A 1.5 μM , no se evidencio cierre de la herida realizada sobre la monocapa celular. Con la mayor concentración del complejo 4, 1.5 μM , se promovió solo un 30% de migración celular aproximadamente. No ocurre lo mismo en la línea MCF7, donde el mayor efecto se advierte a partir de 1.5 μM del complejo 3, la herida cierra aproximadamente un 50% con respecto al control ($p < 0.05$). Con el complejo 4, el efecto sobre la migración no es diferente significativamente con respecto a los producidos por el complejo 3.

En la línea HT-29 (E), derivada de cáncer colorrectal, el proceso de migración se ve afectado a partir de 0.5 μM , donde no se observan diferencia significativa entre los complejos, produciendo un efecto similar en el proceso. A la concentración de 0.5 μM del complejo 3, se produjo una disminución de la migración de aproximadamente el 90% y a 1 μM fue del 98%. Con el complejo 4, la inhibición del proceso de migración fue del 85 y 88% respectivamente.

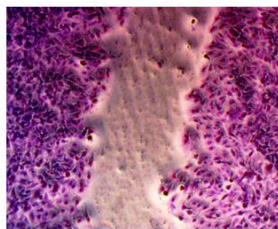
El efecto sobre la migración celular puede observarse a sí mismo en las fotografías (figura 4.1.2.2), tomadas luego del tratamiento con los complejos. En todas ellas se puede observar el efecto diferencial entre los complejos, observándose en todos los casos la mayor efectividad del complejo 3. Puede observarse, además una gran diferencia en las líneas tumorales de mama, ya que MDA-MB-231 es más invasiva que la línea tumoral MCF-7, por ende el efecto sobre la inhibición de la migración es mayor en la primera.



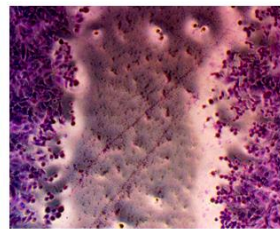
B



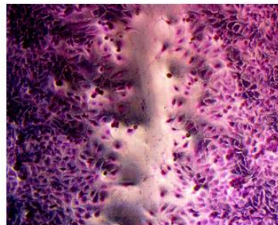
Control



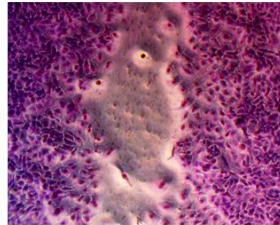
Complejo 3 1 μ M



Complejo 3 1.5 μ M

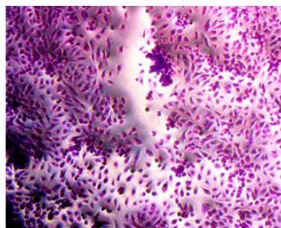


Complejo 4 1 μ M

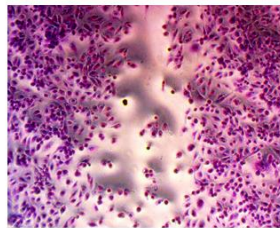


Complejo 4 1.5 μ M

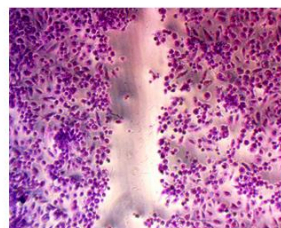
C



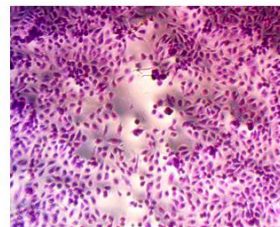
Control



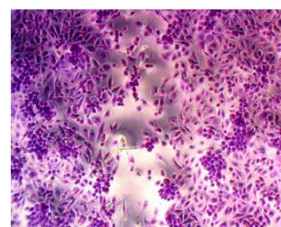
Complejo 3 0.5 μ M



Complejo 3 1 μ M

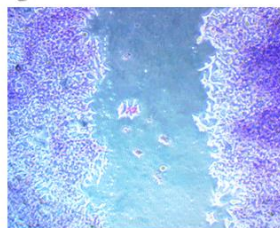


Complejo 4 0.5 μ M

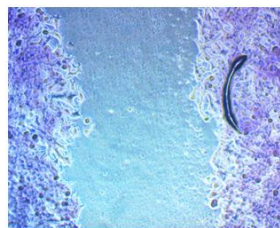


Complejo 4 1 μ M

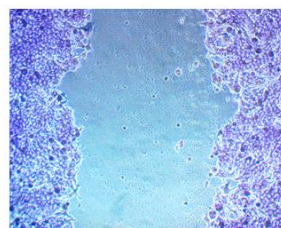
D



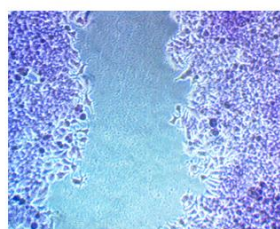
Control



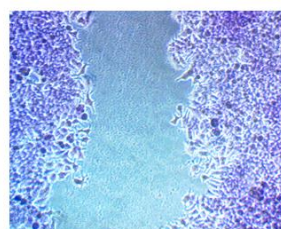
Complejo 3 0.5 μ M



Complejo 3 1 μ M



Complejo 4 0.5 μ M



Complejo 4 1 μ M

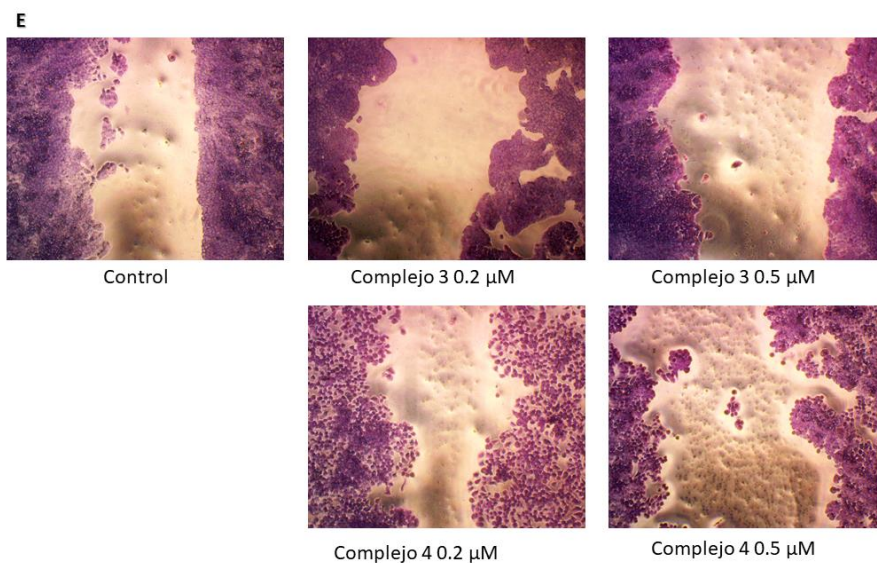


Figura 4.1.2.2. Fotografías del ensayo de la herida, de las 5 líneas celulares testeadas. A: MG-63, B: A549, C: MDA-MB-231, D: MCF-7, E: HT29. Las mismas fueron tomadas con el objetivo 40x.

Otro de los efectos estudiados, es la inhibición de las metaloproteinasas, mediante el ensayo de zimografía. Las metaloproteinasas son enzimas que tienen activa participación en el proceso de metástasis, ya que actúan degradando el colágeno y otras macromoléculas de la matriz extracelular, para permitir la migración y la invasión de las células tumorales. La expresión de MMPs, como MMP-2 (gelatinasa A) y MMP-9 (gelatinasa B), están relacionadas con una mayor invasión tumoral, en sistemas *in vitro* e *in vivo* (Lin *et al.*, 2000). Este ensayo se llevó a cabo sobre la línea derivada de cáncer colorrectal, HT-29.

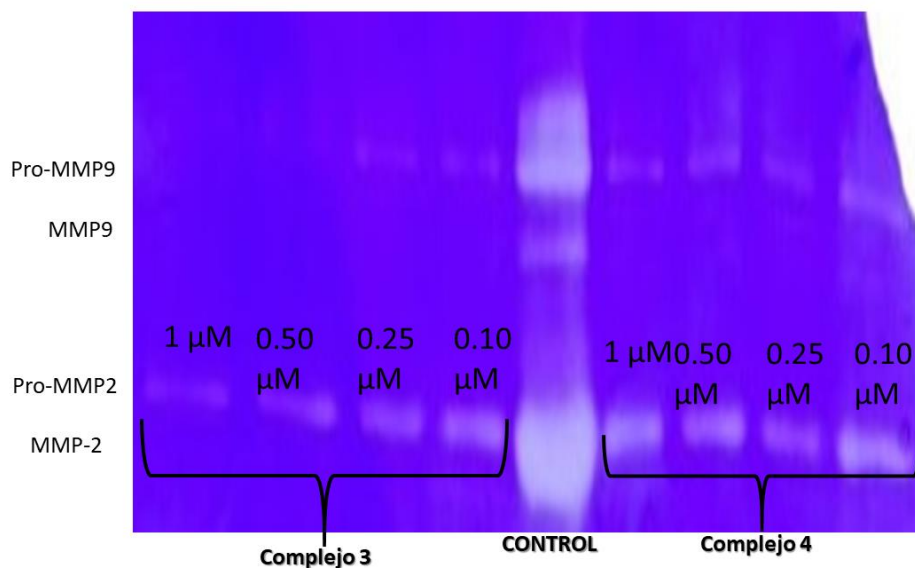


Figura 4.1.2.3: Ensayo de zimografía, línea HT-29. Las bandas claras denotan la acción gelinolítica de las metaloproteinasas MMP9 y MMP2.

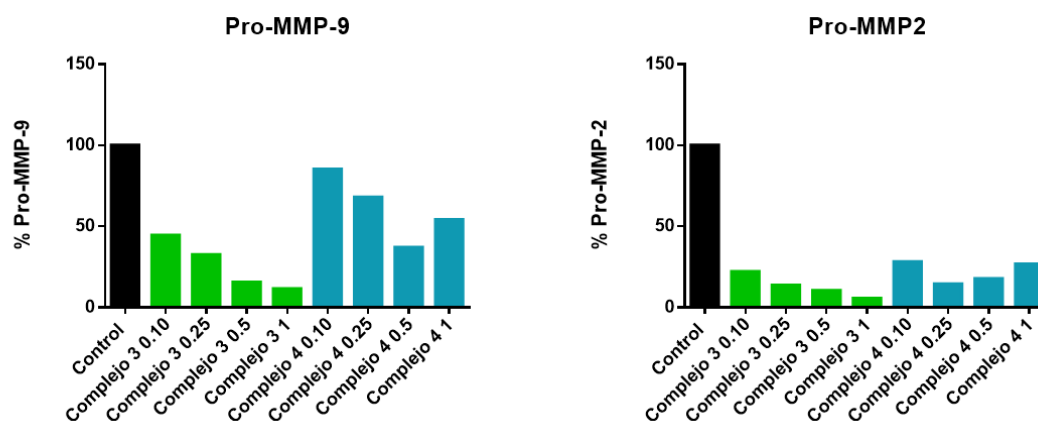


Figura 4.1.2.4. Gráfico de barras que representan el porcentaje de activación de las Pro-MMP9 y Pro-MMP2, en la línea celular HT-29.

La figura 4.1.2.3, corresponde a la fotografía de un gel de acrilamida/bisacrilamida, con gelatina al 1%, luego de realizada la electroforesis, y en la figura 4.1.2.4 la intensidad de las bandas está representada mediante un gráfico de barras. En el gel se sembró el sobrenadante de la línea celular HT-29, luego que fueran tratadas por 24 hrs con ambos complejos, usando concentraciones entre 0.10 a 1 μM. Se puede observar en dicho gel, la inhibición de la Pro- MMP9 impartida por el complejo 3. A partir de 0.1 μM, se puede observar como disminuye la intensidad de la banda con respecto al control,

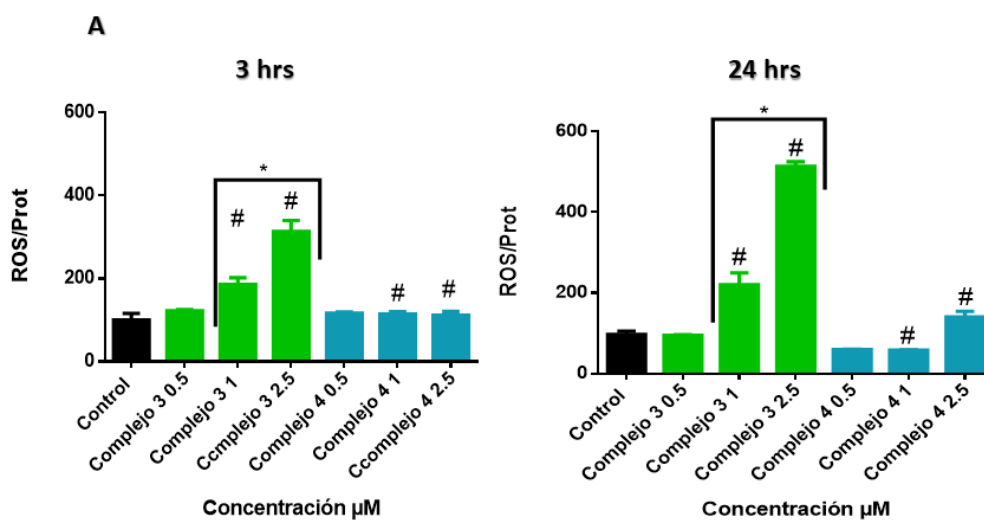
concentración a la cual se produce una inhibición mayor al 50%. A 0.5 y 1 μM , la intensidad de las bandas se hace casi imperceptibles, donde generó una inhibición del 85 y 88% de la enzima respectivamente. En las bandas que corresponden a Pro-MMP2, se puede apreciar que la intensidad de las mismas disminuye a medida que aumenta la concentración, siendo de menor intensidad a 1 μM , donde se produjo una inhibición del 95% aproximadamente. El tratamiento con el complejo 4, disminuye la intensidad de la banda que corresponde a Pro-MMP9, con respecto al control, pero la disminución no es tal como se observa con el complejo 3. La máxima concentración de este complejo inhibió a la enzima un 46% aproximadamente. En las bandas que corresponden a Pro-MMP2, se observa una disminución con respecto al control, en el rango de concentraciones empleadas, se generó una disminución de entre el 72 y 86%. Además, se puede observar que luego del tratamiento con ambos complejos no se observan bandas que corresponde a MMP9 y a MMP2, las cuales sí pueden observarse en el control.

A partir de los resultados del ensayo de la herida y de la zimografía, se puede apreciar que el complejo 3 tiene mayor efecto en la inhibición del proceso metastásico, ya que tiene la capacidad de impedir la migración de las células tumorales así como la activación de enzimas claves para el proceso, como MMP9 y MMP2.

En este sentido, un complejo de cobre-tropolona, estudiado en el laboratorio, demostró tener actividad antimetastásica, conduciendo a resultados similares a los expuestos anteriormente. Este complejo produjo inhibición de la migración de las células tumorales de mama, MDA-MB-231 y MCF-7, así como también redujo la actividad de las metaloproteinasas (Balsa *et al.*, 2020). Asimismo, el grupo de Shi y colaboradores, reportaron una importante actividad antimetastásica sobre células de cáncer de ovario, de diferentes complejos de cobre con derivados de fenantrolina como ligando. Estos complejos disminuyen la migración celular, un 60% aproximadamente y además inhiben la expresión de la proteína MMP2. Cabe, además recalcar que la fenantrolina es un potente inhibidor de las MMPs (X. Shi *et al.*, 2018).

4.1.3 Estrés oxidativo.

Muchos tipos de células cancerígenas tienen un elevado nivel de estrés oxidativo. La modulación del estado redox de las células cancerígenas por agentes exógenos puede distorsionar la homeostasis celular, y producir la muerte celular. Se cree que la citotoxicidad impartida por los complejos de cobre(II) es dependiente de la generación de ERO (Shi *et al.*, 2018). Por lo tanto, uno de los mecanismos de acción estudiados fue la capacidad de los complejos 3 y 4 de generar especies reactivas del oxígeno en un panel de células tumorales, MG-63, A549, MDA-MB-231, MCF-7, CACO2, LS174T y HT-29. El mismo se evaluó mediante la oxidación de la sonda DHR-123, luego de un tratamiento por 24 h. Solo en el caso de la línea MG-63 se estudió a las 3 y a las 24 h con el objetivo de evaluar la dependencia con el tiempo. El rango de concentraciones usados fue entre 0.5 y 2.5 μM .



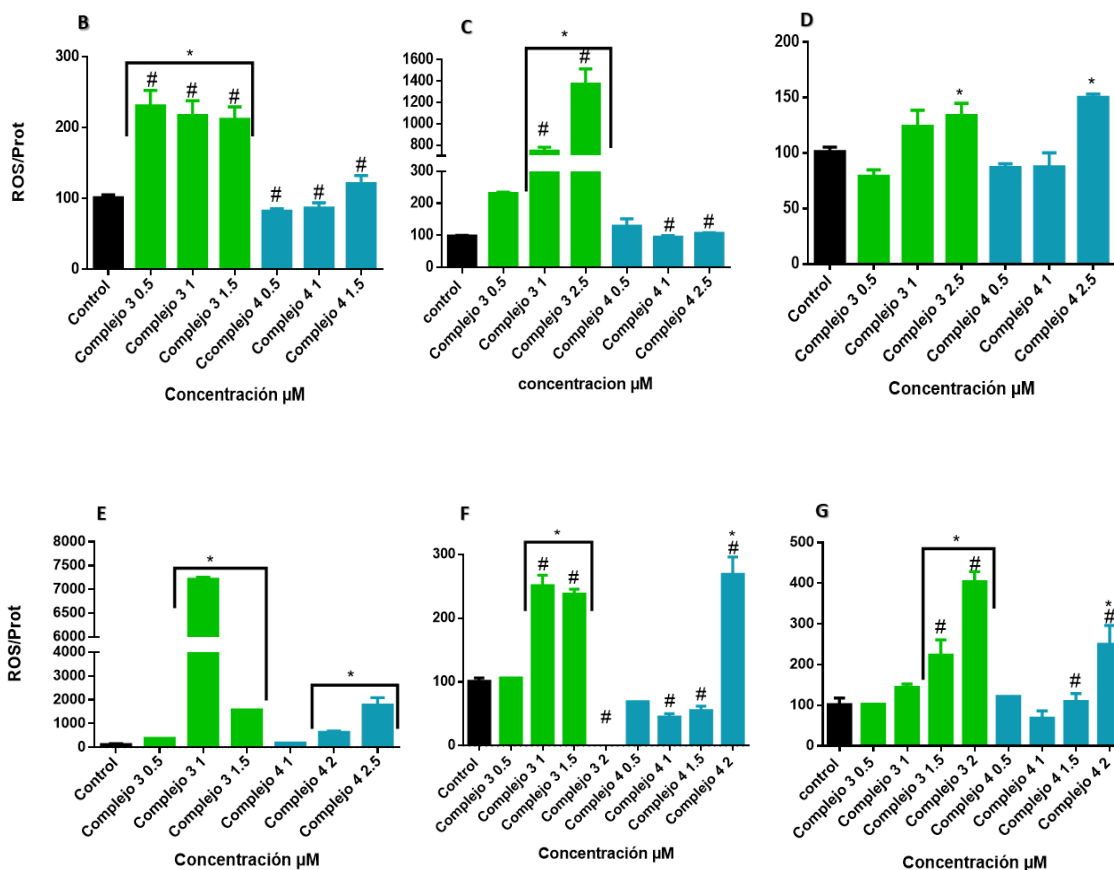


Figura 4.1.3.1: Producción de EROs, luego de un tratamiento de 24 h, excepto para la línea MG-63. A: MG-63 (izquierda 3 h, derecha 24 h), B: A549, C: MDA-MB-231, D: MCF-7, E: CACO2, F: LS174T, G: HT-29. Los resultados se expresan como la media \pm SEM ($n=3$). *Diferencia significativa con el control ($p<0.05$). #Diferencia significativa entre complejo 3 y 4 ($p<0.05$).

A partir del análisis de la figura 4.1.3.1, se puede percibir que el complejo 3 causa un marcado aumento en la producción de ERO. En la línea MG-63, representada en la figura 4.1.3.1 A, se puede observar que la producción de ERO aumenta en función de la concentración del complejo de cobre 3 ($p<0.05$). A 2.5 μ M (3 h), la producción es 2.5 veces mayor que a 0.5 μ M. Además, se observa una diferencia significativa en el rango de concentraciones usado con respecto al complejo 4 ($p<0.05$). Cabe destacar que el aumento del nivel de ERO, como consecuencia del tratamiento con el complejo 3, es también dependiente del tiempo. Luego de 24 h de tratamiento a 2.5 μ M, la cantidad de ERO aumenta aproximadamente el doble comparada con el tratamiento de 3 h. Sin embargo, con el complejo 4, a las 3 h de tratamiento no se observa aumento en la producción de ERO en el rango de concentraciones, y a las de 24 h a 2.5 μ M, se observa un aumento, no significativo estadísticamente, con respecto al control ($p<0.05$).

En la línea tumoral de pulmón (figura 4.1.3.1 B), la producción de ERO, bajo la acción del complejo 3, aumenta aproximadamente un 130% en el rango de concentraciones empleadas, comparado con el control ($p < 0.05$). No se observa una dependencia de la concentración. No ocurre lo mismo en el caso del complejo 4, donde no se observan diferencias significativas con el control ($p < 0.05$). A la concentración de $1.5 \mu\text{M}$ se observa un aumento en la producción de ERO de solo el 21%.

En las líneas derivadas de mama (figura 4.1.3.1 C y D), específicamente en la línea triple negativa, se observa una gran diferencia en el modo de acción entre los complejos. Con el complejo 3, la producción de especies reactivas del oxígeno sufre un gran incremento, y lo hace en función de la concentración ($p < 0.05$). A $1 \mu\text{M}$ este incremento es del 650% y a $2.5 \mu\text{M}$ es de 1250% aproximadamente con respecto al control. Lo contrario ocurre con el complejo 4, donde no se produce aumento alguno en la producción de ERO, manteniéndose invariable con respecto al aumento en la concentración. A $2.5 \mu\text{M}$ el acrecentamiento en la producción de ERO con el complejo 3 es 13 veces con respecto al complejo 4 ($p < 0.05$).

En la línea MCF-7, se produce un incremento en la producción de ERO cuando son tratadas con la máxima concentración del complejo 3 y 4, produciéndose un incremento de la producción de ERO del 38 y 40% respectivamente, estadísticamente significativo con respecto al control ($p < 0.05$).

El efecto sobre la producción de ERO en las líneas derivadas de cáncer colorrectal, fue similar, ya que el complejo 3 fue mayor inductor de estas especies (figura 4.1.3.1 E, F y G). El aumento de mayor significancia se observó en la línea celular CACO2, en la cual hubo un incremento de 6000% aproximadamente, cuando las células son tratadas con el complejo 3 a una concentración de $1 \mu\text{M}$. Luego hay una disminución de la producción de ERO, debido a una posible citotoxicidad, disminuyendo la viabilidad celular, y con el consecuente enmascaramiento de la producción de ERO. Con el complejo 4 hay un aumento dependiente de la concentración ($p < 0.05$). A $2.5 \mu\text{M}$, la concentración más alta usada, el porcentaje de incremento con respecto al control es de 1500% ($p < 0.05$). A 1

μM el aumento producido por el complejo 3 es 41 veces mayor con respecto al complejo 4.

En la línea tumoral LS174T se produce un incremento de las especies reactivas del oxígeno, pero no en la misma magnitud que en la línea recién mencionada. Bajo el tratamiento con el complejo 3, el aumento a 1 y 1.5 μM es similar, de un 240% aproximadamente con respecto al control. Cuando las células son tratadas con el complejo 4, no se logra el mismo efecto, no hay diferencias significativas con el control ($p < 0.05$). A la concentración de 2 μM del complejo 3, no se observa producción de EROs, lo cual podría estar asociado a una acción citotóxica del mismo, ya que a esta concentración se produce una disminución de la viabilidad del 80%. Por el contrario con el complejo 4, a esta concentración, hubo un incremento del doble con respecto a la condición basal ($p < 0.05$).

En la línea HT-29, el porcentaje de especies reactivas del oxígeno que se producen luego de 24 h de tratamiento con 1.5 y 2 μM del complejo 3, es del doble y el cuádruple, con respecto al control ($p < 0.05$). Al compararlo con el complejo 4, a 1.5 μM , no hay aumentos significativos, solo lo hay a 2 μM , cuyo incremento es un poco más del doble con respecto al control ($p < 0.05$).

Ensayos realizados por el grupo de investigación del Prof. Dr. Luis Lemus (Universidad de Santiago de Chile), pudieron determinar las especies reactivas del oxígeno que se producen con ambos complejos *in vitro*, en un modelo acelular. El reactivo ABTS es usado para detectar especies oxidantes como radicales y especies oxo-metálicas. Soluciones coloreadas de ABTS cambian a color verde cuando este reactivo es oxidado a un radical catiónico ABTS^+ que presenta bandas en el espectro visible. Cuando el complejo 3 y ABTS fueron combinados en una mezcla de agua-acetonitrilo inmediatamente cambiaron de color a verde oscuro debido a la formación de ABTS^+ . Por el contrario, con la adición del complejo 4 a la solución con ABTS y acetonitrilo no se produjo cantidades detectables de ABTS^+ . Esta reacción puede observarse en la figura 4.1.3.2. La confirmación de la formación de una radical OH, fue realizada mediante EPR. Estos resultados indican una pronunciada diferencia en la habilidad de los complejos de

cobre con dmp y phen en producir radicales hidroxilos. Los sustituyentes metilos en dmp hacen que la geometría alrededor del átomo de Cu(II) sea tetraédrico, requerido por el estado reducido del cobre, Cu(I), y este estado puede facilitar la transferencia de electrones al metal. Estos resultados no han sido publicados hasta el momento.

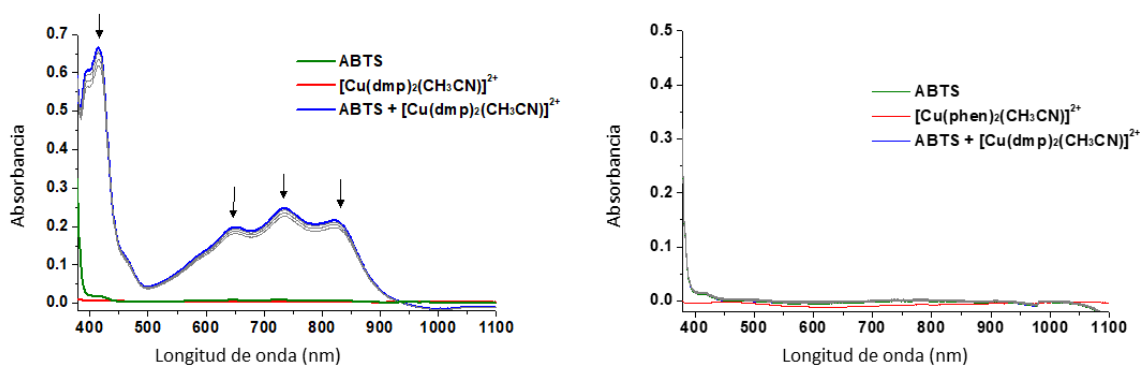


Figura 4.1.3.2. Espectro UV-Vis de la reacción entre $[\text{Cu}(\text{dmp})_2(\text{CH}_3\text{CN})]^{2+}$ (A) y $[\text{Cu}(\text{phen})_2(\text{CH}_3\text{CN})]^{2+}$ (B) con ABTS en una solución de acetonitrilo.

Drogas muy conocidas de uso clínico demostraron sus efectos citotóxicos por medio de la generación de ERO. Entre ellas, oxaliplatino y CisPt inducen de una manera dosis dependiente, el aumento de los niveles intracelulares de O_2^- y H_2O_2 . Cuando se agrega SOD (genera H_2O_2 a partir de O_2^-) luego de la administración de oxaliplatino, aumenta la actividad antiproliferativa y citotóxica de la droga. Por el contrario, NAC (N-acetilcisteína) anula el efecto del oxaliplatino por disminución de los niveles de H_2O_2 , debido a que la actividad de NAC compensa la depleción intracelular de GSH inducida por el oxaliplatino (Nicco *et al.*, 2005). Por otro lado, otra droga de uso en la clínica, como el paclitaxel, genera daños citotóxicos debido a la sobreproducción de ERO y daños mitocondriales. La asociación de Paclitaxel con SOD resulta en un marcado aumento de la citotoxicidad, y con NAC, estos efectos citotóxicos disminuyen (Nicco *et al.*, 2005).

En la línea derivada de cáncer colorrectal, además de evaluar la influencia de las especies reactivas del oxígeno, se estudiaron dos procesos muy relacionados a este: la alteración del potencial de membrana mitocondrial y el estado del sistema GSH/GSSG.

Las mitocondrias, las cuales juegan un papel importante en el proceso de apoptosis, pueden liberar factores pro-apoptóticos como el citocromo C, entre otros. La disfuncionalidad de esta organela, se determina midiendo la alteración de la integridad de su membrana mediante la variación del PMM.

Para determinar los cambios en el potencial de membrana mitocondrial (PMM), las células fueron tratadas con ambos complejos de cobre, usando concentraciones de 0.25 a 1.5 μM , por un periodo de 24 h y se empleó la sonda fluorométrica DIOC6, usando citometría de flujo. En el caso en que se produzca un decaimiento del PMM, la sonda se libera de la mitocondria, y disminuye la fluorescencia. Los datos arrojados por el citómetro de flujo, están representados en la figura 4.1.3.3 a través de un gráfico de barras, y en la [figura 4](#) del anexo, se observan los histogramas obtenidos con los distintos tratamientos.

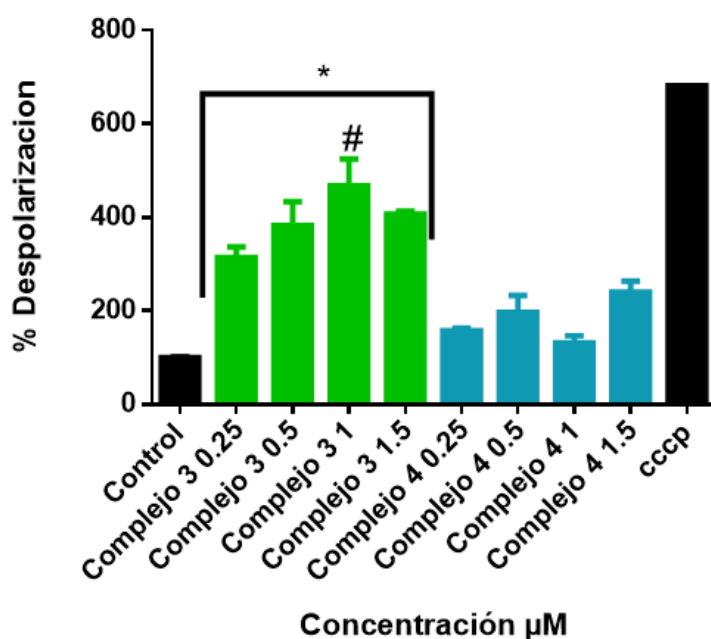


Figura 4.1.3.3. Porcentaje de despolarización de la membrana mitocondrial. Esta gráfica corresponde al tratamiento de la línea HT29 por los complejos de cobre, por 24 h. Los resultados se expresan como la media \pm SEM ($n=3$). *Diferencia significativa con el control ($p<0.05$). #Diferencia significativa entre complejo 3 y 4 ($p<0.05$).

A partir de estas gráficas, (4.1.3.3 y 4 del anexo), se puede observar que hay una alteración en la membrana mitocondrial, con la consecuente caída del potencial de membrana. Este efecto se ve incrementado luego del tratamiento con el complejo 3. A partir de $0.25 \mu\text{M}$, la proporción de células despolarizadas aumentan con respecto a la concentración, existiendo una diferencia significativa con respecto al control en todo el rango de concentraciones ($p < 0.05$). A $1 \mu\text{M}$, la proporción aumenta un 460% aproximadamente con el complejo 3, a diferencia del tratamiento con el complejo 4 donde el aumento es de solo el 130%. Es decir, el efecto del complejo 3 sobre el PMM es 3.5 veces mayor, que el complejo 4 a la misma concentración ($p < 0.05$). En los histogramas de frecuencia se puede observar un corrimiento del pico hacia la izquierda, indicando disminución de la fluorescencia, producto de la despolarización de la membrana mitocondrial. Este corrimiento es particularmente evidente en los histogramas correspondientes al complejo 3, los cuales son muy diferente de los obtenidos por el tratamiento con complejo 4 en todo el rango de concentraciones.

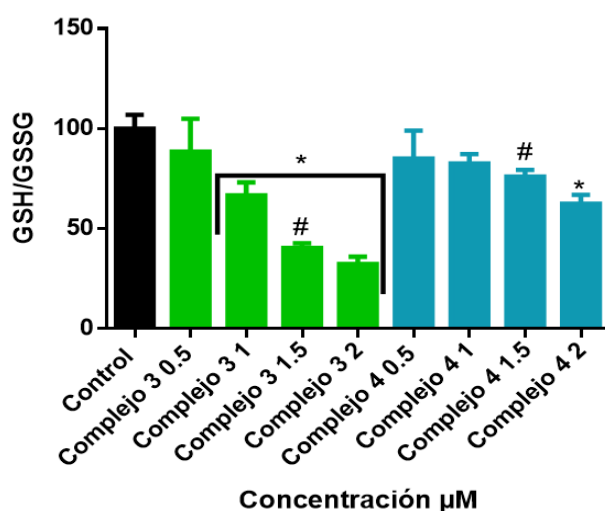


Figura 4.1.3.4. Radio GSH/GSSG, determinado en la línea celular HT29. Tratamiento por 24 h. Los resultados se expresan como la media \pm SEM ($n=3$). *Diferencia significativa con el control ($p < 0.05$). #Diferencia significativa entre complejo 3 y 4 ($p < 0.05$).

Por otro lado, las células tumorales de la línea HT-29, fueron tratadas por un lapso de 24 h con los complejos de cobre 3 y 4, para determinar el estado del sistema redox GSH/GSSG. Se trataron las células con OPT y NEM, y luego se realizaron las medidas mediante fluorescencia. A partir de los datos presentados en la figura 4.1.3.4, se puede

analizar que se produce una alteración del sistema GSH/GSSG a favor de la forma oxidada, y ésta es mayor con el complejo 3. Luego del tratamiento con el complejo 3, hay una marcada caída del sistema oxidante, estadísticamente significativa, desde 1 μM , alcanzando una disminución del 70% aproximadamente a 2 μM ($p < 0.05$). No así con el complejo 4, donde el porcentaje de disminución GSH/GSSG a la mayor concentración es del 42% con respecto al control ($p < 0.05$). Además, se puede observar una diferencia significativa a 1.5 μM entre ambos complejos ($p < 0.05$), donde el porcentaje de descenso es del 60% para el complejo 3 y del 24% para el complejo 4. Estos resultados son acordes a la producción de ERO en la línea celular estudiada, observándose el máximo porcentaje de ROS a 2 μM luego del tratamiento con el complejo de cobre 3 y una brusca caída del sistema antioxidante, con la consecuente disminución de la viabilidad en un 62%.

La producción de ERO está significativamente aumentada en las células cancerígenas, debido a una disfuncionalidad en la mitocondria, a un metabolismo alterado, y frecuentes mutaciones genéticas, resultando en una acumulación de proteínas, lípidos y ADN oxidados. Como respuesta adaptativa a esta situación, las células cancerígenas aumentan los niveles de *scavengers*, un sistema enzimático o no enzimático que pueden regular la acumulación de ERO. En la respuesta enzimática, se produce un aumento principalmente de catalasa y superóxido dismutasa (SOD), y en menor cantidad de tiorredoxinas, peroxirredoxinas, entre otras. El GSH es un antioxidante no enzimático, el mismo actúa como *scavenger* y detoxificante celular. Bajo condiciones fisiológicas, GSH reducido está presente en mayor cantidad que la especie oxidada, GSSG. Pero en condiciones de estrés el GSH es convertido en GSSG por peroxidases luego de su reacción con las especies reactivas del oxígeno. Más del 10% del GSH sintetizado se encuentra en la mitocondria, donde reacciona con estas especies y previene la apoptosis. En varias patologías, como desórdenes neurodegenerativos, cáncer, diabetes, entre otras, la homeóstasis del sistema GSH se encuentra alterada (Bansal & Celeste Simon, 2018) (Nicco *et al.*, 2005).

Particularmente en cáncer, niveles elevados de GSH protegen a las células cancerígenas de la médula ósea, de la mama, colon y pulmón, confiriendo resistencia al tratamiento quimioterápico. Moderados niveles de ERO activan varias vías de señalización, que

finalmente contribuyen a la supervivencia y migración de las células tumorales. La acumulación excesiva de ERO, y la falla en el sistema *scavenger*, resulta en daños en las biomoléculas, con la consecuente muerte celular. Por lo tanto, las células tumorales, necesitan mantener un balance del sistema antioxidante para sobrevivir. Investigaciones pasadas, descubrieron, por ejemplo, que elevados niveles de GSH promueven el proceso de metástasis en melanoma y cáncer de hígado. Además, está altamente correlacionado con pacientes que sufren recaídas luego de una cirugía de eliminación del tumor primario (Bansal & Celeste Simon, 2018).

Muchas drogas que reducen los niveles de GSH están siendo actualmente usadas en ensayos clínicos para mejorar la eficacia de otras drogas, por ejemplo, el disulfiram induce apoptosis en las células tumorales de melanoma por cambio de la relación GSH/GSSG a favor del estado oxidado (Bansal & Celeste Simon, 2018).

Por otro lado, está establecido que los complejos de cobre, aumentan los niveles de ERO causando citotoxicidad en las células tumorales. El cobre es un metal activo en las reacciones redox, puede incrementar los niveles de ERO, con el consecuente daño en las biomoléculas (Denoyer *et al.*, 2015). Así lo demuestran, complejos de cobre con 6-metoxiquinolina, los cuales producen un aumento de 10 veces comparado con el control basal, en los niveles de EROs en la línea tumoral de pulmón A549 (J. F. Cadavid-Vargas *et al.*, 2019). Otro compuesto con actividad promisorio, denominado Elesclomol, es un ionosforo, que forma un complejo con el Cu^{2+} , lo transporta al interior de la mitocondria, donde es reducido a Cu^+ , generando estrés oxidativo y en consecuencia la muerte celular (Denoyer *et al.*, 2015).

Estos resultados evidencian que agentes externos pueden alterar la homeostasis de las células, debido al incremento de las especies reactivas del oxígeno y producir la muerte celular.

4.1.4 Ensayo genotóxico. Ensayo cometa.

La exposición del ADN a especies reactivas del oxígeno, especialmente al radical hidroxilo, causan ruptura de simple y doble hebra, modificación de las bases, entre otros, lo que induce daños en el genoma y mutaciones (Cai *et al.*, 2007).

Por esta razón se estudió la capacidad de los compuestos de actuar como agente genotóxico y el papel de las especies reactivas del oxígeno en el daño a esta macromolécula. Para este fin se llevó a cabo el ensayo cometa estándar y su versión modificada con la enzima endonucleasa III. Esta enzima actúa como una glicosilasa que reconoce varias pirimidinas oxidadas eliminándolas del ADN y generando sitios apirimidínicos (sitios AP), que son transformados en roturas cuando el ADN es sometido a pH alcalino. Así, se produce un incremento en las roturas del ADN después de una incubación con la enzima, que son reveladas durante la electroforesis del ensayo cometa, representando el nivel de daño por procesos oxidativos, dando una estimación cuantitativa del número de lesiones específicas presentes en las células (Collins, 2017).

Las células de la línea MG-63, MCF-7 y A549, fueron incubadas con los complejos de cobre por 24 hrs con concentraciones menores al IC₅₀ y luego se trató las células con la enzima endonucleasa III.

En la figura 4.1.4.1, se puede observar la formación de ruptura de ADN a partir de 0.50 μM , con el ensayo cometa estándar, en las tres líneas expuestas a la acción del complejo 3. Cuando las células, además son tratadas con la enzima Endo III, se observa la presencia de quiebres a partir de 0.25 μM , concentración en la cual se observa una diferencia significativa entre ambas condiciones experimentales ($p < 0.05$), con un aumento significativo en la proporción de daño con respecto al control ($p < 0.05$). De esta manera se hace evidente que los daños en el ADN, son producidos por las especies reactivas del oxígeno, ya a bajas concentraciones del complejo.

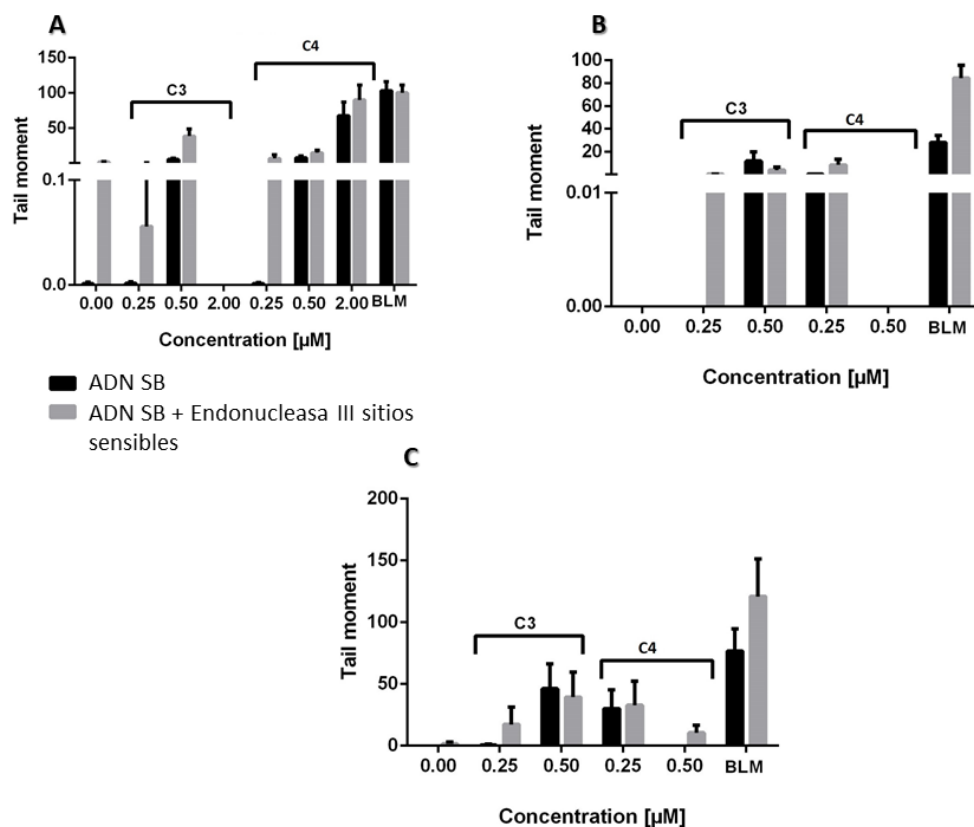


Figura 4.1.4.1. Ensayo cometa en las líneas A: MG-63, B: A549 y C: MCF7. Las barras representan el ensayo cometa estándar y el ensayo con la enzima Endonucleasa III. Los resultados se expresan como la media \pm SEM ($n=3$). *Diferencia significativa con el control ($p<0.05$). #Diferencia significativa entre complejo 3 y 4 ($p<0.05$).

A su vez cabe destacar, que cuando las líneas tumorales son tratadas con 0.5 μ M del complejo 3, se comportan de manera similar ante la presencia o ausencia de la enzima Endo III, obteniéndose valores de *tail moment* semejantes. En la línea MG-63 y MCF7 el daño genotóxico es similar, no así en la línea derivada de cáncer de pulmón, donde se aprecia un daño menor en la molécula de ADN. Específicamente en la línea MG-63 (A), a 2 μ M no se observan cometa debido a un efecto citotóxico del complejo.

Cuando las células de la línea MG-63 son tratadas con el complejo 4, se generan quiebres en la cadena de ADN, de manera dosis dependiente, cuando las células son tratadas sin la enzima. Por otro lado, a la concentración de 0.25 μ M se observan diferencias significativas entre los tratamientos con y sin Endo III ($p<0.05$), no así a 0.5 y 2 μ M.

En las otras dos líneas tumorales, A549 y MCF-7, no se observan diferencias significativas entre los tratamientos con y sin Endo III. A 0.25 μM , se generan cometas pero los quiebres en el ADN, parecer ser que no son causados por los ERO generados.

Hasta el momento, con los ensayos anteriores, se puede concluir que, específicamente el complejo de cobre con ligando de fenantrolina bisustituido con metilos (complejo 3), produce un gran incremento de las especies reactivas del oxígeno, una alteración del balance GSH/GSSG, a favor del GSSG y además produce alteración de la permeabilidad de la membrana mitocondrial. Todos estos resultados conducen a un estado pro-oxidante en la célula. El daño que genera esta condición se ve reflejada en la formación de quiebres en la cadena de ADN, que aumenta cuando son expuestas a la Endo III.

Las especies reactivas del oxígeno son reconocidas como mediadores de daño en el ADN. Las lesiones particularmente peligrosas en el ADN son las rupturas de doble hebra, las cuales son mutagénicas debido a un re-arreglo cromosómica erróneo o por la pérdida de información genética debido a errores en la reparación del ADN. Las especies reactivas del oxígeno, inducen otras formas de daño como la oxidación de nucleosidos, generando por ejemplo 8-oxo-guanina, lo que genera, en ocasiones rupturas de doble hebra. Ejemplos de estos efectos lo son quimioterápicos como doxorubicina y cisplatino, quienes incrementan los niveles de ERO, lo que contribuye a su genotoxicidad (Srinivas *et al.*, 2019). Por otro lado, varios complejos de cobre, inducen quiebres en la molécula de ADN, como consecuencia de un aumento en las especies reactivas del oxígeno. Cadavid Vargas y colaboradores, reportaron un complejo de cobre con 6-metoxiquinolina, y un complejo ternario de cobre con sacarina y glutamina. Ambos compuestos generaron daños en el ADN, en las líneas tumorales A549 y MG-63, como consecuencia directa de un incremento en la producción de EROs (J. Cadavid-Vargas *et al.*, 2016; J. F. Cadavid-Vargas *et al.*, 2019).

4.1.5 Alteración del ciclo celular e inducción de apoptosis.

La perturbación del ciclo celular por acción de los complejos de cobre, fue estudiado mediante el uso de Ioduro de Propidio como intercalante y utilizando un citómetro de

flujo. La línea celular CACO-2 fue expuesta a la acción de los complejos por un período de 24 hrs.

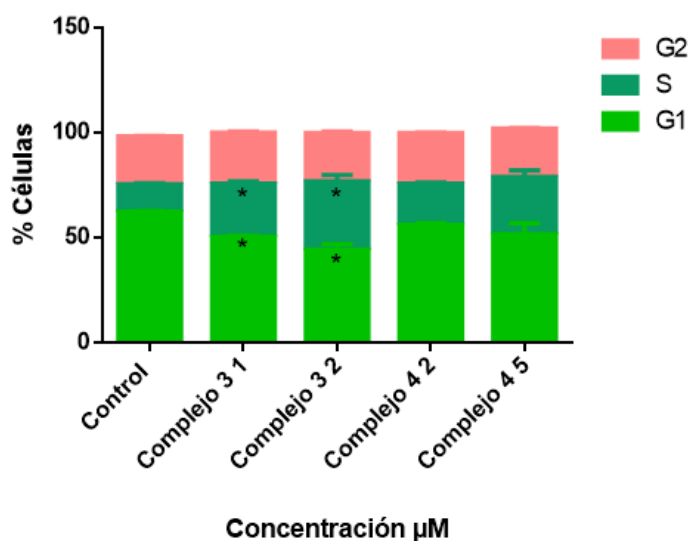


Figura 4.1.5.1. Análisis del ciclo celular en la línea CACO-2 luego del tratamiento con los complejos de cobre por 24 h, representado mediante gráfica de barras de cada una de las condiciones. Los resultados se expresan como el promedio \pm SEM ($n=3$). *Diferencia significativa con el control ($p<0.05$).

En la figura 4.1.5.1 ([figura 5](#) del anexo), se puede observar que bajo la acción del complejo 3, hay un arresto en la fase S. A 1 μM la población en dicha fase, aumenta casi el doble, con respecto al control ($p<0.05$), hay un aumento del 12% a un 25% aproximadamente al ser tratadas. Con respecto a las otras fases, el porcentaje de células en la fase G₁, sufre una disminución significativa con respecto al control, alrededor de un 12%, mientras la población en G₂ permanece casi estable. A medida que aumenta la concentración, el tamaño de la población en fase S aumenta un 19%, en tanto que las células en fase G₁ disminuyen con respecto al control ($p<0.05$).

El efecto observado por el complejo 4 es similar pero en menor medida. A la menor concentración, 2 μM , la población en fase S sufre un incremento del 7% y a 5 μM esta proporción aumenta alrededor de un 10%. Sin embargo, no se observan diferencias significativas con respecto al control ($p<0.05$). Con ninguna de las concentraciones se produjeron modificaciones en la fase G₂.

La replicación del ADN es una fase esencial en el ciclo celular, y es blanco molecular de una gran cantidad de moléculas, considerado el mayor *target* biológico para los agentes

anticancerígenos. La intercalación de moléculas en el ADN, puede ser aplicada para producir un arresto del ciclo celular y destruir las células tumorales, o en los tejidos, previniendo o inhibiendo la síntesis de ADN y la transcripción génica (Salehi *et al.*, 2017). Factores externos como la exposición a radiación, medicación o ERO resultan en daños en el ADN. Estas anomalías detienen la progresión de la replicación e inhiben la iniciación de nuevos orígenes de replicación hasta que el daño sea arreglado. Como la replicación tiene lugar durante la fase S, el daño en esta macromolécula es responsable del arresto celular en fase S, y en consecuencia la inhibición de la proliferación celular. Aun más, nuevos quimioterápicos desarrollados, tienen como estrategia la inhibición del crecimiento de células tumorales induciendo daño en el ADN, llevando al arresto del ciclo celular en fase S. Dicha fase es un evento crucial en el ciclo celular, ya que permite la replicación del ADN sin acumular anomalías genéticas. Algunas drogas inhiben el crecimiento de las células cancerígenas mediante el arresto de las mismas en fase S. Entre los que podemos nombrar se encuentra el hinokitiol y el xantohumol, quienes inhiben el crecimiento celular por arresto de las células en fase S en células de cáncer de colon y pulmón. Otras drogas lo son, PNT2258 induce el arresto en fase S de células de linfoma No Hodgkins (Preya *et al.*, 2017). Por otro lado, la inhibición de CHK1 (proteína que controla el ciclo celular) en las células cancerígenas previene el arresto del ciclo durante la fase S o G₂ y permite la proliferación de células a pesar de la acumulación de daños en el ADN (Otto & Sicinski, 2017). Estos resultados sugieren que los complejos de cobre 3 y 4, inducen daño en el ADN a través de estrés oxidativo, debido al incremento en los niveles de ROS lo que contribuye al arresto del ciclo celular en fase S de las células de cáncer colorrectal.

Para estudiar la naturaleza de la muerte celular producida por los complejos de cobre 3 y 4, se realizó una doble tinción con anexina V-FITC/IP, y los resultados fueron analizados por citometría de flujo. La figura 4.1.5.2 muestra los resultados obtenidos en las tres líneas celulares derivadas de colon, CACO2, LS174T y HT-29. Los dot plots se pueden observar en el anexo, [figura 6](#) y [7](#) para la línea celular CACO2, [figura 8](#) y [9](#) para la línea celular LS174T y la [figura 10](#) del anexo corresponde a la línea HT-29.

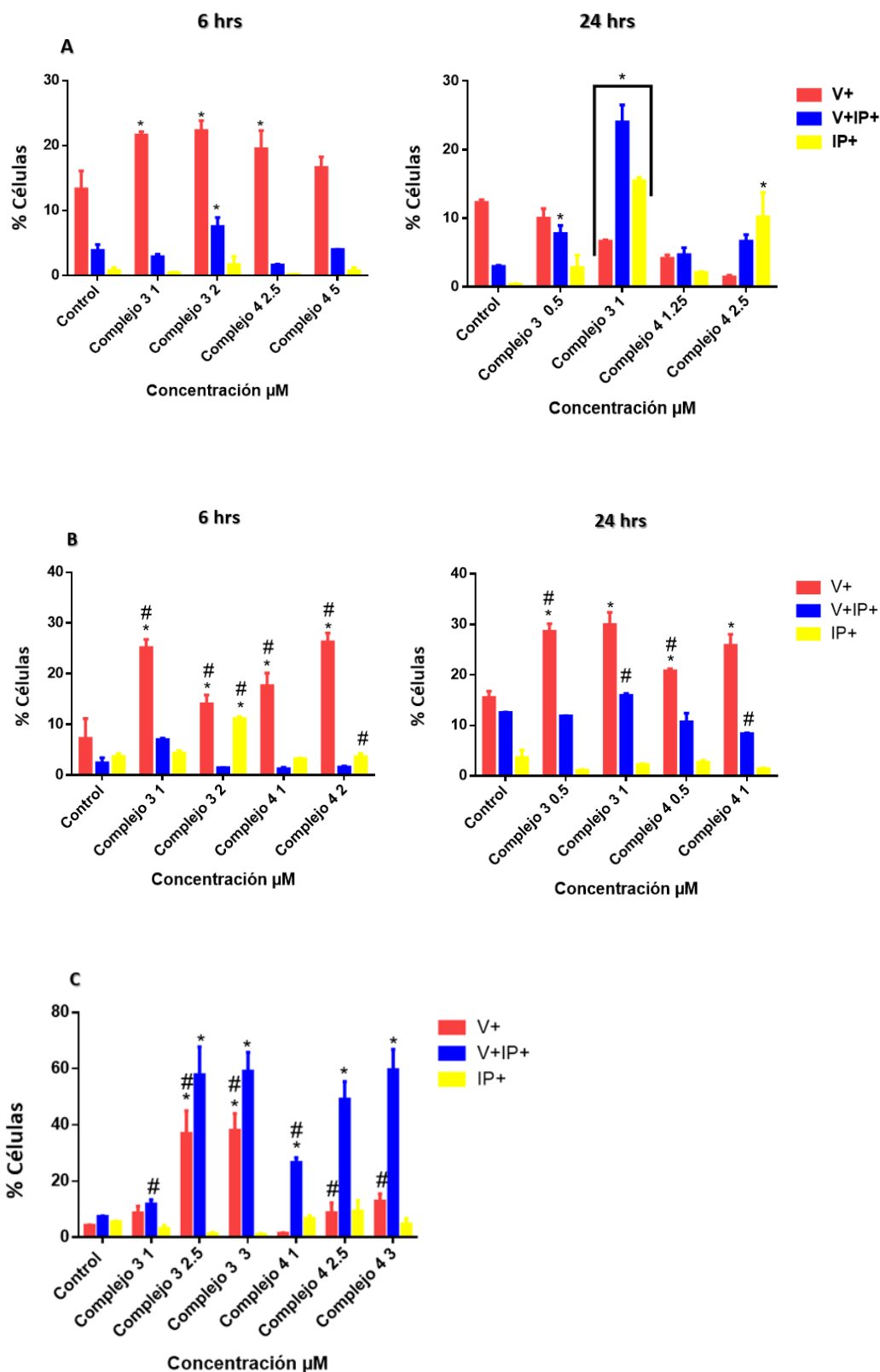


Figura 4.1.5.2. Análisis de los resultados de la doble tinción Anexina V/IP sobre A: CACO2 (6 y 24 h de exposición a los complejos), B: LS174T (6 y 24 h de exposición) y C: HT29 (24 h de exposición). Porcentaje celular en las distintas poblaciones, apoptosis temprana, tardía y necróticas. Los resultados se expresan como el promedio \pm SEM (n=3). *Diferencia significativa con el control ($p < 0.05$). #Diferencia significativa entre complejo 3 y 4 ($p < 0.05$).

El proceso de inducción de apoptosis, sobre la línea celular CACO2, se realizó a dos tiempos, a las 6 y a las 24 h. A partir de la figura 4.1.5.2 (A) se puede determinar que la inducción de apoptosis es dependiente del tiempo y la concentración ($p < 0.05$). A las 6 h, con el complejo 3 a la concentración de 1 y 2 μM , se observa un aumento significativo, del 62 y 67.4% de la población celular anexina V (+), respectivamente con respecto al control ($p < 0.05$), es decir hay un incremento de células en apoptosis temprana. A su vez a 2 μM , hay un incremento significativo, del 94% de la población V+IP+, es decir la población de células apoptóticas tardía, con respecto al control ($p < 0.05$), así mismo hay un pequeño aumento en la población IP (+). Con el complejo 4, hay un incremento significativo en el porcentaje de las poblaciones apoptóticas tempranas (44%) con respecto al control ($p < 0.05$). Pero el mismo ocurre a concentraciones más altas, 2.5 μM y no en la misma proporción. A 5 μM hay un pequeño incremento de la población V+ y V+/IP+.

A las 24 h, a dosis más bajas con el complejo 3, 0.5 y 1 μM , hay un claro aumento en las poblaciones V+IP+ e IP+ dependientes de la concentración ($p < 0.05$). A 0.5 μM , hay un marcado incremento en la población doble positiva, del 167% con respecto al control ($p < 0.05$). A la mayor concentración, la población de células apoptóticas tardías aumenta 8 veces y la población necrótica lo hace cerca de 15 veces con respecto al control, al mismo tiempo se produce una disminución estadísticamente significativa de las células con marca simple V+ ($p < 0.05$). Luego del tratamiento con el complejo 4, se observa que a 1.25 μM hay un pequeño aumento en la población doble positiva y a la concentración más elevada, 2.5 μM , hay un aumento de la proporción celular V+IP+ aproximadamente 3 veces, y la población IP+ sufre un aumento significativo de 10 veces con respecto a la población control ($p < 0.05$).

En la figura 4.1.5.2 B se presentan los datos obtenidos para la línea LS174T. Este experimento igualmente se realizó a dos tiempos diferentes a las 6 y a las 24 h y con 2 concentraciones diferentes para cada periodo. Se puede observar un comportamiento similar a las células de la línea CACO2, es decir, el aumento de las poblaciones apoptóticas es dependiente de la concentración y del tiempo. Con el complejo 3 a las 6 hrs, a 1 μM hay un marcado incremento de la población V+ (247%) con respecto al basal

($p < 0.05$). Al aumentar al doble la concentración, se produce una disminución significativa (153%) de la población celular en apoptosis temprana con respecto a la concentración anterior, y un aumento de células necróticas IP+ (208%) con respecto al control ($p < 0.05$). Con el complejo 4, con ambas concentraciones hay un aumento solo de la población apoptótica temprana. A 1 μM el aumento es del 143%, casi la mitad del aumento que se produce con el complejo 3 a la misma concentración, diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$). A 2 μM , el incremento es de 262% con respecto al basal ($p < 0.05$), sin producirse modificación alguna en las otras poblaciones. La proporción de células IP+ tratada con el complejo 3 a 2 μM (203%) es significativamente mayor que la tratada con el complejo 4 a la misma concentración, donde no se observa un aumento con respecto al control ($p < 0.05$).

A 24 h, con la menor concentración de tratamiento del complejo 3, 0.5 μM , hay un aumento significativo de la población apoptótica temprana, aproximadamente un 84% con respecto al basal ($p < 0.05$). A 1 μM esta población (V+) se mantiene en la misma proporción aproximadamente (93%) con respecto a la concentración anterior, y se observa un incremento del 26% de la población apoptótica tardía. Con el complejo 4 a 0.5 μM hay un 34% más de células en apoptosis temprana con respecto al control ($p < 0.05$). Pero este incremento es significativamente menor en comparación con el complejo 3 a la misma concentración ($p < 0.05$). A 1 μM hay un incremento significativo de la población V+, un 66.7%, comparada con el estado basal ($p < 0.05$), y no se observan cambios en la población de células en apoptosis tardía o en la población necróticas. La proporción de células en apoptosis tardía entre los complejos 3 y 4 a 1 μM , es significativamente diferente ($p < 0.05$).

La evaluación de la inducción de apoptosis en la línea celular HT-29, fue evaluada solo a 24 h. El rango de concentraciones usadas fue entre 1 y 3 μM para ambos complejos. Con el complejo 3 esta muerte celular se ve incrementada a partir de 1 μM , donde hay un aumento en las poblaciones V+ (100%) y V+IP+ (59%). A 2.5 μM , se produce un incremento estadísticamente significativo, estas mismas poblaciones incrementan 770% y 680% aproximadamente con respecto al basal ($p < 0.05$). Con la mayor concentración testeada, el aumento con respecto a la concentración anterior es mínimo, pero es

significativo con respecto al basal, 805% y 697% para la población de células V+ y V+IP+, respectivamente ($p < 0.05$). Con el complejo 4 se observa un incremento estadísticamente significativo en la proporción de células doble positivas, en todo el rango de concentraciones evaluado, de 250%, 560% y 700% aproximadamente para la concentración de 1, 2.5 y 3 μM respectivamente, con respecto al basal ($p < 0.05$). No se observó cambios significativos en las poblaciones celulares restantes, es decir V+/IP- y V-/IP+. Además, se observa una diferencia significativa, entre los complejos, en la proporción de células en apoptosis temprana. A 2.5 μM esta diferencia es de 4 veces mayor para el complejo 3, y a 3 μM es de 3 veces mayor ($p < 0.05$). Estos datos están graficados en la figura 4.1.5.2 C.

Para corroborar el efecto de estos complejos sobre las células HT-29, se realizó una doble tinción de las mismas, con naranja de acridina e ioduro de propidio. Las células fueron expuestas a los complejos 3 y 4 por 24 h a bajas concentraciones y luego, de ser teñidas, fueron analizadas al microscopio de fluorescencia.

Como puede observarse en las fotografías de la figura 4.1.5.3, se producen cambios morfológicos en las células al ser tratadas con los complejos de cobre. Las células control tienen coloración normal del núcleo, con cromatina verde y en estructura organizada. Cuando son tratadas, con 0.5 μM del complejo 3 se observan áreas verdes densas (fragmentación de la cromatina) y además se puede apreciar que hay otras células teñidas con color rojizo/anaranjado, se debe a la alteración de la membrana plasmática que permite el ingreso del ioduro de propidio y tiñe la cromatina, una de las características del proceso de apoptosis temprano. En la fotografía correspondiente al tratamiento de 1 μM , se puede apreciar una mayor cantidad de células teñidas por el IP, debido a una mayor alteración de la membrana plasmática. También hay una mayor fragmentación de la cromatina y el *blebbing* de la membrana plasmática, característica que diferencia el proceso de apoptosis de la necrosis. En las imágenes correspondientes al complejo 4, a 0.5 μM no se observa condensación de cromatina, pero si una tinción de la misma con el IP, sugiriendo una alteración en la membrana plasmática, y a 1 μM se puede observar en algunas células *blebbing* de la membrana, indicando la presencia de células en apoptosis temprana. Los resultados muestran que el complejo de cobre 3

induce cambios morfológicos en mayor medida que los producidos por el complejo 4, la principal diferencia en las imágenes radica en una mayor cantidad de células IP+ luego del tratamiento con el complejo 3.

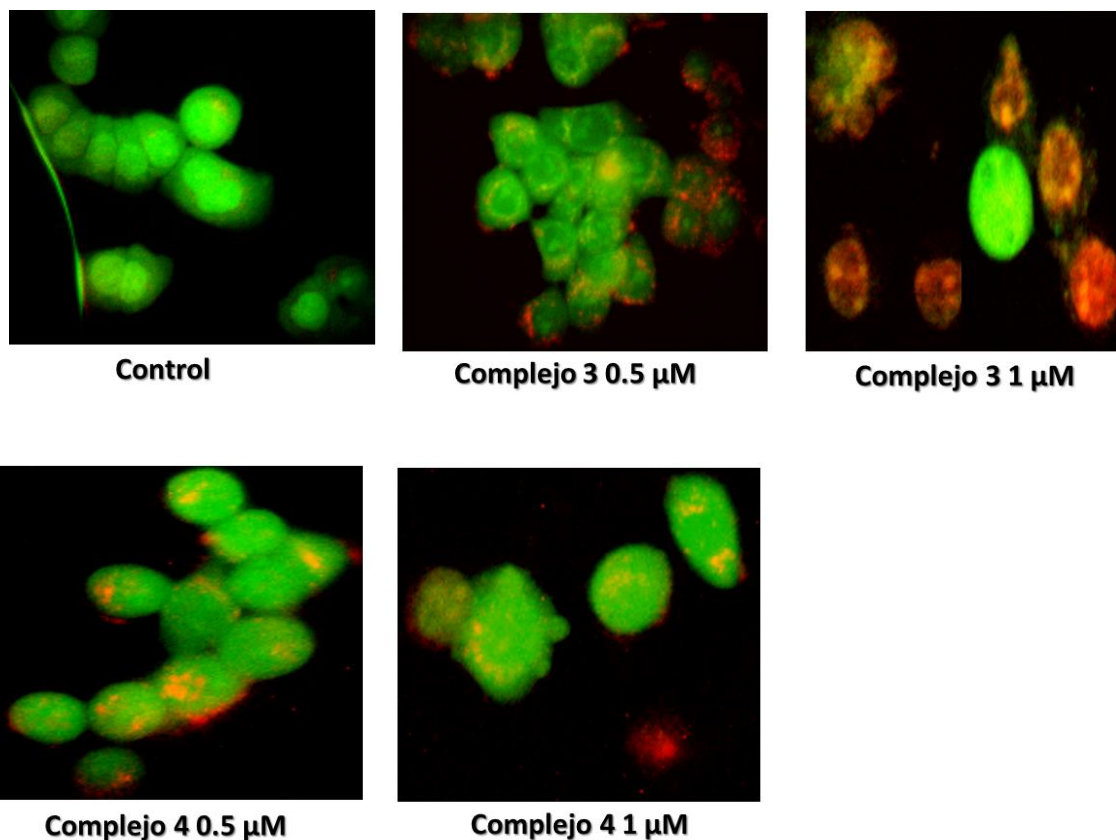


Figura 4.1.5.3 Fotografías de las células HT-29 expuesta a 0.25 y 0.5 μM de los complejos de cobre. Las imágenes fueron tomadas con un objetivo 40X.

A fin de estudiar si la apoptosis es inducida por la cascada de caspasa, las caspasas 3/7 fueron cuantificadas en la línea celular CACO2 tratadas con ambos complejos de cobre a 2 tiempos diferentes, a las 3 y 6 h. La activación de estas enzimas, es una de las características distintivas del proceso de apoptosis, y últimamente resulta en el clivaje de la poli ADP ribosa polimerasa, fragmentación del ADN y finalmente la muerte celular (Moloney & Cotter, 2018). Elevados niveles de ERO, pueden directamente inducir la activación de las caspasas en ambas vías.

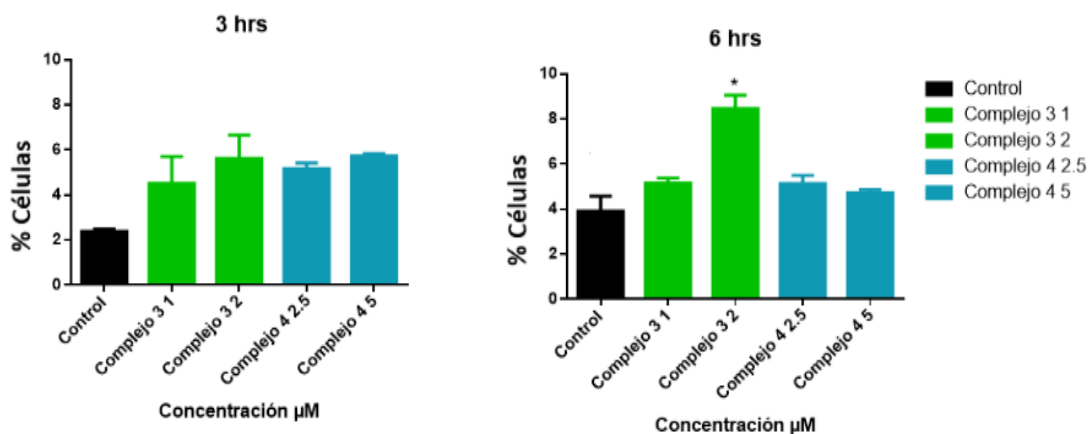


Figura 4.1.5.4 Análisis de la activación de la caspasa 3/7 en el proceso de apoptosis. Línea celular CACO2, tratadas a dos tiempos diferentes, 3 y 6 hrs. Los resultados se expresan como el promedio \pm SEM ($n=3$). *Diferencia significativa con el control ($p<0.05$). #Diferencia significativa entre complejo 3 y 4 ($p<0.05$).

En la figura 4.1.5.4 (anexo [figura 11](#) y [12](#)), se presentan los resultados de la activación de la caspasa 3/7 a las 3 y 6 h. A las 3 h, se observa un aumento en la actividad de la caspasa 3/7, con un incremento del 89% a 1 μ M, y del 134% a 2 μ M, con respecto al basal, sin embargo, no hay diferencia estadísticamente significativa. Un aumento similar se produce luego del tratamiento con el complejo 4, pero cabe destacar que la concentración usada es mayor, de 2.5 μ M y 5 μ M. A las 6 h, para el complejo 3, la activación de la caspasa es dependiente de la concentración, a mayor concentración mayor es la activación de las caspasas 3/7 ($p<0.05$). Con la mínima concentración del complejo 3 aumenta un 31%, con respecto al basal y a 2 μ M, la proporción de la caspasa activa aumentó un 145% con respecto al basal. Con el complejo 4 la activación de las caspasas se mantiene casi invariable, no hay aumentos a medida que aumenta la concentración. Cabe mencionar, que los datos se encuentran corregidos en base a las células sytox positivas, es decir se hace descartando las células necróticas, por lo que los datos representados se expresan en función de las células vivas.

La eficiencia terapéutica de las drogas antitumorales depende de su habilidad para inducir muerte celular en las células cancerígenas. El nivel intracelular de H_2O_2 está cerca del límite de toxicidad, aumentos adicionales de H_2O_2 sumado a la depleción del sistema antioxidante en las células tumorales, dispara el fenómeno de apoptosis. Este aumento en los niveles de ERO inducidos por las drogas anticancerígenas agota la capacidad

antioxidante de las células, empujándolas más allá de los límites de supervivencia y provocando la muerte celular (Nicco *et al.*, 2005). Por otro lado, un incremento drástico en los niveles de ERO, lleva a la activación de p53 y luego, cascada abajo, a la sobreexpresión de genes pro-oxidantes como PUMA y a la baja expresión de proteínas antioxidantes como SOD2, produciendo en consecuencia, muerte celular (Srinivas *et al.*, 2019). La unión de las especies reactivas del oxígeno, a los receptores de muerte, disparan la activación de las caspasas iniciadoras, como la caspasa 8, resultando en la activación de la caspasa 3 y la liberación mitocondrial de Bcl-2 y Bid, las cuales se translocan a la mitocondria produciendo la liberación del citocromo C. Además, por otro lado, la producción aumentada de O_2^- desde la mitocondria, produce daños en la membrana de dicha organela resultando en la liberación del citocromo C al citosol con la consecuente activación de las caspasas (Moloney & Cotter, 2018). Cabe además señalar, que el fenómeno de apoptosis inducido por ERO, está asociado a una disminución de los niveles de GSH y la pérdida de la homeostasis redox. La disminución de los niveles de GSH son el resultado de oxidación de GSH por las especies reactivas del oxígeno, aumentando aún más los niveles de ERO (Srinivas *et al.*, 2019).

La quimioterapia es ampliamente usada en el tratamiento del cáncer y es conocido que aumenta la producción de ERO resultando en daños irreparables y la muerte celular. Ejemplo de ellos incluyen, antraciclinas como la doxorrubicina, cisplatino, bleomicina y trióxido de arsénico (Moloney & Cotter, 2018). Igualmente, en la literatura se reportaron varios complejos de cobre, quienes tienen un efecto similar a los que fueron presentados. Entre estos se puede mencionar metalofármacos de cobre con tiosemicarbazonas como ligando, sintetizados por Deng y colaboradores, quienes probaron su actividad antitumoral en células derivadas de tumor de hígado. Estos demostraron que en dichas células tratadas, se producía un colapso del PMM, con el consecuente aumento de proteínas proapoptóticas y la disminución de proteínas antiapoptóticas. Por otro lado se produjo un aumento del ERO, promoviendo así mismo la producción de mayor cantidad de proteínas proapoptóticas como segundos mensajeros, así como también la apertura de los poros de la membrana mitocondrial. Además demostraron un aumento en los niveles de caspasa 9 y 3, con la consecuente muerte celular por apoptosis (Deng *et al.*, 2018). Otros compuestos con un efecto similar

es un complejo con 6 metoxiquinolina, con actividad sobre la línea celular A549 (J. F. Cadavid-Vargas *et al.*, 2019).

4.2 Ensayos en sistemas 3D

4.2.1 Viabilidad celular

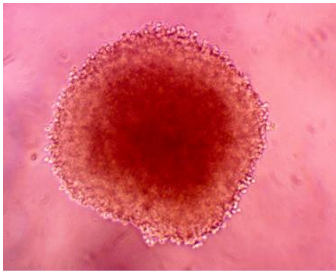
La acción citotóxica de los complejos fue evaluada en sistemas celulares más complejos, como lo son los esferoides multicelulares. Para tal fin se obtuvieron esferoides de MG-63 y MCF-7 por el método de *hanging drop*, y esferoides de A549 y HT-29 por el método de *liquid overlay*. Los esferoides fueron expuestos a ambos complejos en un rango de concentraciones entre 2.5 y 50 μ M por 24 h. Luego de este tiempo, se midió la viabilidad mediante la sonda resazurina con espectrofluorómetro a los esferoides de MG-63, MCF-7 y A549, mientras que la de los esferoides de la línea de colon fue medida con IP mediante citometría de flujo. Los resultados de IC₅₀ están expuestos en la tabla 4.2.1.1.

| <u>Línea celular</u> | <u>IC₅₀ Complejo 3</u> | <u>IC₅₀ Complejo 4</u> | <u>IC₅₀ CisPt</u> |
|----------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|------------------------------|
| MG-63 | 6.05 ±1.8 | 37.88 ±2.70 | >50 |
| MCF-7 | 6.98 ±0.68 | 31.39 ±1.53 | >50 |
| A549 | 8.31 ±0.74 | 10.56 ±0.51 | >50 |
| HT-29 (IP) | 18.32 ±2.5 | 19.12 ±0.82 | |

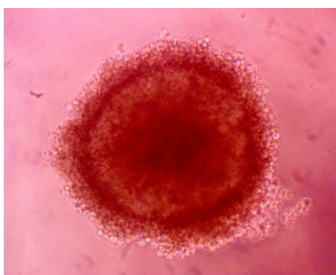
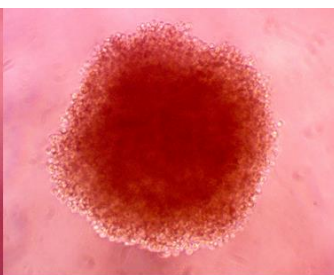
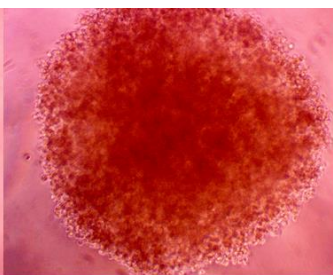
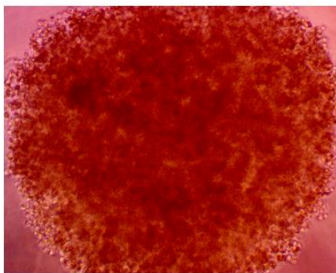
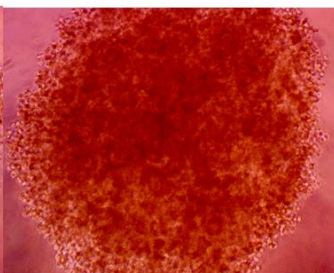
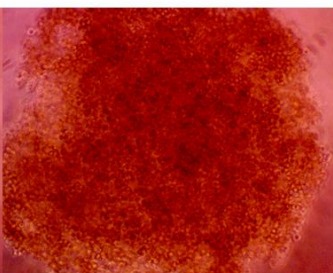
Tabla 4.2.1.1. Resumen de los IC₅₀ (μ M) de los complejos sobre las líneas probadas. Los resultados se expresan como el promedio \pm SEM (n=3).

Como podemos observar, en la tabla 4.2.1.1 ([figura 13](#) del anexo, se observan gráficos de barra), en todos los casos, el complejo de cobre 3 evidenció ser más citotóxico que su análogo. A su vez ambos compuestos presentan IC₅₀ menores que el CisPt, droga de referencia. La línea HT-29 reflejó ser la más resistente al tratamiento con dicho complejo y la línea de osteosarcoma la más susceptible. Un orden de mayor a menor citotoxicidad,

para el complejo 3 sería, MG-63>MCF-7>A549>HT-29, y para el complejo 4, el orden sería de A549>HT-29>MCF-7>MG-63.



Control

Complejo 3 5 μ MComplejo 3 7.5 μ MComplejo 3 10 μ MComplejo 3 20 μ MComplejo 3 30 μ MComplejo 3 50 μ M

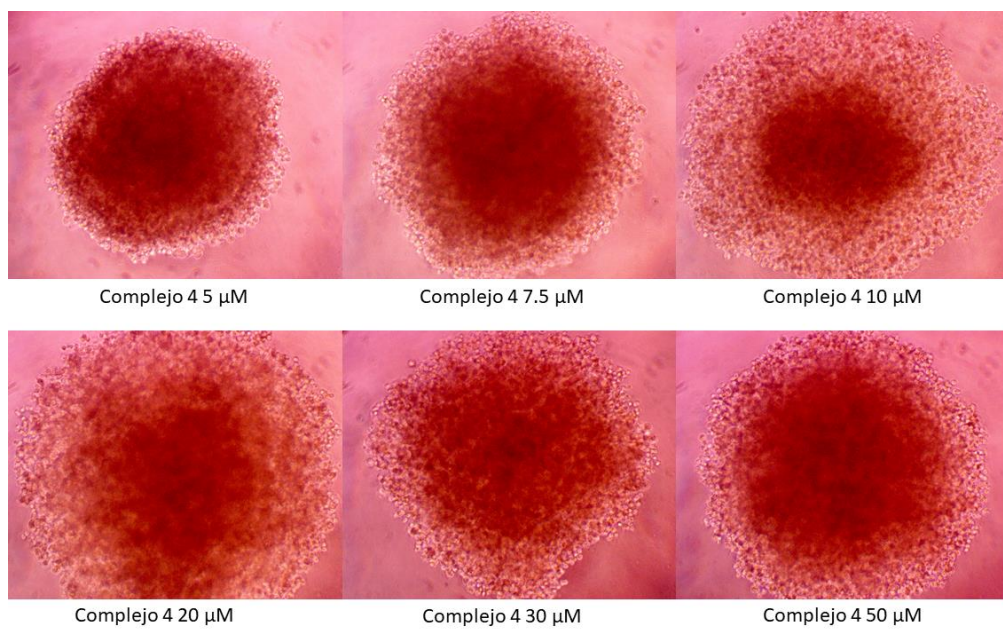


Figura 4.2.1.2. Fotografía de los esferoides de MG-63 tratadas con los complejos de cobre 3 y 4. Tomadas con un microscopio invertido con el objetivo 10X, luego del tratamiento.

En las figuras 4.2.1.2 se ilustran los efectos citotóxicos de los complejos de cobre sobre los esferoides de la línea MG-63, el mismo es dependiente de la concentración para el complejo 3 ($p < 0.05$). Estos modelos tumorales fueron expuestos durante 24 h a concentraciones entre 5 y 50 μM . En las concentraciones más altas, la fluorescencia (resazurina) emitida por las células es más baja que la solución usada como blanco, indicando que la sonda no fue metabolizada debido a la alta citotoxicidad generada por el compuesto. El IC_{50} obtenido para el complejo 3 en los esferoides es 2 veces mayor que en monocapa, y en cuanto al complejo 4 la resistencia otorgada por los esferoides es de 12 veces mayor. La acción citotóxica de los complejos queda en evidencia, además, por las fotos de los esferoides. En las mismas se puede advertir desintegración celular y pérdida de compactación en las esferas multicelulares, producto de la acción de los complejos. A 30 μM hay una gran diferencia en la estructura del esferoide entre los complejos, ya que con el complejo 3 se evidencia una mayor desintegración celular.

Como se observa en la tabla 4.2.1.1 el IC_{50} del CisPt ([figura 14](#) del anexo, gráfico de barra), es mayor a 50 μM en la línea MG-63. Además, en las fotografías de la figura 4.2.1.3 se observan que los esferoides se mantienen casi intactos en el rango de concentraciones usadas para tal fin.

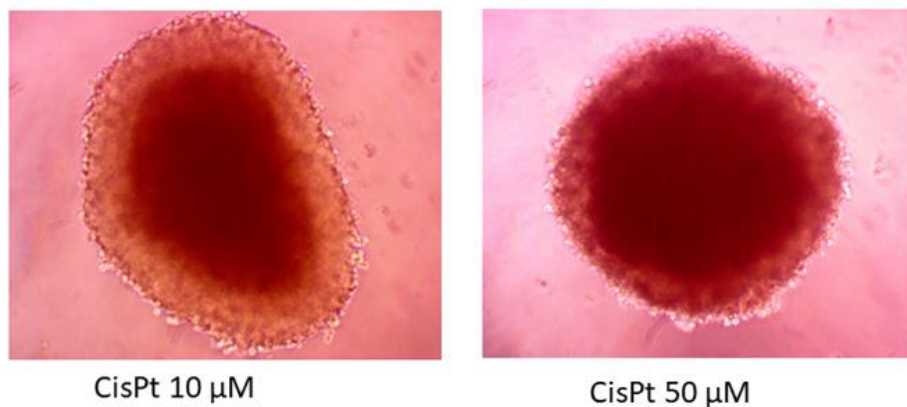
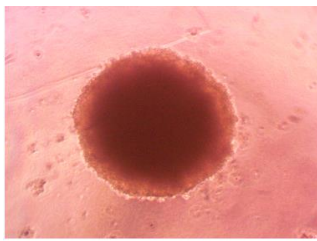


Figura 4.2.1.3. Ensayo de citotoxicidad de los esferoides de la línea MG-63, luego del tratamiento por 24 h con CisPt. Los resultados se expresan como el promedio \pm SEM ($n=3$).

Los esferoides de la línea MCF-7 fueron tratados con concentraciones de entre 5 y 50 μ M de ambos complejos por 24 h. La citotoxicidad es dependiente de la concentración ($p<0.05$). En todo el rango de concentraciones usados, se evidenció una disminución de la viabilidad con respecto al basal ($p<0.05$). A 10 y a 20 μ M, se observa una gran diferencia en la actividad entre ambos compuestos. Mientras que el complejo 3 a 10 μ M produjo una disminución del 66% de la viabilidad, el complejo 4 solo lo redujo un 43%, y a 20 μ M la reducción es mucho mayor, del 77% para el complejo 3 y de solo el 49% para el complejo 4 ($p<0.05$). Con respecto a los IC_{50} entre los esferoides y monocapa, el complejo 3 es 2.3 veces mayor, y el complejo 4, el valor es 5 veces más grande. En las fotografías de la figura 4.2.1.4, la acción citotóxica de los metalofármacos no se relaciona con la pérdida de tamaño, en cambio, se hace evidente por la pérdida de compactación de los esferoides con respecto al control, esto quizás se debe a una disminución de la unión célula-célula.



Control

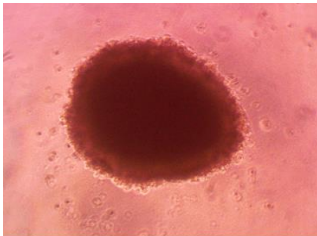
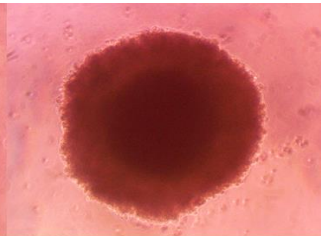
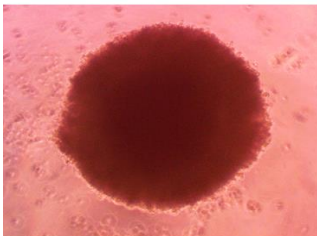
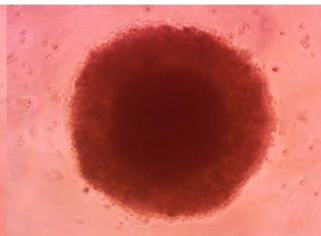
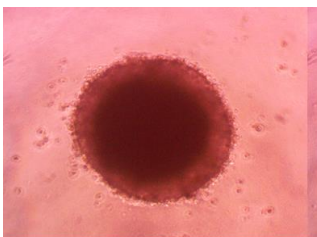
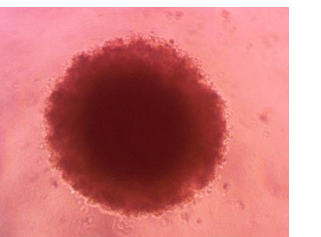
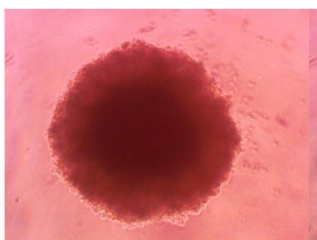
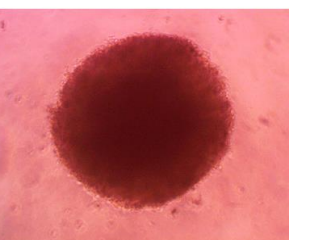
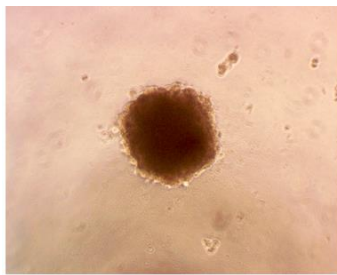
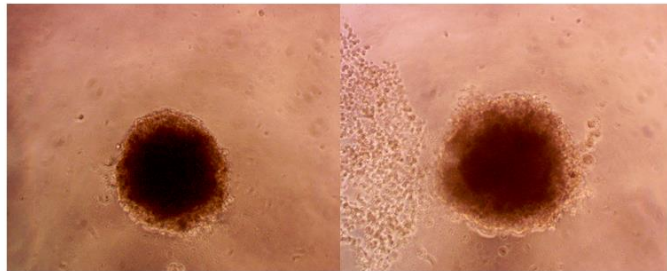
Complejo 3 5 μM Complejo 3 10 μM Complejo 3 20 μM Complejo 3 50 μM Complejo 4 5 μM Complejo 4 10 μM Complejo 4 20 μM Complejo 4 50 μM

Figura 4.2.1.4. Fotografía de los esferoides de la línea MCF7 tratadas con los complejos de cobre 3 y 4. Tomadas con un microscopio invertido con el objetivo 10X, luego del tratamiento.

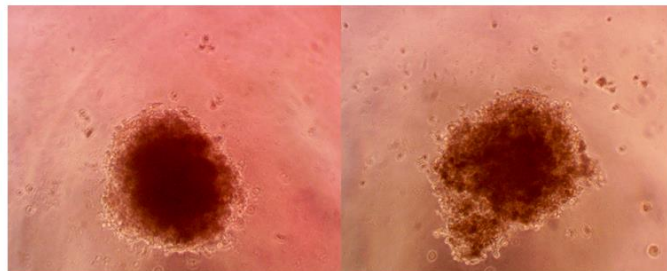


Control



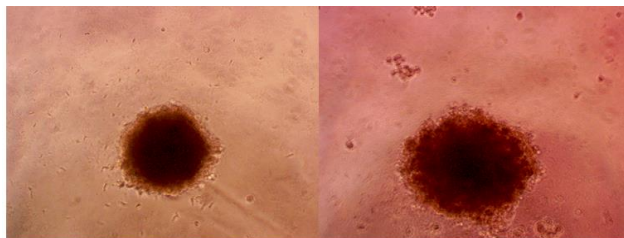
Complejo 3 5 μM

Complejo 3 10 μM



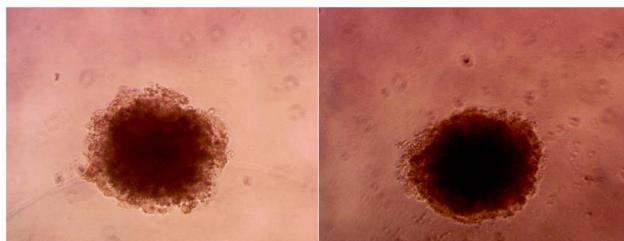
Complejo 3 20 μM

Complejo 3 50 μM



Complejo 4 5 μM

Complejo 4 10 μM



Complejo 4 20 μM

Complejo 4 50 μM

Figura 4.2.1.5. Fotografía de los esferoides de la línea celular A549, tratados por 24 hrs con los complejos 3 y 4. Las mismas fueron tomadas con microscopio invertido con un objetivo 10x.

La línea A549, también se ve afectada por la acción de los complejos. A 10 μM , existe una diferencia significativa entre ambos complejos ($p < 0.05$), con el complejo 3 la proporción de células viables es de solo el 18%, y con el complejo 4 es del 45% aproximadamente con respecto al control ($p < 0.05$). A concentraciones más altas, no existe diferencia significativa entre ambos complejos. La relación de IC_{50} entre los esferoides y en monocapa es de 4.3 veces para el complejo 3 y de 2.6 veces para el complejo 4. En las fotografías de la figura 4.2.1.5, se puede observar un gran daño en el esferoide por acción del complejo 3 a la mayor concentración. Se observa un desprendimiento celular, y a su vez se observa una alteración en el límite del mismo a medida que aumenta la concentración. Este daño tiene mayor significancia cuando los esferoides son tratados con el complejo 3 que con el complejo 4. La disminución de la viabilidad impartida por el complejo 4, evidencia ser estadísticamente significativa en todo el rango de concentraciones usados con respecto al control ($p < 0.05$), además entre 5 y 20 μM , hay una dependencia de la concentración ($p < 0.05$).

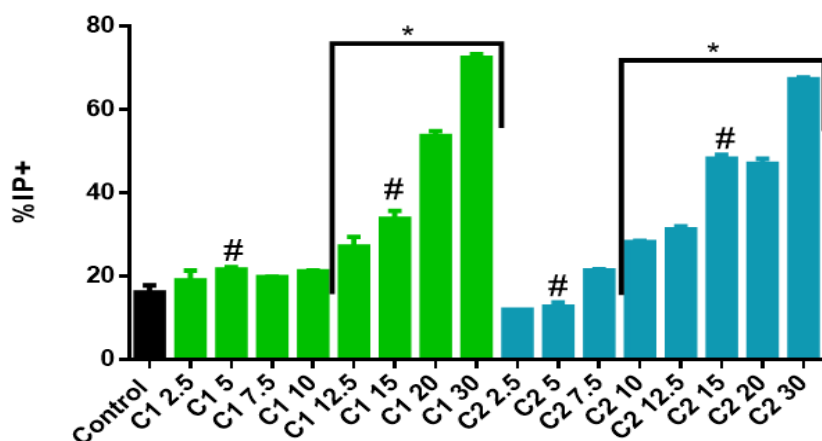
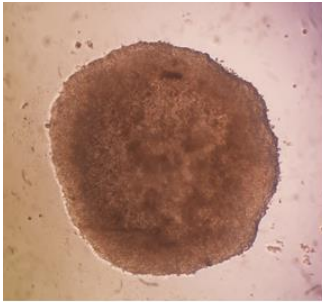
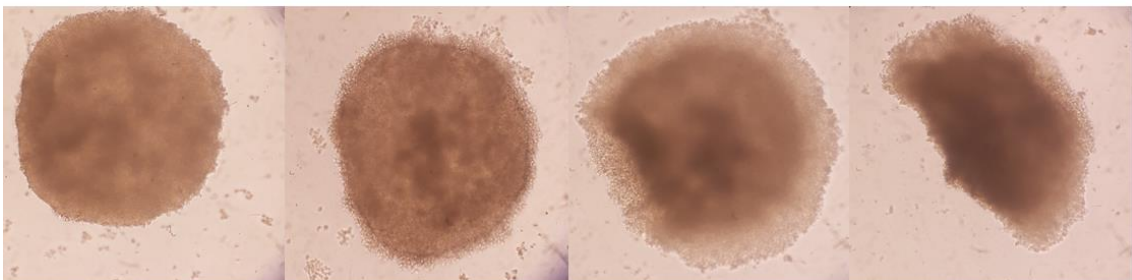


Figura 4.2.1.5. Actividad citotóxica de los complejos de cobre, sobre la línea celular HT-29. Fue determinada por citometría de flujo. Se graficó el porcentaje de células IP positivas. Los resultados se expresan como el promedio \pm SEM ($n=3$). *Diferencia significativa con el control ($p < 0.05$). #Diferencia significativa entre complejo 3 y 4 ($p < 0.05$).



Control

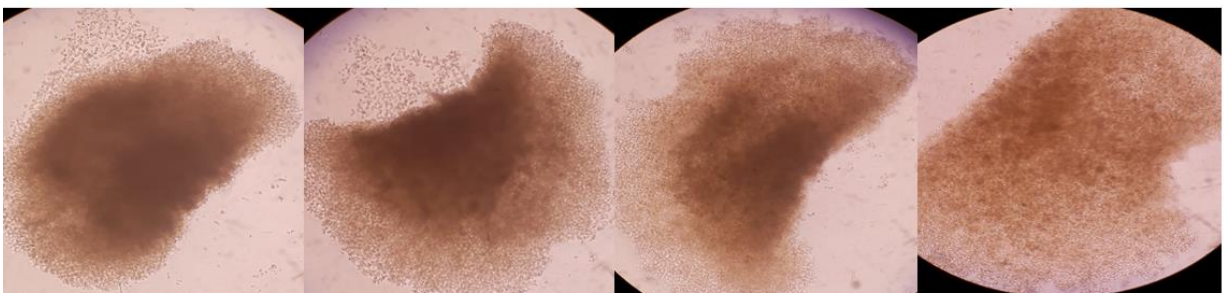


Complejo 3 2.5 μM

Complejo 3 5 μM

Complejo 3 7.5 μM

Complejo 3 10 μM

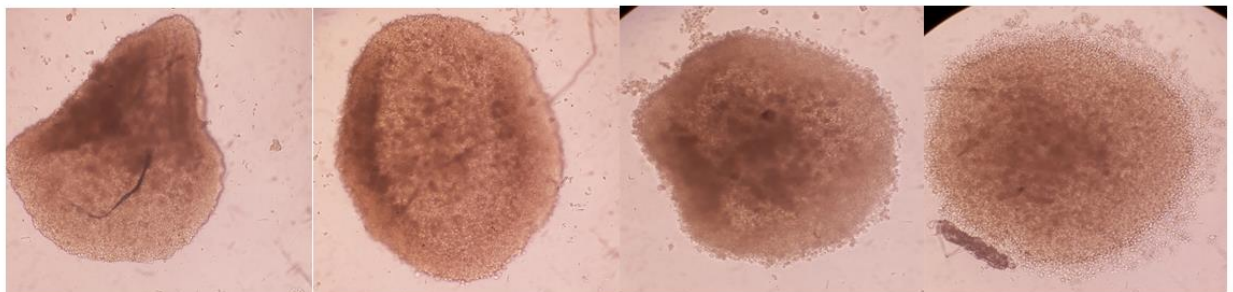


Complejo 3 12.5 μM

Complejo 3 15 μM

Complejo 3 20 μM

Complejo 3 30 μM



Complejo 4 2.5 μM

Complejo 4 5 μM

Complejo 4 7.5 μM

Complejo 4 10 μM

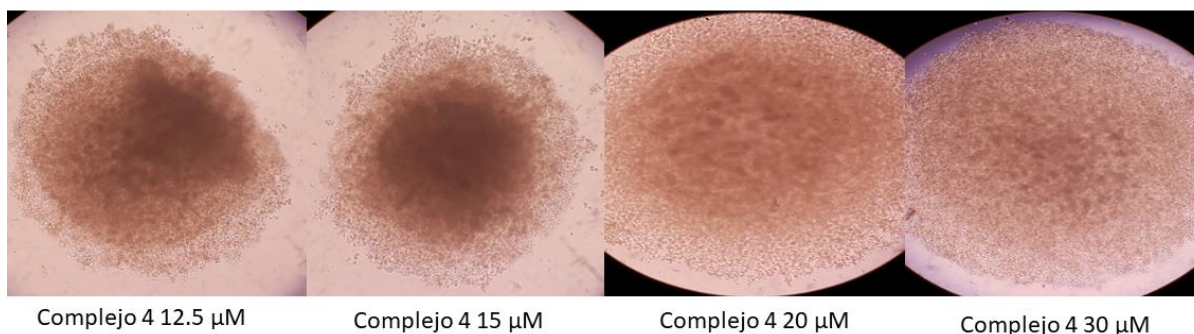


Figura 4.2.1.6. Fotografía de los esferoides de la línea HT-29 luego del tratamiento por 24 hrs con ambos complejos de cobre. Las mismas fueron tomadas con un microscopio invertido con el objetivo 10X.

La citotoxicidad de los metalofármacos de cobre sobre la línea HT-29 fue medida con IP mediante citometría de flujo. El tratamiento llevado a cabo fue por un periodo de 24 h con concentraciones entre 2.5 y 30 μM . En la figura 4.2.1.5, está representado mediante un gráfico de barras el porcentaje de células IP positivas en función de la concentración de complejo. El complejo 3 mostró diferencia significativa con el estado basal a partir de 12.5 μM y el complejo 4 a partir de 10 μM ($p < 0.05$). El IC_{50} del complejo 3 de los esferoides versus monocapa es 12.6 veces mayor y 6.2 veces para el complejo 4. Sin embargo, los IC_{50} obtenidos para el complejo 3 y complejo 4 no mostraron ser significativamente diferentes (18.32 μM y 19.12 μM respectivamente). Para resaltar la importancia en el uso del sistema de cultivo 3D, esta línea exhibió mayor resistencia al tratamiento que las otras líneas ya mencionadas anteriormente, al contrario de lo que ocurre con el sistema en monocapa.

En la figura 4.2.1.6 se pueden observar a través de las fotografías como los esferoides fueron perdiendo compactación con el tratamiento. Además, se observa pérdida de fragmentos de los mismos.

Otra manera de evaluar la actividad citotóxica de los complejos fue mediante la tinción de los esferoides de las líneas de osteosarcoma, MG-63, y de cáncer colorrectal, HT-29 con dos sondas, fluoresceína diacetato (FDA), que marca las células metabólicamente activas e IP, que marca las células que tienen alterada la membrana plasmática. Los esferoides de MG-63 tienen un tamaño aproximado de 620 μm , tamaño en el cual es evidente el centro necrótico.

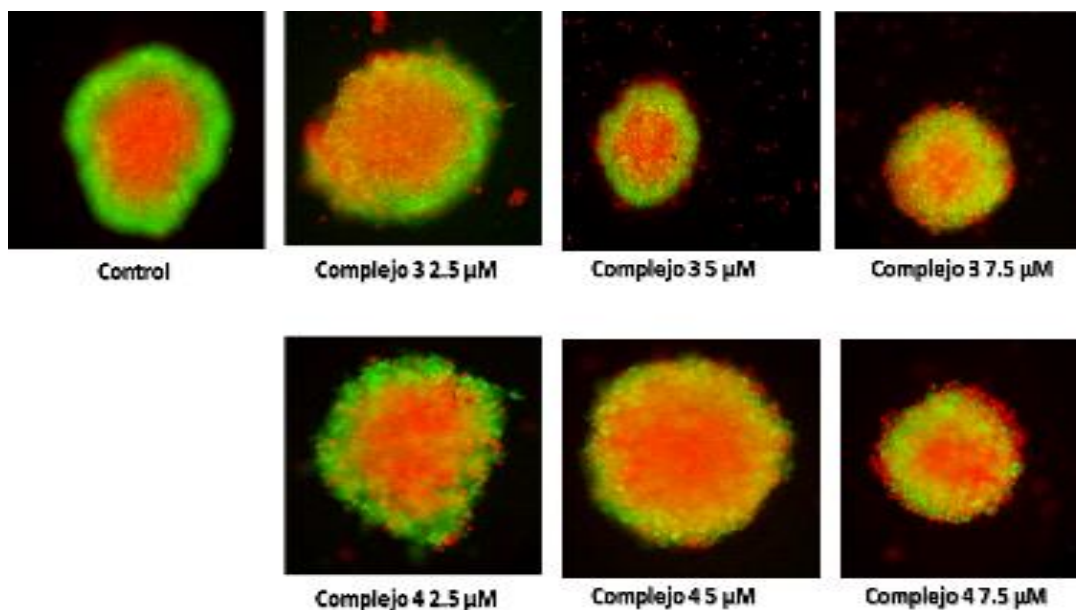


Figura 4.2.1.7. Fotografía de los esferoides derivadas de la línea MG-63 teñidos con FDA/IP. Fueron tratados por 24 hrs con ambos complejos de cobre. Las fotografías fueron tomadas con un microscopio de fluorescencia, con un objetivo 10X.

Los esferoides de la línea celular derivada de osteosarcoma, fueron tratados por 24 h con 3 concentraciones, 2.5, 5 y 7.5 μM de ambos complejos de cobre. En las fotografías de la figura 4.2.1.7, se puede apreciar, el control teñido de verde, rodeando un centro necrótico, teñido por color rojo debido al IP. El tamaño de estos esferoides es de alrededor 670 μm . A medida que aumenta la concentración de los complejos, disminuye la población metabólicamente activa, teñidas con FDA (verdes) y hay un aumento en la población de células necróticas, teñidas con IP (rojas).

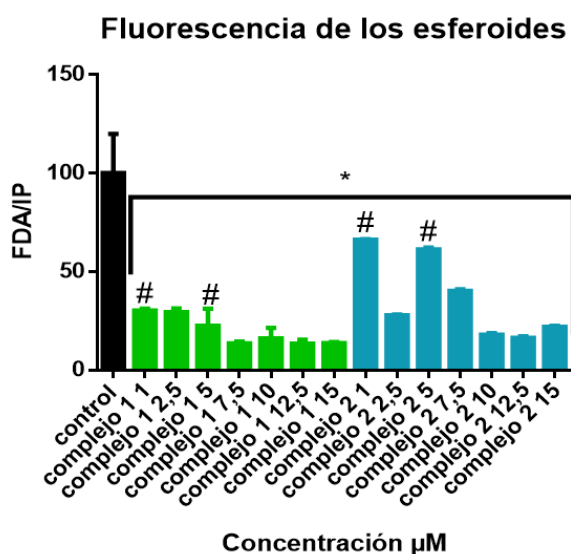
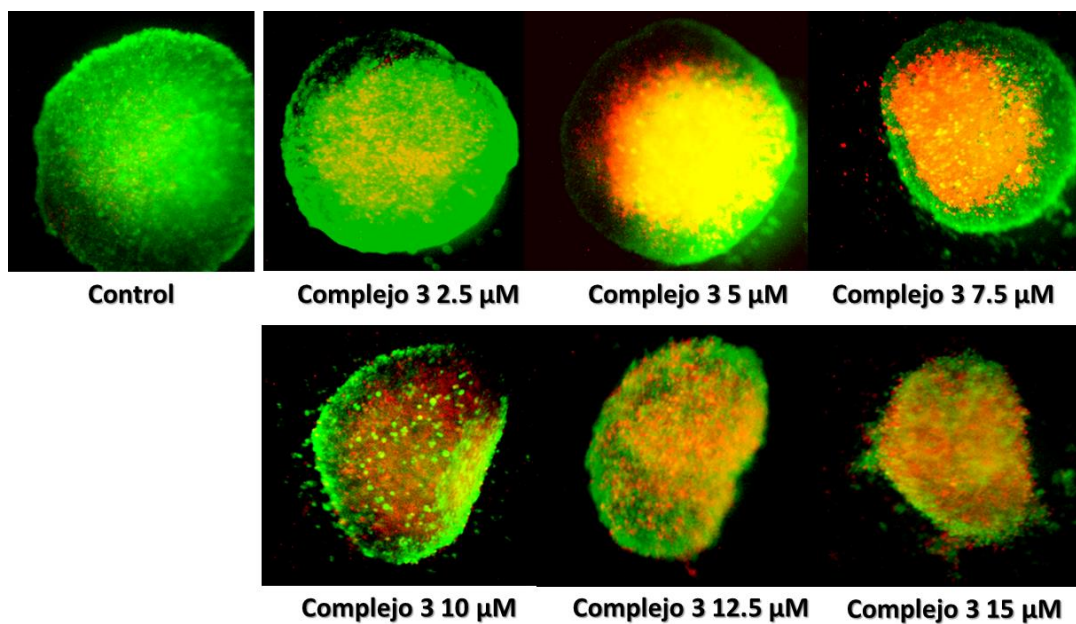


Figura 4.2.1.8. Representación gráfica de la relación de fluorescencia entre FDA/IP de los esferoides de la línea HT-29. Los resultados se expresan como el promedio \pm SEM ($n=3$). *Diferencia significativa con el control ($p<0.05$). #Diferencia significativa entre complejo 3 y 4 ($p<0.05$).



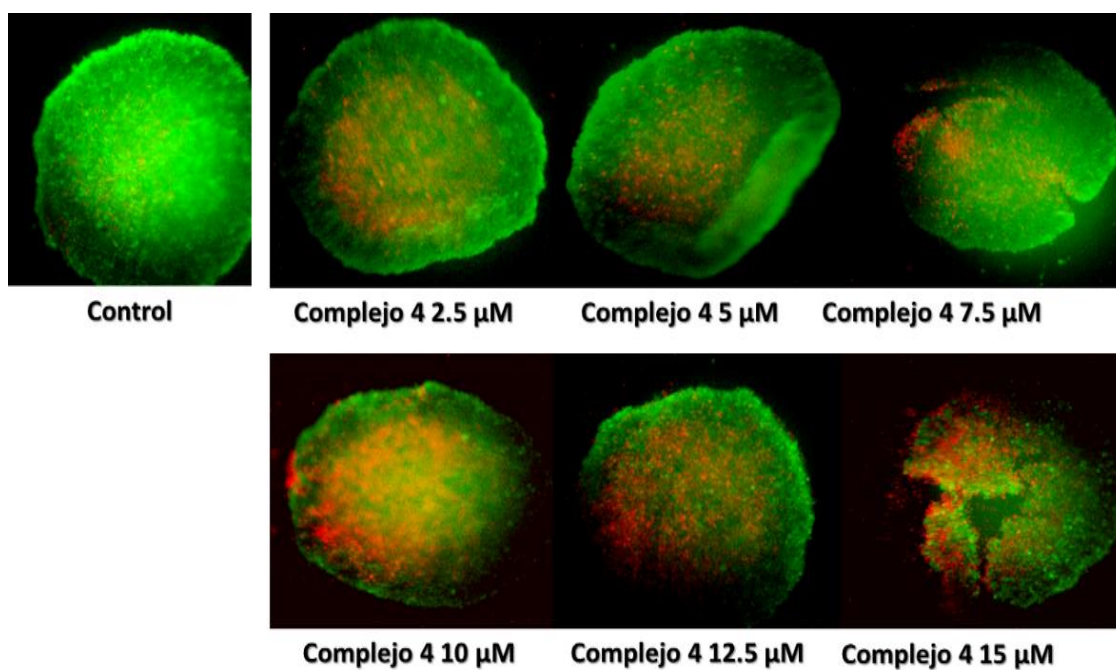


Figura 4.2.1.9. Fotografía de los esferoides de la línea HT-29 teñidos con FDA/IP. Estos fueron tratados por 24 hrs con los complejos de cobre.

Los esferoides de la línea HT-29, los cuales tienen un tamaño de 510 μm , fueron tratados por 24 hrs con un amplio rango de concentraciones, entre 2.5 y 15 μM y luego se evaluó el efecto de los mismos mediante una doble tinción FDA/IP. En la gráfica de la figura 4.2.1.8, se observa la relación de fluorescencia de los esferoides entre FDA/IP. El máximo de fluorescencia, 100%, está dado por el control, el cual coincide con la fotografía del mismo, ya que se encuentra de color verde teñido por la sonda FDA, aún no se evidencia la presencia de un centro necrótico debido a su tamaño. Por lo general esferoides con células densamente empaquetados con aparición de necrosis se produce cuando tienen un tamaño de entre 550 y 650 μm (Riffle *et al.*, 2017). A medida que aumenta la concentración de los complejos la fluorescencia verde disminuye y aumenta la fluorescencia del IP. En conclusión, la relación comienza a disminuir. El descenso de la fluorescencia es más evidente con el complejo 3, lo cual se puede comprobar en las fotografías. A partir de 5 μM se observa un gran centro necrótico. Asimismo, se puede observar una alteración en la morfología del esferoide, pérdida de tamaño y desintegración celular. Con el complejo 4 hay una disminución de la fluorescencia que es evidente a 7.5 μM . Se puede apreciar en las fotografías de la figura 4.2.1.9, como aumentan las células necróticas, dadas por el color rojo del IP y este cambio es aún más

evidente a la concentración de 15 μM , donde se produce la desintegración del esferoide multicelular.

Está bien establecido que los perfiles genéticos y las respuestas a tratamientos de las células tumorales, son diferentes entre los modelos 2D y los tumores sólidos. Por esta razón puede que los esferoides multicelulares, constituyen un modelo que contribuye a obtener resultados que sean comparables a las condiciones *in vivo*. Las células tumorales en los esferoides exhiben heterogeneidad en proliferación, actividad metabólica y señales de reparación celular. En este sentido, la señalización de HIF (del inglés, *Hypoxia Inducible Factor*, Factor Inducido por Hipoxia) contribuye a la regionalización de los esferoides multicelulares en capas y la formación de microambientes, la difusión limitada de oxígeno establece gradientes en HIF- α y en consecuencia el comportamiento celular, el cual es similar al encontrado a los tumores *in vivo*. La hipoxia estimula el crecimiento celular, represión de proteínas que participan en la reparación de daños en el ADN. Sin embargo, diversos estudios apoyan que dos proteínas, ATM y ATR, permiten la estabilización de las horquillas de replicación y previenen el daño del ADN, logrando la supervivencia celular y reiniciar la proliferación (Riffle & Hegde, 2017).

Otra de las consecuencias de la hipoxia son los niveles elevados de ERO. Esto oxida lípidos, proteínas y ácidos nucleicos lo que altera la homeostasis celular e induce daños en el ADN. Para contrarrestar estos efectos, las células tumorales aumentan vías de señalización que generan NADPH, un equivalente que mitiga el impacto negativo de las ERO. En estas condiciones, también se produce la dimerización de HIF- α y HIF- β , lo que regula la transcripción de proteínas las cuales contribuyen a la reprogramación metabólica (Riffle *et al.*, 2017; Riffle & Hegde, 2017).

Así mismo, se observa un aumento en la actividad de la proteína isocitrato deshidrogenasa (IDH), reduce α -cetoglutarato para formar citrato y NADPH. Este proceso es crítico, para mantener la viabilidad celular bajo condiciones de hipoxia ya que promueve la lipogénesis de *novo*, la restauración de los niveles de glutatión, y la producción de equivalentes de carbonos para la señalización celular. Todos estos

procesos, es decir la estabilización de HIF- α , la reprogramación metabólica, la producción de EROs, y la actividad de IDH, han sido observadas en los esferoides multicelulares en patrones similares a los observados en *in vivo* (Riffle & Hegde, 2017)(Riffle *et al.*, 2017).

Otra de las consecuencias de la hipoxia es la activación de ciertas proteínas que participan en el desarrollo de resistencia. La misma se manifiesta en la diferencia de valores de IC₅₀ obtenidos para monocapa y para esferoides, siendo mucho mayor para este último (Dickreuter & Cordes, 2017).

Por otro lado, el complejo 3 resultó ser más activo. Una de las posibles causas, es su gran capacidad para generar ERO, lo que le permite sortear los mecanismos de defensa impuestos por este método de cultivo, como el aumento de NADPH y la estabilización de la concentración de glutatión. El aumento abrupto de los niveles de las especies reactivas del oxígeno es mucho mayor que la síntesis de antioxidantes, causando muerte celular, lo que se ve reflejado en la disminución de la fluorescencia de la resazurina y el aumento de la señal de IP al microscopio, al tratar los esferoides con el este complejo.

4.2.2 Invasión de esferoides multicelulares.

La migración invasiva de las células tumorales a través de la membrana basal es el paso inicial de la metástasis tumoral. Este proceso es dependiente de la adhesión celular y la migración, así como de la proteólisis de la matriz extracelular. En este trabajo de Tesis Doctoral se evaluó la capacidad de los complejos de inhibir el proceso de invasión de las células tumorales desde los esferoides multicelulares. Este ensayo permitió evaluar la iniciación de la migración a partir de un único foco.

Los esferoides de las líneas MG-63, MCF-7 Y A549 fueron crecidos por el método de la gota colgante los dos primeros y por el método *liquid overlay* para la última línea. Una vez que alcanzaron su tamaño ideal, aproximadamente 500 y 550 μm , fueron trasladados a una placa que tenía una capa de colágeno I, el mayor sustrato de MEC. Una vez colocados allí los esferoides fueron tratados por un plazo de 24 h para MG-63 y A549, en cambio para la línea MCF-7 el tiempo fue de 48 h. Esto es debido a las

propiedades invasivas de las líneas tumorales, ya que las mismas dependen del microambiente así como de sus propiedades invasivas intrínsecas (Weiswald *et al.*, 2015).

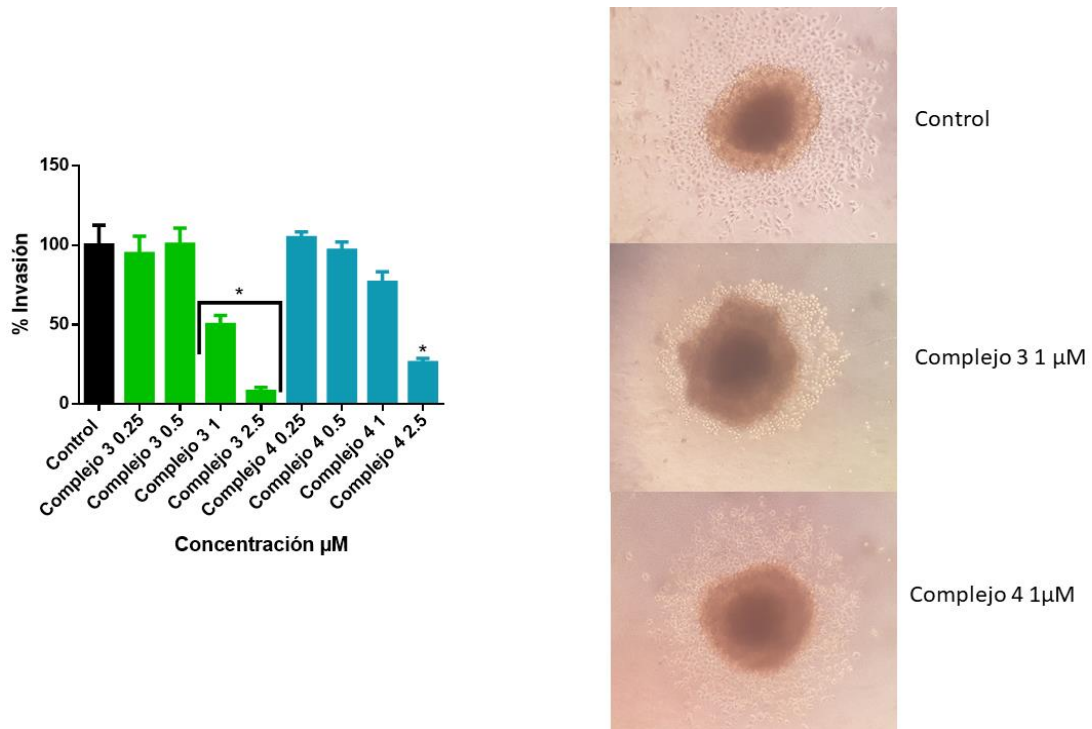


Figura 4.2.2.1. Ensayo de invasión sobre una matriz de colágeno I de esferoides de la línea MG-63. Los resultados se expresan como el promedio \pm SEM (n=3). *Diferencia significativa con el control ($p < 0.05$). #Diferencia significativa entre complejo 3 y 4 ($p < 0.05$). Fotografías tomadas con el microscopio invertido con el objetivo 10X (derecha). Fotografía del proceso de invasión de los esferoides de la línea MG-63 (izquierda).

En la figura 4.2.2.1 pueden observarse un gráfico de barras y fotografías que representan el efecto de los complejos sobre el proceso de invasión de los esferoides de la línea MG-63. El complejo 3, a las concentraciones de 0.25 y 0.5 μ M no se observa efecto alguno sobre este proceso, lo que se revierte a la a la concentración de a 1 μ M, provocando una inhibición de este proceso en un 50% .A 2.5 μ M la invasión se ve marcadamente disminuido con respecto al basal, 92.1% ($p < 0.05$). El complejo 4 solo a 2.5 μ M, provoca un efecto significativo con respecto al basal, una disminución de 73.9% de la invasión ($p < 0.05$). Sin embargo, a 0.25, 0.5 y 1 μ M no hay diferencias significativas con respecto al basal. En las fotografías de los esferoides, también se puede apreciar la diferencia en la capacidad inhibitoria entre los dos complejos a 1 μ M, en donde las proyecciones desde el esferoide son menores en el caso del complejo 3.

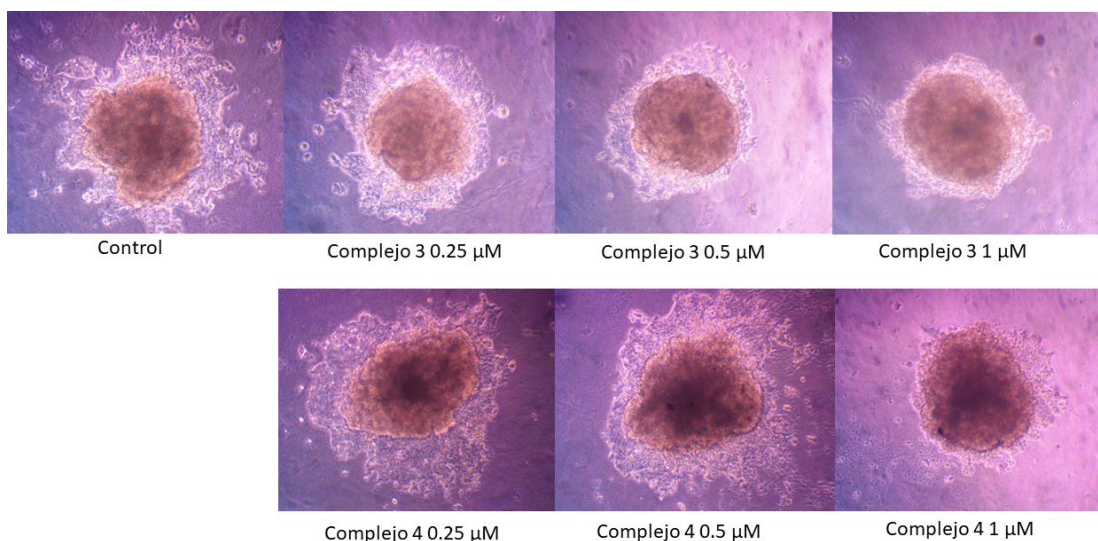
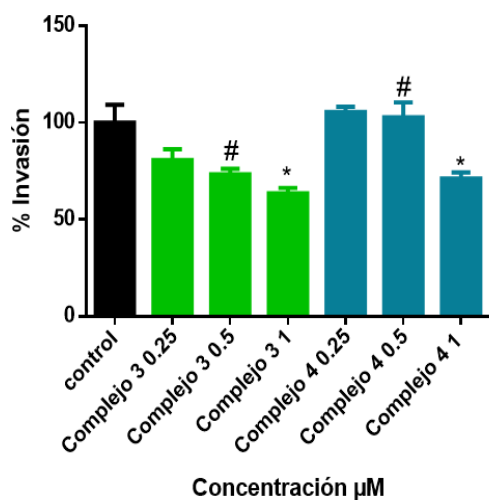


Figura 4.2.2.2. Ensayo de invasión sobre una matriz de colágeno I de esferoides de la línea MCF7. Los resultados se expresan como el promedio \pm SEM ($n=3$). *Diferencia significativa con el control ($p<0.05$). #Diferencia significativa entre complejo 3 y 4 ($p<0.05$). Fotografía de los esferoides luego del tratamiento. Fueron tomadas con un microscopio invertido, con un objetivo 10X.

En la figura 4.2.2.2 se puede observar que el mayor efecto inhibitorio del proceso de invasión de los esferoides de la línea tumoral MCF-7, es impartida por el complejo 3. A 0.5 μM , se observa una diferencia significativa entre la acción de los complejos ($p<0.05$), el complejo 3 produce una disminución de la invasión del 26.66%, mientras el complejo 4 no genera modificación alguna con respecto al basal, a dicha concentración ($p<0.05$). Tal como puede apreciarse en las fotografías, bajo la acción del complejo 3, a dicha concentración, se observa una disminución de la distancia entre el centro del esferoide

y el límite de invasión, mientras que con complejo 4 las prolongaciones se mantienen invariables. Cuando los esferoides son tratados con la máxima concentración del complejo 3 y 4, 1 μM , se produce una inhibición de la invasión del 36.5 y 28.8% respectivamente con respecto al basal ($p < 0.05$). Un complejo de cobre, $\text{Cu}(\text{trp})_2$, reportó una actividad similar. Inhibe la habilidad, de las células de los esferoides de MCF-7, de invadir la matriz de colágeno I, a una concentración de 10 μM (Balsa *et al.*, 2020).

Los efectos de los complejos sobre la invasión de la línea A549 (figura 4.2.2.3), es evidente a partir de 0.5 μM con el complejo 3, donde se produce una disminución del 30%, sin embargo, no presenta diferencias estadísticas con respecto al basal. Al aumentar la concentración al doble, se inhibe el 100% del proceso, no se observa la presencia de prolongaciones celulares desde el esferoide. Bajo el tratamiento con el complejo 4 no se observó inhibición del proceso de invasión. No se consiguió disminución de la invasión con las concentraciones empleadas. Los efectos de los complejos se pueden advertir en las fotografías de los esferoides.

En particular, los cultivos de esferoides embebidos en una matriz adecuada, como el colágeno, permite las interacciones célula-matriz, por lo tanto, se utilizan cada vez más para estudiar las interacciones célula-MEC, invasión local, migración y resistencia a fármacos (Hwang *et al.*, 2019). Por esta razón, se estudió, con este modelo, la capacidad de los complejos de cobre de inhibir el proceso de invasión. Los esferoides de todas las líneas celulares presentadas, en el estado invasivo, presentaron células moviéndose fuera de los mismos e invadiendo la matriz que los rodea. Grupos de células migraron fuera del esferoide, y eventualmente, la estructura de los esferoides fue alterada. En todos los casos el complejo de cobre 3, tiene una actividad anti-invasiva superior.

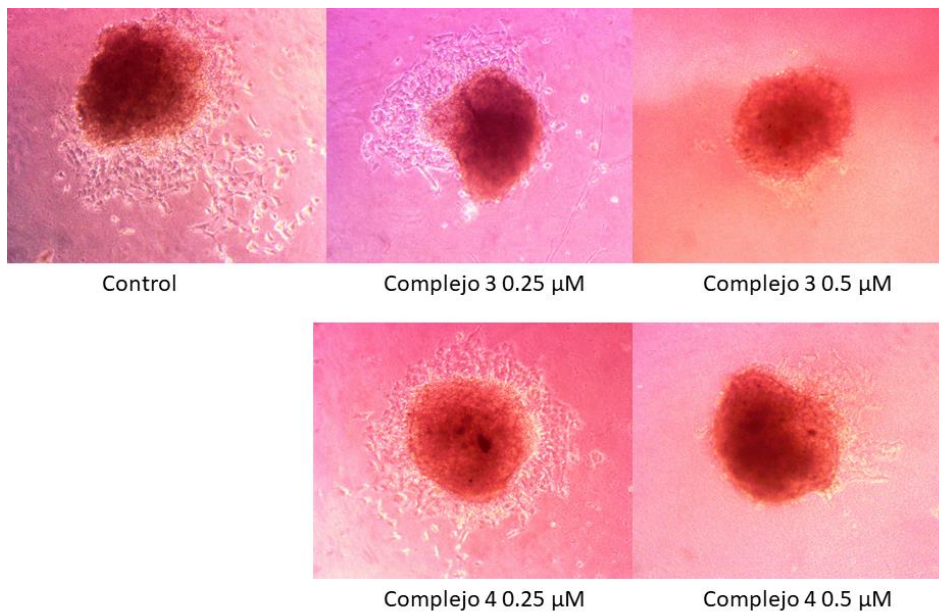
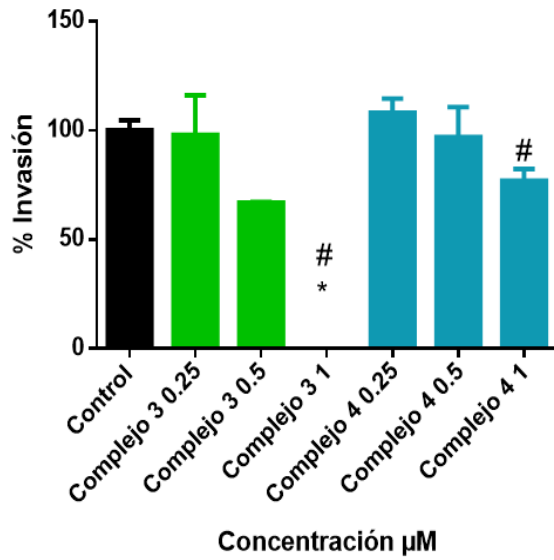


Figura 4.2.2.3. Ensayo de invasión sobre una matriz de colágeno I de esferoides de la línea A549. Los resultados se expresan como el promedio \pm SEM ($n=3$). *Diferencia significativa con el control ($p<0.05$). #Diferencia significativa entre complejo 3 y 4 ($p<0.05$). Fotografía de los esferoides de la línea A549 tomadas con un microscopio invertido con un objetivo 10X.

4.3 Inhibición de la vía NFκβ en monocapa y esferoides de la línea celular HT-29

La vía NFκβ como ya se mencionó anteriormente en la introducción, participa en varios mecanismos que facilitan el desarrollo tumoral, como inhibición de apoptosis, inducción de la proliferación celular, regulación la angiogénesis, promoción de la metástasis y remodela el metabolismo tumoral.

Muchas de las investigaciones iniciales que relacionaron NFκβ y el cáncer colorrectal (CCR), se realizaron en modelos de colitis en ratones, y lo que es más importante, demostraron que las funciones NFκβ son específicos del tipo celular y del tipo de tumor. Si bien no se reportaron mutaciones activas de NFκβ en cáncer de colon, la activación constitutiva de esta vía ha sido observada y asociada con estadios tumorales avanzados, resistencia al tratamiento y baja supervivencia. Muchas investigaciones han asociado el rol de NFκβ con el cáncer de colon. Una de las investigaciones fue la relación entre los pólipos, los cuales son precursores del CCR. Los mismos se han estudiado en ratones, en la que sugiere que NFκβ está implicada en los estadios tempranos de la formación de adenomas. También se ha estudiado su rol en la formación de adenomas precancerosos, ya que su inhibición en ratones producía disminución en el tamaño de los mismos, en la expresión de genes que codifican proteínas pro-inflamatorias y de proteínas antiapoptóticas como Bcl-2. Las células madres de cáncer de colon han sido identificadas como promotoras de la formación de tumores y metástasis *in vivo*, muchas vías están implicadas en este proceso, incluyendo NFκβ. Su actividad elevada, aumenta la activación de la vía Wnt e induce la dediferenciación de células no *stem*, las cuales adquieren capacidad para iniciar el tumor (Patel *et al.*, 2018).

Cabe mencionar además su relación con las MMPs. En cáncer de colon hay una sobre expresión de las MMP 1, 2, 3, 7, 9 y 13 y fue asociado con mal pronóstico y metástasis. La expresión de MMP9 es regulado por varios factores de transcripción incluyendo NF-κB, el cual es necesario para que TNF-α provoque la expresión del gen de MMP9. (Patel *et al.*, 2018). La inhibición de esta vía, está relacionada con la disminución de la expresión de MMP2 y MMP9, así como también la inhibición de la invasión y migración

de células tumorales (X. Wang *et al.*, 2018). Por las razones debidamente expresadas esta vía podría ser un blanco potencial para tratamientos.

Ciertas drogas se probaron como inhibidores de la vía, actuando en diferentes puntos de la misma. Por ejemplo, drogas, como el trióxido de arsénico y el compuesto auranofin altera el IKK β Cys-179 (proteínas inhibitorias) y también inhiben el IKK dependiente de la activación de NF κ B. As₂O₃ ha sido usado en ensayos clínicos en leucemia promielocítica y tumores sólidos (Hassanzadeh, 2011). Curcumina es un derivado polifenólico, y es activo frente a varias vías de señalización, incluyendo NF κ B. En las células estimuladas con TNF, que fueron tratadas con curcumina, un estudio reportó ausencia de actividad de NF κ B por inhibición de la fosforilación de I κ B α en células de cáncer de colon (Patel *et al.*, 2018).

Con el objetivo de evaluar si los complejos eran capaces de inhibir la vía NF κ B, las células HT-29 NF κ B-hrGFP, fueron estimuladas con TNF- α y luego sometidas al tratamiento con los complejos de cobre 3 y 4. Para llevar a cabo este ensayo se usaron dos modelos celulares, en monocapa y esferoides multicelulares. El tratamiento fue por 24 h, a concentraciones sub-citotóxicas, 0.5 y 1 μ M en el caso de monocapa y desde 5 a 15 μ M para esferoides. Luego el efecto fue evaluado mediante citometría de flujo.

Los resultados de estos experimentos están representados en la figura 4.3.1 mediante gráfico de barras (en la [figura 15](#) del anexo se pueden observar los dot-plot obtenidos del análisis por citometría de flujo). En el control puede observarse que mientras la fluorescencia de la proteína verde fluorescente (GFP) no se detectó en ausencia de TNF- α , esta señal aumenta considerablemente cuando se añade el estímulo (se considera 100%), confirmando la activación de la vía NF κ B en este sistema experimental. Cuando se añaden los complejos se observa la disminución de la señal emitida por GFP sugiriendo que la vía estudiada fue inhibida por acción de estos.

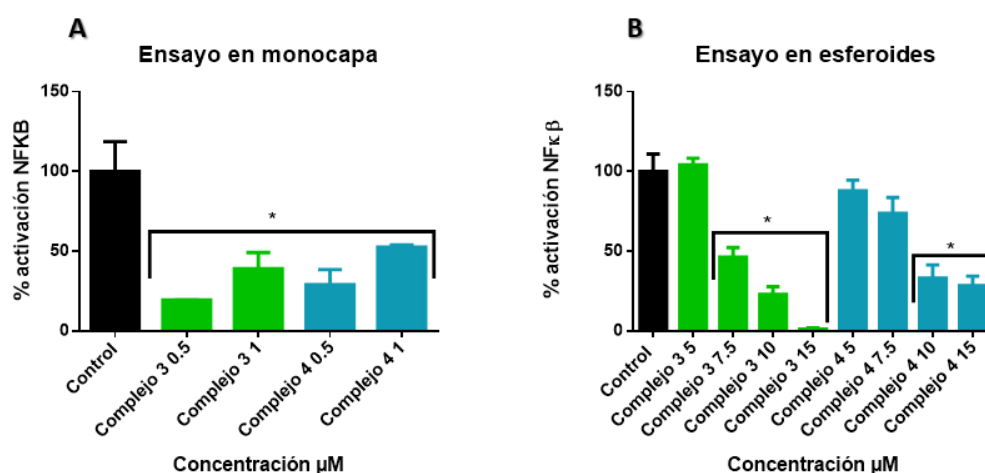


Figura 4.3.1. Efecto de los complejos de cobre 3 y 4 sobre la vía NFκB en monocapa (A) y esferoide (B). Se usó la línea HT-29-NFκB-hrGFP. Los resultados se expresan como el promedio \pm SEM ($n=3$). *Diferencia significativa con el control ($p<0.05$). #Diferencia significativa entre complejo 3 y 4 ($p<0.05$).

En el sistema de monocapa se observa una gran inhibición de la vía. Todas las concentraciones usadas muestran una diferencia significativa con respecto al control ($p<0.05$). Sin embargo, entre los complejos no se observan diferencias significativas. Bajo la acción del complejo 3, a $0.5 \mu\text{M}$, se produce una disminución de la activación de la vía del 80%, y con el complejo 4 este porcentaje es del 71% aproximadamente. Al aumentar la concentración en ambos casos, se observa un 61% de inhibición para el complejo 3 y del 47% para el complejo 4 aproximadamente.

En el modelo 3D, luego del tratamiento con el complejo 3, se obtuvo una significativa disminución en la activación de la vía con respecto al control, a partir de $7.5 \mu\text{M}$. El porcentaje de inhibición, a esta concentración, fue de aproximadamente el 53.77%, a medida que aumentó la concentración, este porcentaje se incrementó, a 77% y 98.7% a $10 \mu\text{M}$ y $15 \mu\text{M}$ respectivamente ($p<0.05$). El complejo 4, de la misma manera fue capaz de inhibir esta vía, pero se obtuvo porcentajes de inhibición menores, a $7.5 \mu\text{M}$ fue del 26.3%, a $10 \mu\text{M}$ aumentó a 66.8% y a la concentración más elevada el porcentaje de inhibición que se logró fue del 71.7% con respecto al control ($p<0.05$).

A partir de los resultados obtenidos se puede decir que, en el modelo 3D, el complejo 3 actúa como un inhibidor más potente de esta vía, en comparación con el complejo 4.

Estos resultados coinciden con los obtenidos anteriormente, el complejo 3 mostró mayor actividad citotóxica, además de provocar una muerte celular programada mediada por la generación de especies reactivas y provocando además, oxidación y daño del material genético, además de la inhibición de la migración. Estos procesos mencionados podrían estar relacionados con la inactivación de la vía $\text{NF}\kappa\beta$ debido a todos los procesos, relacionados a la tumorigénesis, que regula.

El estado redox de la célula es crítico para la actividad de factores nucleares de transcripción, donde por ejemplo, los efectos pro-apoptóticos de JNK (c-jun N-quinasa terminal) resulta de la inhibición de la vía $\text{NF}\kappa\beta$ (Nicco *et al.*, 2005). Es decir, existe una relación entre $\text{NF}\kappa\beta$ y JNK. $\text{NF}\kappa\beta$, previene la activación de JNK, y por ende previene la muerte celular a través de apoptosis o necrosis (Morgan & Liu, 2011). En este caso al estar inhibida la vía del factor nuclear $\kappa\beta$, se activa JNK, activando la expresión de proteínas pro-apoptóticas, promoviendo la muerte celular.

Las especies reactivas del oxígeno a su vez tienen implicancias en esta vía de señalización. Por un lado, ERO modula la respuesta de $\text{NF}\kappa\beta$ y los genes target de $\text{NF}\kappa\beta$ atenúan la producción de ERO promoviendo la supervivencia celular. Una de las maneras en las cuales la actividad de $\text{NF}\kappa\beta$ tiene influencias sobre los niveles de ERO, es aumentando la expresión de proteínas antioxidantes, como por ejemplo: manganeso superóxido dismutasa, tioredoxina 1 y 2, glutatión peroxidasa-1, entre otras, (Morgan & Liu, 2011). Por ende, los complejos al inhibir la vía $\text{NF}\kappa\beta$, no protegen a las células del exceso de ERO, si no por el contrario, se genera mayor producción de especies reactivas del oxígeno.

Por otro lado, la oxidación directa de $\text{NF}\kappa\beta$ por las especies reactivas del oxígeno, inhibe la habilidad del primero de unirse al ADN, y por lo tanto de activar la transcripción de genes *targets*. Ejemplo de ellos es una cisteína específica, p50 (miembro de la familia de $\text{NF}\kappa\beta$), es sensible a la oxidación, lo que hace que disminuya su actividad transcripcional. También las especies reactivas del oxígeno, producen modificación en $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ (inhibidor de $\text{NF}\kappa\beta$), evitando su degradación y en conclusión la activación de $\text{NF}\kappa\beta$. IKK (quinasas) son otros *target* de EROs, que tienen influencia en la señalización de $\text{NF}\kappa\beta$. Ensayos con

H₂O₂, han demostrado, en algunas líneas celulares, que inactiva las enzimas IKK, por la oxidación de una cisteína, inactivando su actividad de quinasa, llevando a una reducción en la señalización de NFκβ (Morgan & Liu, 2011).

4.4 Determinación del cobre intracelular mediante ICP-MS

Un aspecto importante, el cual puede relacionarse con los resultados diferenciales observados en cuanto a la citotoxicidad y los mecanismos de acción entre los complejos de cobre, es el nivel de cobre intracelular, estrechamente relacionado con las diferencias en la captación celular. Por esta razón, se cuantificó la acumulación de cobre intracelular en las células de la línea tumoral HT-29. Las mismas fueron tratadas por 24 hrs con los valores de IC₅₀ de los metalofármacos de cobre, 1.5 μM para el complejo 3 y 2.5 μM para el complejo 4. Subsecuentemente las células fueron lisadas y se determinó la acumulación de cobre por absorción atómica inducida acoplada a plasma (ICP-MS).

| Muestra | ICP | % Cu |
|---------------------|-------------|--------|
| Control | 0.088 mgr/L | 0.13% |
| Complejo 3 (1.5 μM) | 0.683 mgr/L | 63.24% |
| Complejo 4 (2.5 μM) | 0.745 mgr/L | 48.06% |

Tabla 4.4.1. Resultados del ICP. Determinación de la acumulación de cobre en la línea celular HT-29.

Los resultados de ICP-MS están resumidos en la tabla 4.4.1. Los resultados representan la acumulación intracelular de cobre normalizado por la cantidad de cobre de los complejos agregada. Las células en estado basal tienen un 0.13% de cobre, mientras que las células tratadas con los complejos de cobre 3 y 4 presentan un 63.24% y un 48.06% de cobre intracelular respectivamente. Es decir, la incubación con 1.5 μM del complejo 3 aumenta los niveles intracelulares basales de cobre alrededor de 486 veces, al comparar el porcentaje de Cu intracelular respecto al basal. En el caso del tratamiento con 2.5 μM del complejo 4, se alcanzan valores de 369 veces más con respecto al basal. Estos resultados podrían explicar en parte la mayor actividad observada para el complejo 3 por sobre el complejo 4.

El efecto potencial del cobre parece ser que se produce en determinadas circunstancias, como por ejemplo el uso de quelantes del cobre pueden cruzar la membrana plasmática

e ingresar a la célula, o cuando el cobre se acumula en las células. Estudios previos reportaron que el tratamiento de las células con CuSO_4 incrementaba el cobre ligeramente (Cai *et al.*, 2007). En este trabajo se midió el contenido de cobre intracelular a las 24 hrs del tratamiento y se reportó su aumento con respecto al control, en especial del complejo con el ligando dmp. Cu^{2+} no puede cruzar fácilmente la membrana celular por su carga positiva y su hidrofiliidad. En este caso la lipofiliidad de la fenantrolina ayuda al transporte del cobre a través de las membranas biológicas, lo que causa la acumulación excesiva del cobre en las células.

4.5 Estudios de los efectos de los complejos en modelos *in vivo*

4.5.1 Estudio de la vía Wnt/ β -Catenina en *Xenopus laevis*

En 1990, muchos genes claves que participan en la embriogénesis del *Xenopus* fueron descubiertos, y estudios moleculares se desarrollaron para describir su actividad en las vías de señalización. Muchos de los conocimientos sobre las vías de señalización son importantes porque la transformación morfológica del embrión proviene de la modulación genética de los componentes claves del desarrollo y también de su modulación química. Este segundo enfoque usa pequeñas moléculas orgánicas que potencialmente alteran la función de 1 o más genes. Por lo que el uso de químicos que alteran la embriogénesis, pueden ser usados entre otras cosas, para el *screening* de drogas.

Cabe explicar que durante el desarrollo embrionario temprano, cualquier transformación morfológica depende de un complejo arreglo molecular. La mayor transformación pasa por la gastrulación y la formación del sistema nervioso, y asumir un cuerpo bilateral. La gastrulación se trata de un comportamiento migratorio asimétrico, ya que especifica ejes primarios: la zona marginal dorsal, la cual activa la formación de la cabeza y estructuras dorsales, como el sistema nervioso, mientras la zona lateral y ventral que involucra el desarrollo de las estructuras posteriores como la cola y tejidos como la sangre, en patrones migratorios coordinados. La activación de la vía Wnt/ β -Catenina es necesaria para la formación de estructuras posteriores, mientras que su inhibición permite la formación de cabezas de embriones. Algunas rutas de señalización

afectan el equilibrio molecular durante la embriogénesis temprana de *Xenopus*, la vía Wnt/ β -Catenina cuando se altera produce fenotipos más sencillos y reproducibles. Aumentar o reducir la expresión de la vía, resulta en una distribución espacial alterada, y la consecuente formación de un embrión ventralizado o dorsalizado respectivamente (Maia *et al.*, 2017). Además, la señalización constitutiva de esta vía es esencial para la proliferación de las células, y su supresión puede resultar en la inhibición del crecimiento celular (Li *et al.*, 2015).

Por estas razones, se decidió usar este modelo para ensayar los efectos de los complejos de cobre sobre la vía Wnt/ β -Catenina. Ambos complejos de cobre se ensayaron en un amplio rango de concentraciones. Para ello, se hicieron varias pruebas con la finalidad de elegir las concentraciones apropiadas.

Primero se probaron 4 concentraciones, 50, 100, 200 y 500 μ M, de ambos complejos. Sin embargo, los embriones al ser tratados resultaron ser no viables debido a la citotoxicidad de los complejos, sólo los embriones del control permanecieron viables. En las fotografías (figura 4.5.1.1) se observó pérdida de la viabilidad de los embriones evidenciada por el color blanco de los mismos, luego comienzan a degradarse, eliminando el vitelo. En este ensayo el complejo 3 sigue siendo el compuesto más citotóxico, ya que a partir de 100 μ M, ningún embrión sobrevivió, mientras que con el complejo 4, los embriones murieron a partir de 200 μ M.

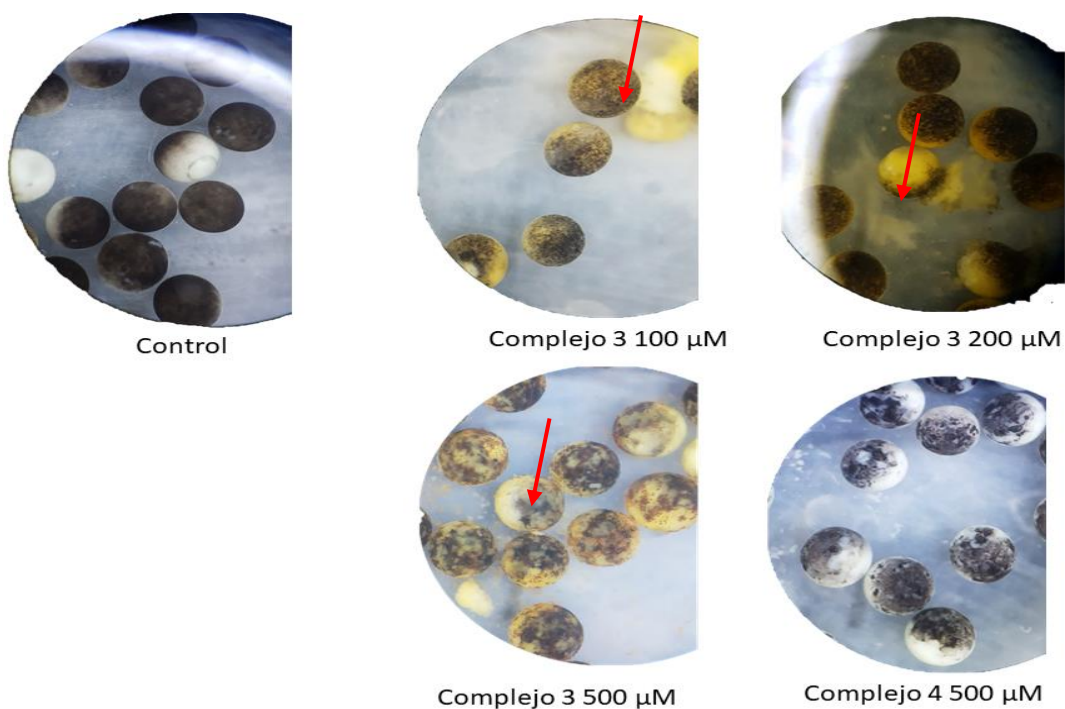


Figura 4.5.1.1. Fotografías de los embriones control y tratados por ambos complejos. Las flechas indican restos de vitelo. Las mismas fueron tomadas con lupa.

Con estos resultados se eligió y acotó el rango de concentraciones para el tratamiento, para el complejo 3 fueron: 5, 10, 20 y 50 μM (esta última resultó tóxica), y para el complejo 4 las concentraciones usadas fueron, 50, 75, 100 y 150 μM . Luego de analizar los embriones mediante lupa, y agruparlos según sus características morfológicas se obtuvieron los resultados expresados en la tabla 4.5.1.2.

| Complejo 3 | DAI (índice dorso-anterior) |
|------------------|-----------------------------|
| 5 μM | 4.15 |
| 10 μM | 4.07 |
| 20 μM | 3.52 |

| Complejo 4 | DAI (índice dorso anterior) |
|-------------------|-----------------------------|
| 50 μM | 4.25 |
| 75 μM | 3.7 |
| 100 μM | 3.9 |
| 150 μM | 2.7 |

Tabla 4.5.1.2. Resultados de los DAI, según los cambios morfológicos de *Xenopus* obtenidos luego del tratamiento.

DAI Nº5



DAI Nº 4



DAI Nº 3



DAI Nº 2



DAI Nº 1



Figura 4.5.1.3. Alteraciones morfológicas obtenidas de los embriones luego del tratamiento con los complejos de cobre.

Los análisis morfológicos mostraron que el tratamiento con los complejos de cobre induce un fenotipo anormal en los cuales los embriones pierden las estructuras dorso-anteriores (representados en la figura 4.5.1.3). La alteración del patrón axial de los embriones de *Xenopus*, sugiere una modulación inhibitoria de la vía Wnt/ β -Catenina.

A partir de los resultados obtenidos podemos decir que el complejo 4 parece tener mejor efecto en cuanto a la inhibición de la vía, ya que a la concentración de 150 μM , se obtiene un índice dorso-anterior (DAI) de 2.7. Sin embargo, la concentración es más alta que para el complejo 3, además es una concentración límite con respecto a la citotoxicidad impartida por el complejo 4.

A la concentración de 20 μM del complejo 3 se obtiene un DAI de 3.5, donde el 31% de los embriones tienen morfología normal, mientras un 69% presenta alguna alteración morfológica. Un valor similar se obtiene cuando los embriones son tratados con 100 μM del complejo 4, el DAI de 3.9, donde un 34% son embriones normales y 66% tienen morfología alterada. No obstante, cabe destacar que para lograr un efecto similar se utilizó una concentración 5 veces mayor.

Los compuestos como los flavonoides han demostrado tener efectos sobre esta vía. Isoquercetin, por ejemplo, interfiere con el desarrollo del *Xenopus*, mediante su capacidad de causar microcefalia o embriones sin cabeza, ya que puede inhibir la acción de la vía Wnt/ β -Catenina, lo cual fue demostrado además en ensayos *in vitro* con células derivadas de cáncer de colon. Ensayos recientes, descubrieron que derricin y derricidin (subclase de chalcone, un flavonoide), fueron capaces de inhibir la vía Wnt/ β -Catenina en *Xenopus*. Estos resultados están relacionados con los experimentos realizados en células de cáncer de colon, que identificaron a estos químicos como moduladores negativos de la vía (Amado *et al.*, 2014) (Maia *et al.*, 2017).

4.5.2 Estudio de los efectos de los complejos sobre un tumor colorrectal subcutáneo en ratón N:NIH (S) *Fox1^{nu}*.

Con el fin de evaluar la actividad antitumoral de los complejos 3 y 4 en un sistema *in vivo* se estudiaron los efectos del tratamiento sobre el peso del ratón y el crecimiento tumoral los que fueron monitoreados desde el momento en que el tumor alcanza un tamaño de 0.4 x 0.3 mm. Estas mediciones se realizaron 3 veces por semana. El peso de los ratones control, aumento aproximadamente un 16% desde el inicio del tratamiento, mientras que los ratones tratados con el complejo 3 y 4, este parámetro se mantuvo casi invariable. Estadísticamente, entre los promedios de los pesos, se observan

diferencias significativas entre las 3 condiciones, en la tercera semana de inoculación ($p < 0.05$). En cuanto al volumen tumoral, se observa un aumento significativo luego de la tercera semana de tratamiento con el complejo 4, el tratamiento con el complejo 3 resulto en un mantenimiento de este parámetro, con diferencias significativas con respecto al control ($p < 0.05$) (figura 4.5.2.2).

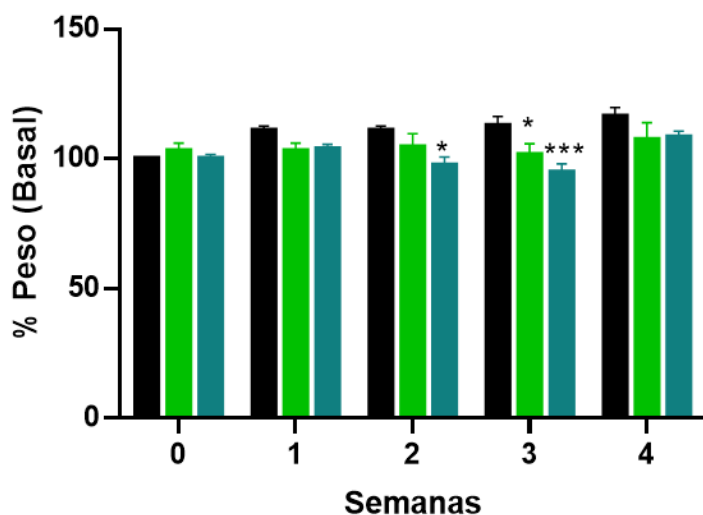


Figura 4.5.2.1. Variaciones del peso total de los ratones durante las 4 semanas de tratamiento con los complejos 3 y 4 de cobre. Línea negra corresponde a los ratones control, línea celeste corresponde a los ratones de la caja 2 tratados con el complejo 3 y línea celeste, ratones de la caja 3, tratados con el complejo de cobre 4. Los valores están representados como promedio \pm SEM.

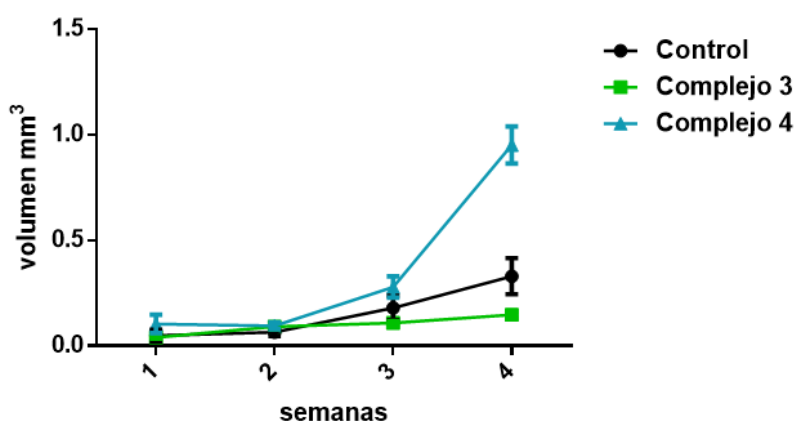


Figura 4.5.2.2. Variaciones del volumen tumoral durante las semanas de tratamiento. Línea negra corresponde a los ratones control, línea celeste corresponde a los ratones de la caja 2 tratados con el complejo 3 y línea celeste, ratones de la caja 3, tratados con el complejo de cobre 4. Los valores están representados como promedio \pm SEM.

Con respecto a la histopatología, los órganos, riñón e hígado, sufrieron cambios mínimos. El hígado de los ratones control (ratones con tumor implantado), evidenció estructura de los hepatocitos conservadas. Se observó, además un moderado infiltrado periductal de leucocitos, a predominio mononuclear. En la fotografía de la figura 4.5.2.3 se observa el espacio porta tapizado por células epiteliales típicas, además de los sinusoides y las células de Kupffer, todos en estado normal. Bajo el tratamiento con el complejo de cobre 3, el hígado sufrió cambios mínimos que pueden observarse en la figura 4.5.2.4. La vena centrolobulillar, se encuentra levemente dilatada, al igual que los espacios sinusoidales, y un leve aumento de las células de Kupffer. Sin embargo, la arquitectura de los hepatocitos mantiene su estructura normal. Los ratones tratados con el complejo 4, sufrieron importantes alteraciones hepáticas, entre ella se puede mencionar, parénquima hepático con cambios reactivos, en el que hay un mayor aumento de células de Kupffer y mayor acúmulo de células inflamatorias. Además, se observa inflamación del lobulillo, y una zona de necrosis focal. Esta última produce una respuesta inflamatoria con acúmulos de linfocitos y de células de Kupffer. En estos sitios hay colapso y ruptura de la trama reticular, que se producen por la exposición a drogas o tóxicos (*Hepatopathology for gastroenterologists and hepatologists. Part Two: Useful terminology in the interpretation of the histopathological findings*, n.d.). En algunas células se observan vacuolas citoplasmáticas, indicando una posible edematización (figura 4.5.2.5). El edema celular es el aumento del volumen celular, y puede ser un evento fisiológico como respuesta al estrés oxidativo, así como respuesta a la injuria celular por depleción del ATP. Morfológicamente se observan células más grandes, con citoplasma claro, vacuolado (*Hepatopathology for gastroenterologists and hepatologists. Part Two: Useful terminology in the interpretation of the histopathological findings*, n.d.).

Estas observaciones fueron reforzadas por los resultados de los análisis de sangre, donde el control y los ratones tratados con el complejo 4 mostraron valores de AST (aspartato aminotransferasa) y ALT (alanina aminotransferasa) elevadas comparadas con los ratones tratados con el complejo de cobre 3. Sin embargo, la enzima γ GT mantuvo sus valores constantes en las 3 situaciones (tabla 4.5.2.1). En la lesión e inflamación hepatocelular, predominan los aumentos de las transaminasas (AST y ALT), entre otras

causas, es generada por efectos tóxicos de medicamentos. Estas son liberadas al suero luego de una lesión extensa en el tejido (Tien *et al.*, 2016). Numerosos estudios han notado elevaciones en los niveles de AST y ALT atribuidos a una hepatotoxicidad estimulados por diversos tóxicos en varios modelos animales (Aldubayan *et al.*, 2019), tal como ocurre con el complejo de cobre 4. Los aumentos en estas enzimas pueden ser interpretadas como daño o como cambios en la permeabilidad de la membrana (Aldubayan *et al.*, 2019), sugiriendo que este último complejo puede causar daños hepatocelulares.

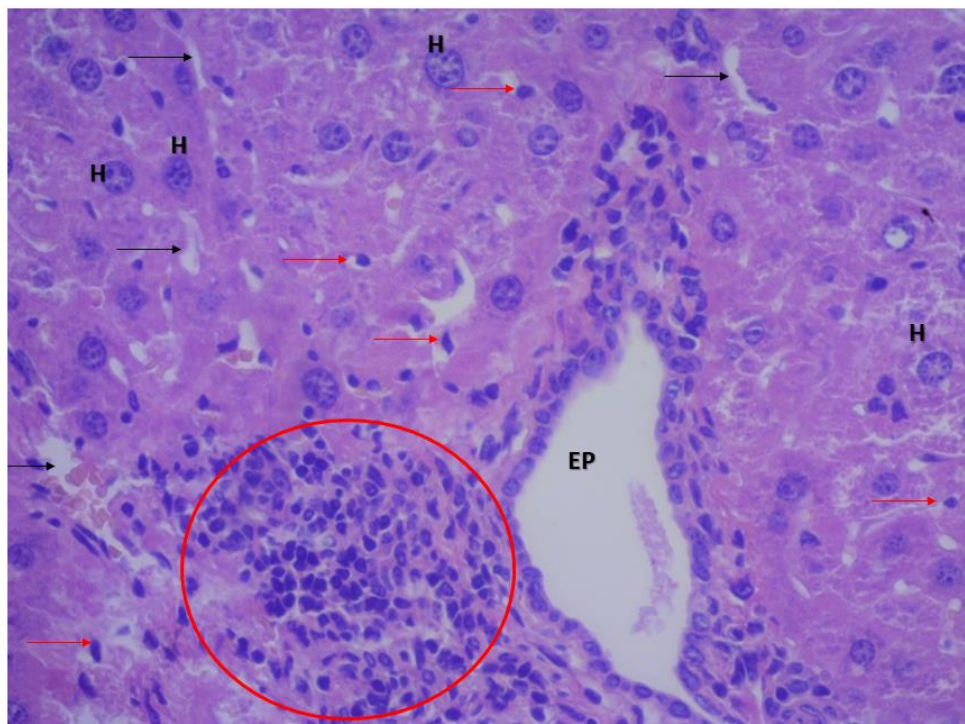


Figura 4.5.2.3. Hígado de ratones control. Hematoxilina-eosina 40x. Teñidos con H&E. La infiltración está indicada con un círculo rojo, flecha negra, indica los sinusoides hepáticos, y las rojas indican las células de Kupffer. Espacio porta (EP). Hepatocitos (H).

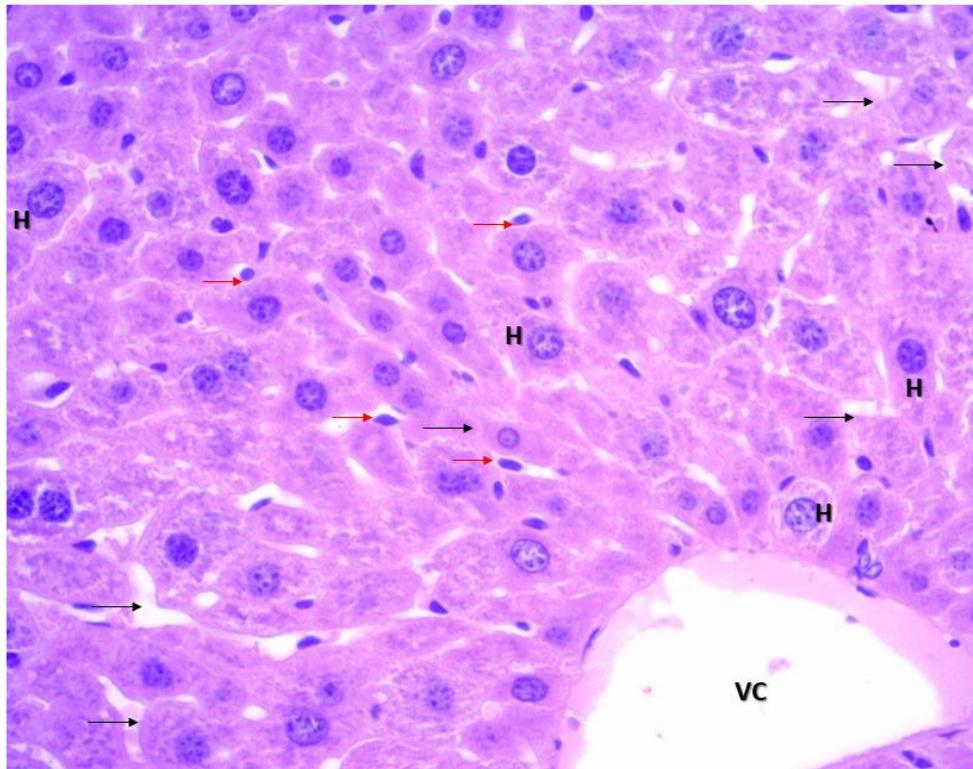


Figura 4.5.2.4. Hígado de ratones tratados con el complejo 3 de cobre. Hematoxilina-eosina 40x. Teñidos con H&E. Flecha negra, indica los sinusoides hepáticos, y las rojas indica las células de Kupffer. Vena centrolobulillar (VC). Hepatocitos (H).

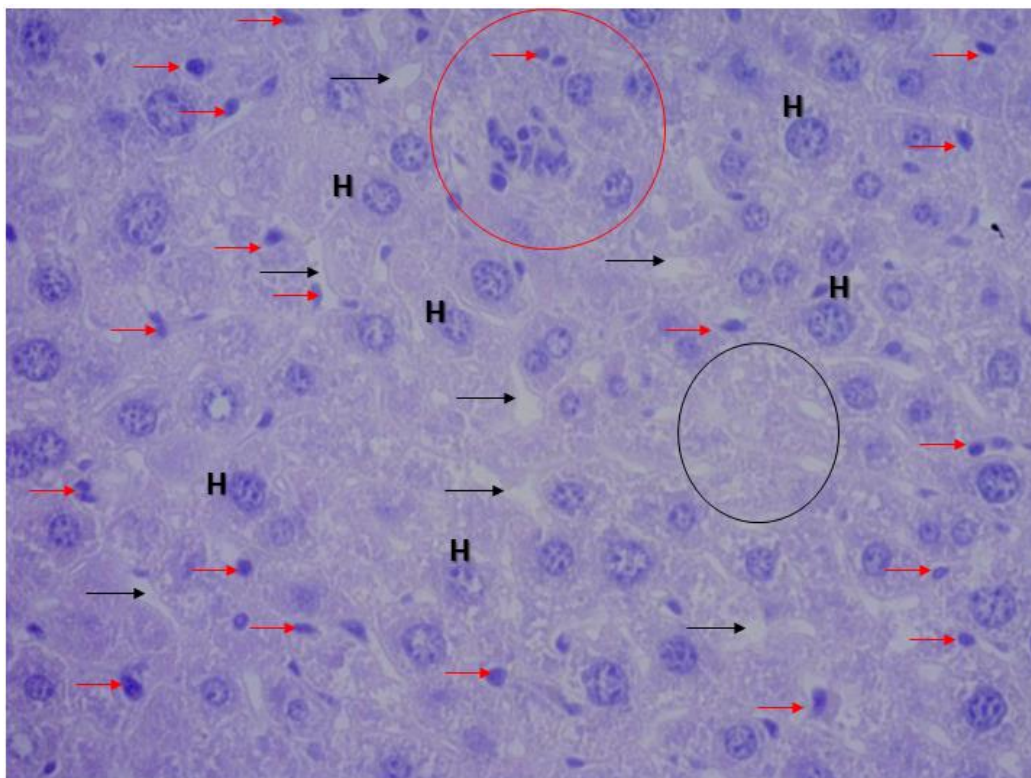


Figura 4.5.2.5. Hígado de ratones tratados con el complejo 4 de cobre. Hematoxilina-eosina 40x. Teñidos con H&E. Círculo rojo, indica los infiltrados por células inflamatorias, círculo negro indica la zona de necrosis focal. Flecha negra, indica los sinusoides hepáticos, y las rojas indica las células de Kupffer. Hepatocitos (H).

| Condición de ratones | AST (UI/l) | ALT (UI/l) | γ GT (UI/l) |
|----------------------|----------------|------------------|--------------------|
| Caja control | 99.6 \pm 9.6 | 149.3 \pm 17.7 | 3.3 \pm 1.2 |
| Caja complejo 3 | 54.6 \pm 2.3 | 108 \pm 11.5 | 3.3 \pm 1.2 |
| Caja complejo 4 | 122 \pm 36.5 | 126 \pm 1.7 | 3.6 \pm 0.88 |

Tabla 4.5.2.1. Valores de las enzimas hepáticas de los ratones en las 3 condiciones estudiadas. Valores promedios \pm SEM.

Por otro lado, se analizó mediante técnicas histológicas el riñón. La figura 4.6.2.6, pertenece al riñón del grupo control, en la misma se pueden observar 2 glomérulos renales congestivos, con eritrocitos en su interior. Si bien se observa celularidad glomerular normal sin aumento de mesangio u otro depósito, hay una leve expansión del espacio de Bowman. Las células de los túbulos, presentan cambios citoplasmáticos tipo edema. En cuanto al riñón del grupo tratado con el complejo 3 de cobre (figura 4.5.2.7) la celularidad del glomérulo es normal, con una estructura conservada, y no se observa expansión del espacio de Bowman, y hay menor cantidad de eritrocitos en los capilares. La estructura de los túbulos está conservada, sin embargo, las células

presentan cambios citoplasmáticos que denotan la presencia de edema. No se observa infiltrado leucocitario en el tejido, y la mácula densa no presenta aumento de celularidad. Por último, el grupo de ratones tratados con el complejo 4, revela glomérulos congestivos, con eritrocitos en los capilares. La fotografía de la imagen 4.5.2.8, revela tumefacción y proliferación de las células glomerulares sin aumento de mesangio u otro depósito. Las células de los túbulos presentan los mismos cambios citoplasmáticos que las dos situaciones anteriores, y además presentan un mínimo aumento de células intertubulares (células alargadas, en forma de huso), que podría también tratarse de linfocitos.

Los resultados de los análisis de sangre revelaron que en los ratones tratados, los valores de creatinina disminuyen, con respecto al control, siendo más pronunciada en los ratones tratadas con el complejo 3.

En cuanto a los valores de urea de los ratones controles son elevados en comparación a los ratones tratados con ambos complejos, entre los cuales no hay diferencia estadística ($p < 0.05$). Estos datos pueden observarse en la tabla 4.5.2.2. Estos datos sumados a la evaluación histopatológica, podrían revelar una nefritis intersticial aguda en el caso de ratones tratados con el complejo 4. Esta patología puede ser categorizada en 3 grupos, uno de los cuales es el inducidos por drogas, y es definida por características histológicas distintivas, como infiltrado mononuclear con edema en el intersticio renal, y características funcionales, como aumento en los valores de urea y creatinina (Li Cavoli *et al.*, 2015).

Situaciones similares, en cuanto a la disminución de trasaminasas y valores de urea y creatinina, fueron encontrados por otros investigadores en experimentos análogos, indicando que los quimioterapicos no tenían efectos tóxicos (Aldubayan *et al.*, 2019). Estos investigadores reportaron datos de AST Y ALT, en ratones control de 29.6 y 59.8 U/l, y de urea y creatinina de 26.53 y 0.41 mg/dl. Estos valores aumentan en ratones con tumor. Las enzimas hepáticas tienen un valor de 74.6 y 112.8 U/l, y los marcadores de funcionalidad renal aumentan a 1.16 mg/dl la creatinina y de 40.01 mg/dl, la urea. Al ser

tratados estos valores disminuyen a valores similares al control sin tumor (Aldubayan *et al.*, 2019)

| Condición de ratones | Urea (mg/dl) | Creatinina (mg/dl) |
|----------------------|--------------|--------------------|
| Caja control | 55±4.6 | 0.43±0.01 |
| Caja complejo 3 | 39.3±8.9 | 0.25±0.06 |
| Caja complejo 4 | 33.6±11.6 | 0.34±0.05 |

Tabla 4.5.2.2. Valores de creatinina y urea, en las 3 condiciones estudiadas. Valores promedios±SEM.

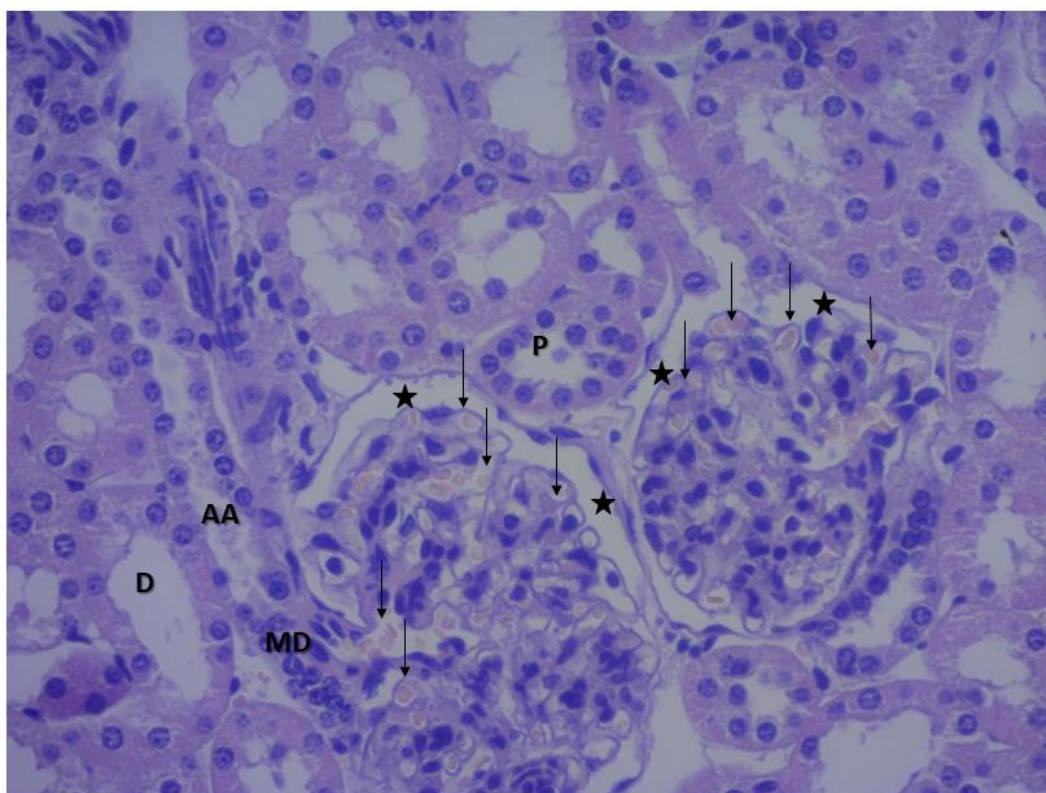


Figura 4.5.2.6. Riñón control. Hematoxilina-eosina 40X. Las flechas negras, indican eritrocitos. La estrella indica el espacio de Bowman. Túbulo proximal (P). Túbulo distal (D). MD (macula densa). AA (arteriola aferente).

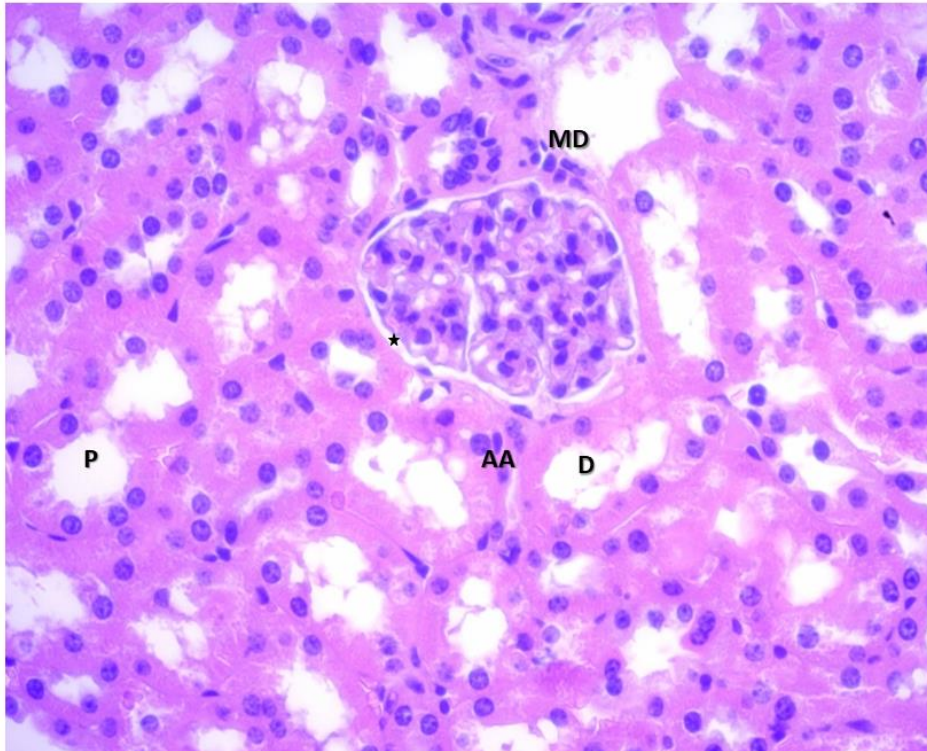


Figura 4.5.2.7. Riñón de ratones tratados con el complejo 3. Hematoxilina-eosina 40X. La estrella indica el espacio de Bowman. Túbulo proximal (P). Túbulo distal (D). MD (macula densa). AA (arteriola aferente).

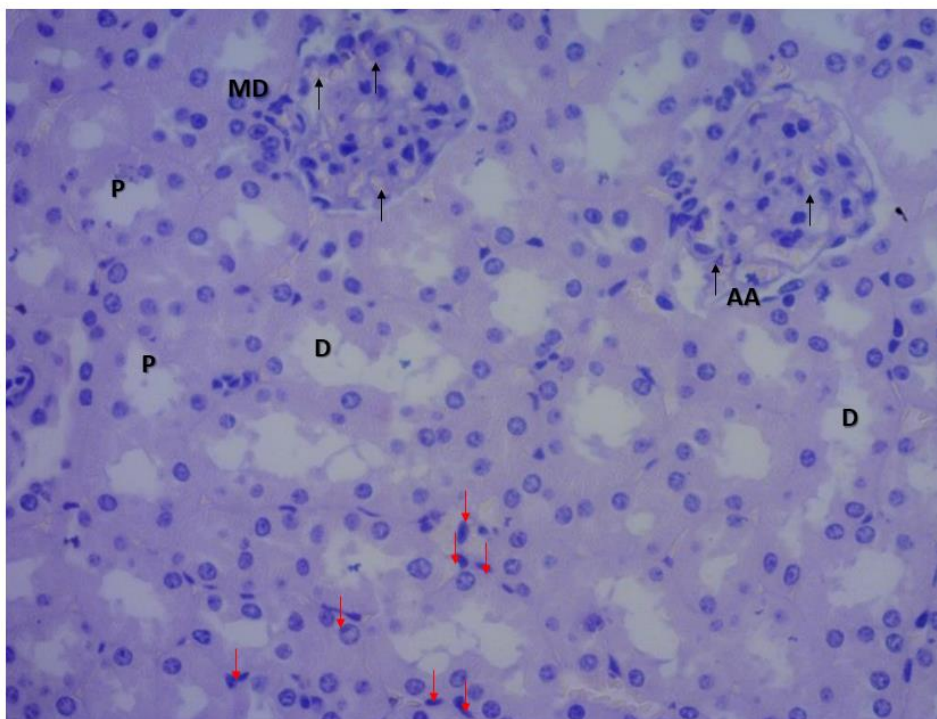


Figura 4.5.2.8. Riñón de ratones tratados con el complejo 4. Hematoxilina-eosina 40X. Las flechas negras, indican eritrocitos. Las flechas rojas indican células alargadas, podría tratarse de leucocitos. Túbulo proximal (P). Túbulo distal (D). MD (macula densa). AA (arteriola aferente).

El análisis histológico del tejido tumoral, de los ratones control revela, la presencia de células neoplásicas de aspecto epitelial, con pleomorfismo nuclear moderado e hiper cromasia, citoplasma anfófilos variables, que infiltran el musculo esquelético. A su vez, se detecta células en división mitótica. No se detectan zonas de necrosis (figura 4.5.2.9). Estos rasgos histopatológicos, entre otros, definen un proceso tumoral. En el tumor de los ratones tratados con el complejo 3, a poco aumento, 10X, se evidencia la presencia de una zona de necrosis regional, con sombras celulares rosadas centrales y picnosis nuclear periférica (figura 4.5.2.10). A mayor aumento, 40X, se observan cambios degenerativos/regresivos, yendo a necrosis celular. No se observan células en anillo de sello (figura 4.5.2.11). En las imágenes (figura 4.5.2.12) de los tumores pertenecientes al tratamiento con complejo 4, se observa células en necrobiosis con picnosis y cariólisis. Se puede evidenciar la presencia de gran número de células neoplásicas, algunas de ellas presentan vacuolas de moco, características de los tumores secretores. Se observan células en anillo de sello, marcado pleomorfismo nuclear e hiper cromasia. Este carcinoma, de células en anillo, tiene como característica morfológica un núcleo periférico con cierto relieve en la membrana celular y gran cantidad de mucina intracitoplasmática, adoptando la forma de una vacuola que le confiere en su totalidad el aspecto de “anillo de sello” (Díaz-Sánchez *et al.*, 2015).

La necrosis tumoral se define como la presencia de cúmulos homogéneos de células tumorales muertas o degeneradas que forman un coágulo amorfo eosinofílico con tinción de hematoxilina-eosina. En ocasiones se pueden detectar las sombras de las que fueron las células tumorales (Richards *et al.*, 2012). La patogénesis de la necrosis tumoral no está del todo clara. Algunos investigadores sostienen que podría ser consecuencia de un crecimiento tumoral excesivo, que sobrepasa la capacidad del aporte vascular del tumor. Según la hipótesis planteada por Hemmerlein, la hipoxia crónica facilitaría la selección de clones tumorales más resistentes, con la consecuente degeneración de los restantes que acabarían sufriendo necrosis tumoral. Por otro lado, investigadores sugirieron que la presencia de necrosis coagulativa tumoral extensa, podría ser el resultado de la respuesta inmune antitumoral y podría representar un grupo de tumores en regresión, como resultado de un mecanismo inmune. Los mecanismos que apoyan la relación entre necrosis y supervivencia, no están claras todavía. Una de las hipótesis es

que la necrosis tumoral puede impactar en la supervivencia del cáncer colorrectal, mediante la influencia sobre la respuesta inmune inflamatoria del huésped. En efecto, hay una evidencia de otros tipos de tumor en la que la necrosis está asociado con marcadores de inflamación sistémica, incluidos recuento de glóbulos blancos y velocidad de sedimentación globular. Muchos estudios, indican que el impacto de la necrosis tumoral en la supervivencia del cáncer colorrectal debe ser explicada con relación a la respuesta inflamatoria del huésped (Richards *et al.*, 2012). Por otro lado, la toxicidad hepática y renal asociada a la tumorigénesis puede ser consecuencia de un daño causado por la producción excesiva de citoquinas como TNF- α (Aldubayan *et al.*, 2019).

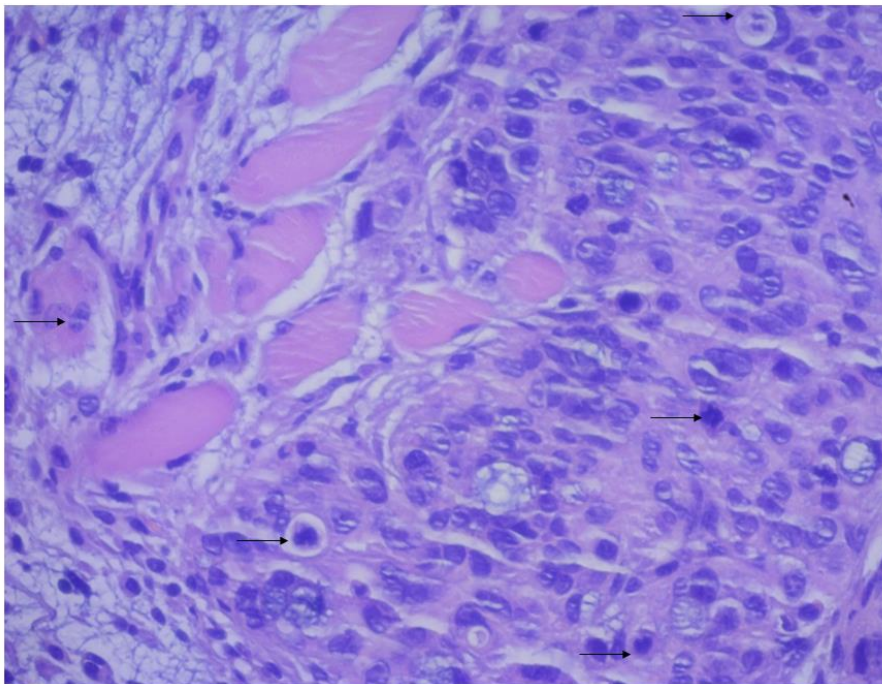


Figura 4.5.2.9. Tumor control. Hematoxilina-eosina 40x. Las flechas negras indican las mitosis. En el ángulo superior se observa un estroma mixoide.

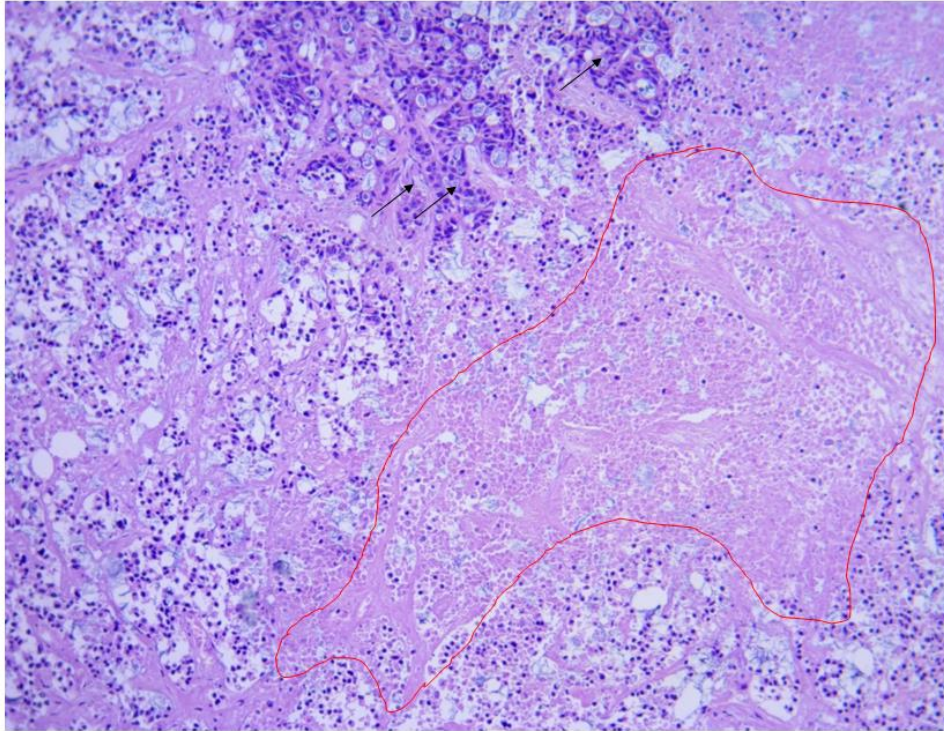


Figura 4.5.2.10. Tumor ratones grupo 2. Hematoxilina-eosina 10x. La zona delimitada con la curva roja indica zona de necrosis tumoral regional. La flecha negra indica zona de formación tubular.

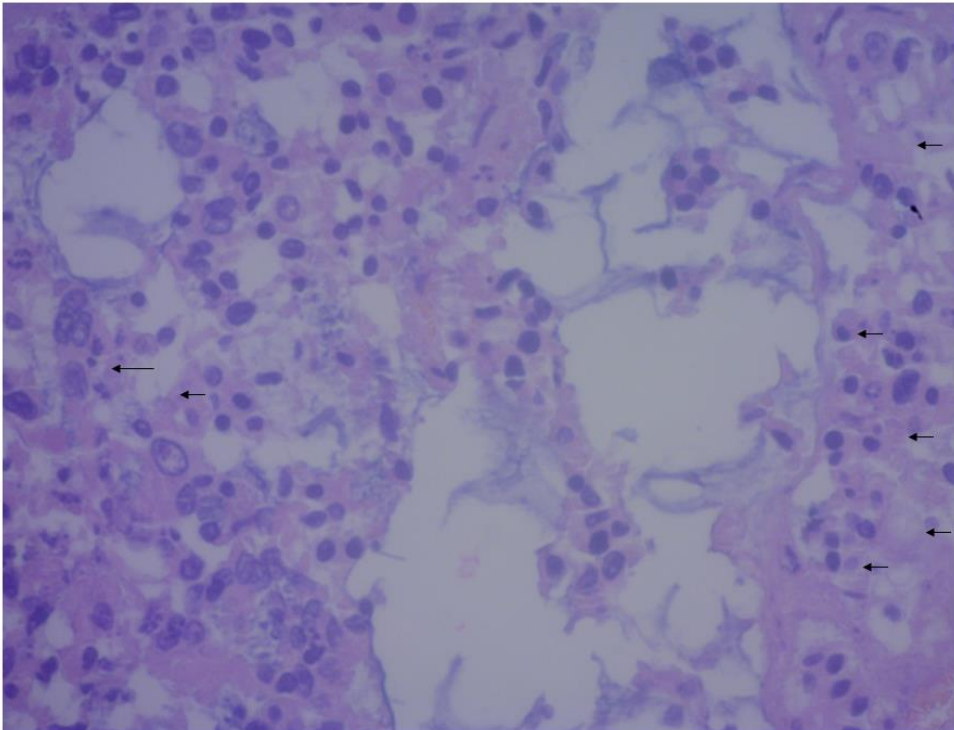


Figura 4.5.2.11. Tumor grupo 2. Hematoxilina-eosina 40x. Las flechas negras indican sombras celulares, producto de los cambios degenerativos/regresivos.

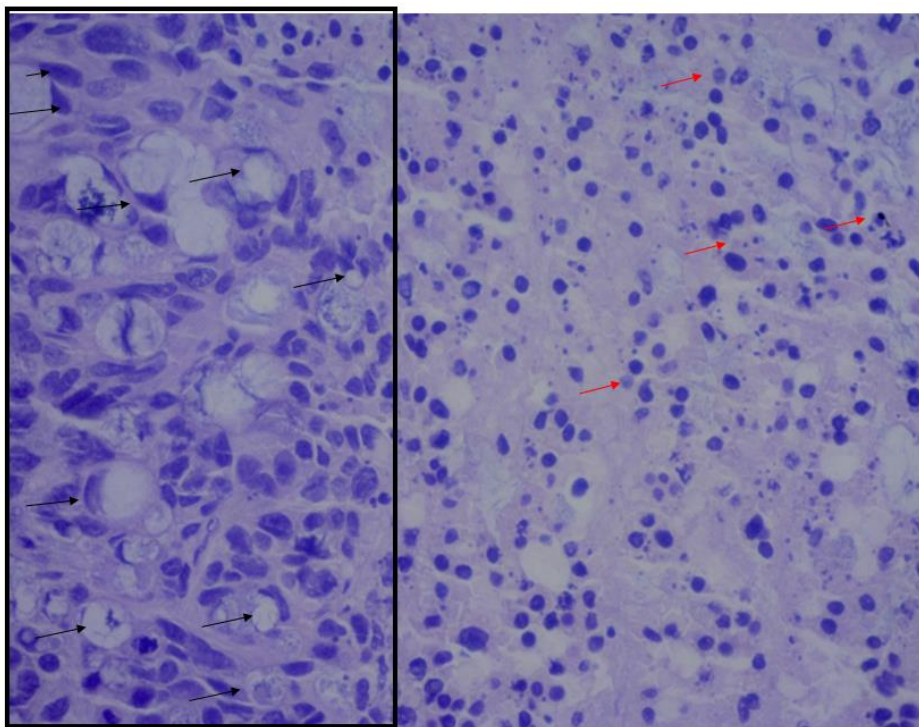


Figura 4.5.2.11. Tumor grupo 3. Hematoxilina-eosina 40x. Flechas rojas indican células con cariólisis y picnosis. El recuadro negro indica células neoplásicas viables. Las flechas negras indican las células en anillo de sello.

4.6 Conclusiones

En este estudio, los complejos de cobre 3 y 4, fueron evaluados por su capacidad de inhibir la proliferación de un panel de células tumorales, derivadas de osteosarcoma, de cáncer de pulmón, de mama y de cáncer colorrectal. Los complejos exhiben una significativa capacidad de reducir la viabilidad de estas células tanto en modelos en monocapa como en modelos de esferoides multicelulares, con valores de IC_{50} entre 1.44 y 6.48 μM , y 6.05 y 31.88 μM respectivamente. Los resultados indican que los complejos de cobre conteniendo ligandos heterocíclicos inducen un efecto anti proliferativo en las células dependientes de la concentración. La observación de apoptosis temprana y tardía mediante ensayos como doble tinción con anexina e IP mediante citometría de flujo, y tinción con NA/IP mediante microscopía de fluorescencia, luego del tratamiento con los complejos, incluyen algunos signos de apoptosis como alteración de la membrana citoplasmática, externalización de la fosfatidilserina, *blebbing* de la membrana y fragmentación del ADN. El número de células con características de apoptosis temprana, fue elevado con concentraciones bajas de los complejos y a bajos

tiempos. Sin embargo, cuando aumenta la concentración así como el tiempo de tratamiento, las características de apoptosis tardía y necrosis fueron dominantes.

Para elucidar los mecanismos subyacentes a los efectos antiproliferativos de los complejos de cobre, se estudiaron varios mecanismos de acción como la capacidad de producir EROs y alterar el PMM. La perturbación del potencial de membrana mitocondrial es uno de los eventos intracelulares tempranos que ocurren luego de la inducción de apoptosis. Las mitocondrias son los principales reguladores de mecanismos que controlan la supervivencia o muerte celular. Debido a ello se analizó la producción de EROs en las células tratadas, estos fueron significativamente elevados a bajas concentraciones de los complejos, en especial en la línea de mama MDA-MB-231 y en la línea tumoral de colon CACO-2. En apoptosis mediada por metales, las mitocondrias tienen un rol clave en mediar este proceso a través de los ERO inducidos por los complejos metálicos. La capacidad de los compuestos, en especial del complejo de cobre 3, de producir especies reactivas del oxígeno, quedó también demostrado en un ensayo in-silico, por la oxidación del reactivo ABTS y EPR. La producción excesiva de EROs es una señal que puede provocar el fracaso de la supresión de los factores anti-apoptóticos, lo que desencadena, en conclusión, apoptosis. Además, se utilizaron sondas fluorescentes para evaluar el potencial de la membrana mitocondrial, como efecto de la producción elevada de EROs. Se demostró la despolarización de la membrana mitocondrial, luego del tratamiento con los complejos de cobre, por liberación de DIOC6 al citoplasma desde la matriz mitocondrial. La producción excesiva de EROs desde la mitocondria y el colapso del PMM pueden activar las caspasas y consecuentemente provocar apoptosis. En este estudio los complejos 3 y 4, inducen una elevación significativa en la actividad de las caspasas 3/7 comparada con el control. Conjuntamente, la elevada producción de EROs, tiene implicancia directa sobre las macromoléculas, como proteínas, lípidos y ADN. LA alteración de esta última, fue evidenciada mediante el aumento en el *tail moment* estudiado por el ensayo cometa, lo cual sugiere roturas de simple y doble hebra de ADN. Este parámetro fue en aumento al ser tratados con la enzima ENDO III, lo cual reflejó el efecto de las especies reactivas del oxígeno sobre las bases purínicas. A partir de estos ensayos podemos concluir que el aumento de la producción de EROs, la alteración del PMM y la disminución del ratio GSH/GSSG representan el cambio redox del medio

ambiente celular, lo cual induce apoptosis por daño directo de las macromoléculas intracelulares y modificaciones en las moléculas sensibles a los cambios redox.

Aunque estos ligandos pertenezcan a la misma familia de compuestos, las diferencias estructurales entre ellos afectan con diferente grado de intensidad cuando son comparados en el mismo ensayo. Mediante el ensayo de espectroscopia de masa acoplada a plasma inducido (ICP-MS), se confirmó el ingreso de los complejos a las células, y además, reveló que el complejo 3 se acumula en mayor cantidad que el complejo 4, causa de que este complejo sea más activo como antitumoral.

Durante el proceso de carcinogénesis, dos eventos importantes son la migración y la invasión de las células tumorales, por lo que se estudió el efecto de los complejos sobre ellos así como la alteración de las metaloproteinasas implicadas. Se observó un efecto inhibitorio en la migración luego del tratamiento por 24 hrs con los complejos de cobre. El proceso de invasión, fue estudiado con esferoides, los cuales son más resistentes al tratamiento, debido al efecto conocido como resistencia mediada por adhesión. Estos modelos celulares fueron sensibles al tratamiento, ya que se observó disminución de la invasión. La expresión de MMP2 y MMP9 está asociada a los procesos de invasión y metástasis del cáncer. La expresión de estas enzimas disminuye luego del tratamiento con los complejos de cobre.

Se estudió el efecto de los complejos sobre la vía $\text{NF}\kappa\beta$, la cual coordina a su vez varias vías de señalización importantes, y promueve la transición epitelio-mesenquimal, característica de varios tipos de cáncer. Debido a su participación en el desarrollo del cáncer, muchas investigaciones se centran en $\text{NF}\kappa\beta$ como potencial *target* de varias drogas antitumorales. La misma se vio inhibida luego de la estimulación con $\text{TNF-}\alpha$ por el tratamiento con los complejos de cobre, tanto en el sistema 2D así como en el sistema de esferoides multicelulares.

La alteración de la vía Wnt/B-Catenina se estudió por el ensayo de Xenopus. La función y expresión alterada de esta vía de señalización, como resultados de mutaciones en sus componentes, como en APC o en B-Catenina, contribuyen al desarrollo de una gran variedad de cánceres, en especial al cáncer colorrectal. Los datos obtenidos demuestran

que los complejos exhiben efecto inhibitorio sobre esta vía, ya que en los *Xenopus* se observó una ventralización de las estructuras. La inhibición de esta vía concuerda con la capacidad antiproliferativa de estos complejos sobre las líneas celulares testeadas.

Por otro lado, para completar la caracterización de la actividad de estos complejos, se generó un modelo tumoral en ratones inmunodeficientes. Los ratones, que fueron inoculados con un pool de células HT-29, desarrollaron un tumor sólido en la zona del cráneo luego de 14 días. Después del tratamiento durante 4 semanas con el complejo de cobre 3, el tumor subcutáneo, mostró una clara reducción en el tamaño, indicando que el compuesto ejerce un efecto inhibitorio sobre las células tumorales. Estos datos, además, están evidenciados por las características histopatológicas del tejido tumoral post-tratamiento, y por la actividad antiproliferativa, demostrada en experimentos *in vitro*. En los ratones control, es decir ratones con tumor pero sin tratar, el aumento de las transaminasas y de urea y creatinina puede indicar un daño hepático y renal causado por las células cancerígenas, que provocan la liberación de mediadores inflamatorios. El aumento de las enzimas hepáticas, puede ser por una destrucción generalizada de los hepatocitos y la liberación de AST y ALT al plasma sanguíneo. En este estudio, el tratamiento con el complejo de cobre 3, causó una atenuación de AST y ALT indicando un efecto no tóxico sobre el hígado, pudiendo a su vez que disminuir los efectos de los mediadores inflamatorios en el control. De la misma manera, niveles elevados de creatinina y urea en el plasma son indicativos de disfunción renal, como ocurre luego del tratamiento con el complejo 4. En el control la concentración elevada de urea puede ser adjudicada al efecto catabólico del tumor y el consecuente aumento en la producción de urea. Estos datos sugieren que los complejos de cobre 3 y 4, son potenciales candidatos para futuras investigaciones para desarrollar agentes quimioterápicos derivados de metales. Todas estas evidencias sugieren que los complejos de cobre demuestran prometedoras actividad anticancerígena contra un amplio panel de células.

4.7 Bibliografía

- Alves, L. N., Missailidis, S., Lage, C. A. S., & de Almeida, C. E. B. (2019). Anti-MUC1 aptamer as carrier tool of the potential radiosensitizer 1,10 phenanthroline in MCF-7 breast cancer cells. *Anticancer Research*, 39(4), 1859–1867. <https://doi.org/10.21873/anticancer.13293>
- Amado, N. G., Predes, D., Fonseca, B. F., Cerqueira, D. M., Reis, A. H., Dudenhoeffer, A. C., Borges, H. L., Mendes, F. A., & Abreu, J. G. (2014). Isoquercitrin suppresses colon cancer cell growth in vitro by targeting the Wnt/ β -Catenin signaling pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 289(51), 35456–35457. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.621599>
- Balsa, L. M., Ruiz, M. C., Santa Maria de la Parra, L., Baran, E. J., & León, I. E. (2020). Anticancer and antimetastatic activity of copper(II)-tropolone complex against human breast cancer cells, breast multicellular spheroids and mammospheres. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 204(li), 110975. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2019.110975>
- Bansal, A., & Celeste Simon, M. (2018). Glutathione metabolism in cancer progression and treatment resistance. *Journal of Cell Biology*, 217(7), 2291–2298. <https://doi.org/10.1083/jcb.201804161>
- Bravo-Gómez, M. E., Campero-Peredo, C., García-Conde, D., Mosqueira-Santillán, M. J., Serment-Guerrero, J., & Ruiz-Azuara, L. (2015). DNA-binding mode of antitumoral copper compounds (Casiopeinas®) and analysis of its biological meaning. *Polyhedron*, 102, 530–538. <https://doi.org/10.1016/j.poly.2015.10.034>
- Cai, X., Pan, N., & Zou, G. (2007). Copper-1,10-phenanthroline-induced apoptosis in liver carcinoma Bel-7402 cells associates with copper overload, reactive oxygen species production, glutathione depletion and oxidative DNA damage. *BioMetals*, 20(1), 1–11. <https://doi.org/10.1007/s10534-006-9008-0>

Carbonyl Cyanide Chlorophenylhydrazone - an overview | ScienceDirect Topics. (n.d.).

Retrieved May 10, 2020, from <https://www.sciencedirect.com/topics/medicine-and-dentistry/carbonyl-cyanide-chlorophenylhydrazone>

Collins, A. R. (2017). The use of bacterial repair endonucleases in the comet assay. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 1641, pp. 173–184). Humana Press Inc.

https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7172-5_9

Coyle, B., Kinsella, P., McCann, M., Devereux, M., O'Connor, R., Clynes, M., & Kavanagh, K. (2004). Induction of apoptosis in yeast and mammalian cells by exposure to 1,10-phenanthroline metal complexes. *Toxicology in Vitro*, 18(1), 63–70.

<https://doi.org/10.1016/j.tiv.2003.08.011>

Deng, J., Yu, P., Zhang, Z., Wang, J., Cai, J., Wu, N., Sun, H., Liang, H., & Yang, F. (2018). Designing anticancer copper(II) complexes by optimizing 2-pyridine-thiosemicarbazone ligands. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 158(li), 442–452.

<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.09.020>

Hajrezaie, M., Paydar, M., Zorofchian Moghadamtousi, S., Hassandarvish, P., Gwaram, N. S., Zahedifard, M., Rouhollahi, E., Karimian, H., Looi, C. Y., Ali, H. M., Abdul Majid, N., & Abdulla, M. A. (2014). A schiff base-derived copper (II) complex is a potent inducer of apoptosis in colon cancer cells by activating the intrinsic pathway. *The Scientific World Journal*, 2014.

<https://doi.org/10.1155/2014/540463>

Hassanzadeh, P. (2011). Colorectal cancer and NF- κ B signaling pathway. *Gastroenterology and Hepatology from Bed to Bench*, 4(3), 127–132.

<https://doi.org/10.22037/ghfbb.v4i3.167>

Hu, J., Liao, C., Guo, Y., Yang, F., Sang, W., & Zhao, J. (2017). Copper(II) complexes inducing apoptosis in cancer cells, and demonstrating DNA and HSA interactions.

Polyhedron, 132(li), 28–38. <https://doi.org/10.1016/j.poly.2017.04.018>

Leong, K. H., Looi, C. Y., Loong, X. M., Cheah, F. K., Supratman, U., Litaudon, M., Mustafa,

- M. R., & Awang, K. (2016). Cycloart-24-ene-26-ol-3-one, a new cycloartane isolated from leaves of *Aglaia exima* triggers tumour necrosis factor-receptor 1-mediated caspase-dependent apoptosis in colon cancer cell line. *PLoS ONE*, *11*(4), 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0152652>
- Li, X., Bai, B., Liu, L., Ma, P., Kong, L., Yan, J., Zhang, J., Ye, Z., Zhou, H., Mao, B., Zhu, H., & Li, Y. (2015). Novel β -carboline derivatives against colorectal cancer cell growth via inhibition of Wnt/ β -catenin signaling. *Cell Death Discovery*, *1*(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/cddiscovery.2015.33>
- Maia, L. A., Velloso, I., & Abreu, J. G. (2017). Advances in the use of *Xenopus* for successful drug screening. *Expert Opinion on Drug Discovery*, *12*(11), 1153–1159. <https://doi.org/10.1080/17460441.2017.1367281>
- Nicco, C., Laurent, A., Chereau, C., Weill, B., & Batteux, F. (2005). Differential modulation of normal and tumor cell proliferation by reactive oxygen species. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, *59*(4), 169–174. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2005.03.009>
- Patel, M., Horgan, P. G., McMillan, D. C., & Edwards, J. (2018). NF- κ B pathways in the development and progression of colorectal cancer. *Translational Research*, *197*, 43–56. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2018.02.002>
- Química de coordinación de iones metálicos en estado de oxidación II ... - Google Libros.* (n.d.). Retrieved May 26, 2020, from <https://books.google.com.ar/books?id=aUZ5dzV8GN4C&printsec=frontcover#v=onepage&q&f=false>
- Shi, X., Chen, Z., Wang, Y., Guo, Z., & Wang, X. (2018). Hypotoxic copper complexes with potent anti-metastatic and anti-angiogenic activities against cancer cells. *Dalton Transactions*, *47*(14), 5049–5054. <https://doi.org/10.1039/c8dt00794b>
- Sonawane, V. R., Siddique, M. U. M., Gatchie, L., Williams, I. S., Bharate, S. B., Jayaprakash, V., Sinha, B. N., & Chaudhuri, B. (2019). CYP enzymes, expressed

within live human suspension cells, are superior to widely-used microsomal enzymes in identifying potent CYP1A1/CYP1B1 inhibitors: Identification of quinazolinones as CYP1A1/CYP1B1 inhibitors that efficiently reverse B[a]P toxicity . *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 131(September 2018), 177–194. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2019.02.016>

Ude, V. C., Brown, D. M., Viale, L., Kanase, N., Stone, V., & Johnston, H. J. (2017). Impact of copper oxide nanomaterials on differentiated and undifferentiated Caco-2 intestinal epithelial cells; assessment of cytotoxicity, barrier integrity, cytokine production and nanomaterial penetration. *Particle and Fibre Toxicology*, 14(1), 1–16. <https://doi.org/10.1186/s12989-017-0211-7>

Uma, V., Kanthimathi, M., Weyhermuller, T., & Nair, B. U. (2005). Oxidative DNA cleavage mediated by a new copper (II) terpyridine complex: Crystal structure and DNA binding studies. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 99(12), 2299–2307. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2005.08.011>


Wang, J., & Yi, J. (2008). Cancer cell killing via ROS: To increase or decrease, that is a question. *Cancer Biology and Therapy*, 7(12), 1875–1884. <https://doi.org/10.4161/cbt.7.12.7067>

Wang, X., Wang, B., Xie, J., Hou, D., Zhang, H., & Huang, H. (2018). Melatonin inhibits epithelial-to-mesenchymal transition in gastric cancer cells via attenuation of IL-1 /NF- κ B/MMP2/MMP9 signaling. *International Journal of Molecular Medicine*, 42(4), 1847–1856. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2018.3788>

Xiao, Y., Zhai, Q., Wang, G., Liu, X., Zhao, J., Tian, F., Zhang, H., & Chen, W. (2016). Metabolomics analysis reveals heavy metal copper-induced cytotoxicity in HT-29 human colon cancer cells. *RSC Advances*, 6(82), 78445–78456. <https://doi.org/10.1039/c6ra09320e>

Zhang, R. H., Xia, W. S., Wang, H., & Zhou, Z. H. (2009). Metal-organic frameworks constructed from monomeric, dimeric and trimeric phenanthroline citrate zinc building units. *Inorganic Chemistry Communications*, 12(6), 583–587. <https://doi.org/10.1016/j.inoche.2009.04.028>

Zhang, Z., Bi, C., Schmitt, S. M., Fan, Y., Dong, L., Zuo, J., & Dou, Q. P. (2012). 1,10-Phenanthroline promotes copper complexes into tumor cells and induces apoptosis by inhibiting the proteasome activity. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 17(8), 1257–1267. <https://doi.org/10.1007/s00775-012-0940-x>



ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE:
 $[\text{Cu}(\mathbf{dmp})_2(\text{CH}_3\text{CN})](\text{ClO}_4)_2$,
 $[\text{Cu}(\mathbf{phen})_2(\text{CH}_3\text{CN})](\text{ClO}_4)_2$

ACTIVIDAD
ANTIMICROBIANA

5 Actividad antimicrobiana de los complejos de coordinación de cobre

5.1 Introducción

La era del antibiótico, ha sido marcada por la introducción de una gran variedad de nuevos antimicrobianos pero como consecuencia de este aumento exponencial de antibióticos, se produjo la “era de la resistencia”. Esta última, está caracterizada por el uso exagerado e indebido de los antibióticos, lo que ha culminado en el desarrollo de resistencia por parte de los microorganismos, en la que los antibióticos se volvieron menos efectivos o completamente inefectivos (Haeili *et al.*, 2014).

El continuo aumento de bacterias patógenas resistentes a los medicamentos o a múltiples fármacos, se ha convertido en un desafío considerable para el sistema de salud, poniendo en peligro el éxito de los tratamientos con bacterias resistentes, lo cual requiere la administración de elevadas dosis de antibióticos, resultando en mayor toxicidad, más tiempo de internación y elevada mortalidad. También es mucho más alto el riesgo de muerte o complicaciones asociado a infecciones causados por bacterias resistentes. Además de la emergencia de bacterias con resistencia, se ha sumado la escasez de nuevos compuestos, por lo que se ha renovado el interés en el desarrollo de nuevos antibacterianos. Un dato llamativo, es que en los últimos 12 años solo han sido aprobados 5 drogas nuevas para este tipo de tratamientos (Djoko *et al.*, 2015; Haeili *et al.*, 2014)..

Los microorganismos que presentan fenómenos de resistencia son llamados patógenos ESKAPE, e incluye, *Enteroccus faecium*, *Staplylococcus aureus*, *Klebsiella pnenumoniae*, *Pseudomona aeruginosa*, entre otros. Los mecanismos de resistencia incluyen: 1) inactivación o modificación de drogas, 2) alteración de los sitios diana de los antibióticos, 3) adquisición de vías metabólicas alternativas, 4) disminución de la permeabilidad de la membrana, 5) modificación o degradación enzimática de los agentes antimicrobianos, 6) aumento de las bombas de eflujo, que eliminan los antibióticos fuera de la célula (Viganor *et al.*, 2016).

Estimativamente, un 80% de las infecciones en humanos son producidas por bacterias que producen *biofilms* (BF). La formación de estas biopelículas son un problema, principalmente en los implantes como prótesis, que en la mayoría de los casos, requiere una cirugía para remover la misma y así eliminar la infección. La formación de BF es un proceso complejo que involucra múltiples sistemas de señalización, incluyendo *quorum sensing* (QS), nutrientes y señales químicas, y la formación de matriz extracelular. El BF es una comunidad cooperativa de organismos unicelulares adheridos a una superficie sólida o encerrada en una matriz de polisacáridos, proteínas y ácidos nucleicos. El polisacárido extracelular, liberado por las bacterias, encapsula células contiguas en una matriz organizada capaz de permitir la difusión de nutrientes, y protege a las bacterias del estrés del medioambiente, que incluye protección frente a los antibióticos, desinfectantes y de ambientes dinámicos, y conducen a la cronicidad de los procesos infecciosos (Viganor *et al.*, 2016).

Staphylococcus aureus es uno de las primeras causas de infecciones nosocomiales con mortalidad elevada. En los últimos años se observó, en aislamientos clínicos, resistencia contra numerosos antibióticos, entre ellos, vancomicina, lo que ha empeorado aún más el escenario. Aún más el problema de la resistencia esta agravado por la habilidad de esta bacteria de formar BF sobre superficies bióticas y abióticas especialmente sobre implantes médicos. Estas biopelículas son una barrera contra el sistema inmunitario del huésped, difícil de tratar y se consideran un reservorio bacteriano, a partir del cual pueden diseminarse a varios sitios del cuerpo y llevar a la cronicidad. Para solucionar este tipo de infecciones, se decide un remplazo de los dispositivos médicos, causando al paciente estrés así como un gasto medico adicional (Brahma *et al.*, 2018).

El cobre es un micronutriente esencial para las bacterias, pero en exceso es bacteriostático. En el interior de la bacteria, este metal se encuentra unido a proteína o formando complejos con tioles, como con el glutatión. Como consecuencia el cobre libre se encuentra en concentraciones subfentomolares (menos de 10^{-15} moles/l). Cualquier exceso de cobre por sobre esta concentración, se une a sitios no específicos, causando por ejemplo, inactivación de enzimas claves interfiriendo en el metabolismo bacteriano normal. Por otro lado un exceso puede, además, promover la producción de especies

reactivas del oxígeno, generando estrés oxidativo, e interferir con la integridad de la membrana (Haeili *et al.*, 2014) (Djoko *et al.*, 2015).

Las sales iónicas de cobre tienen dificultad para atravesar las membranas de las bacterias, por lo que el potencial para desarrollarse como drogas antibacterianas es bajo. Los iones de cobre generalmente muestran penetración restringida en las bacterias, y por lo tanto concentraciones elevadas de los mismos son necesarias para lograr sus efectos. Por lo que para lograr que los iones de cobre atraviesen la membrana, ligandos liposolubles han sido desarrollados. Estas moléculas son conocidas como ionosforos por su habilidad de actuar como *carriers* de los iones de cobre (Djoko *et al.*, 2015).

Uno de los objetivos de esta tesis doctoral fue determinar la actividad antimicrobiana de dos complejos de cobre, $[\text{Cu}(\text{dmp})_2(\text{CH}_3\text{CN})](\text{ClO}_4)_2$, (**complejo 3**), y $[\text{Cu}(\text{phen})_2(\text{CH}_3\text{CN})](\text{ClO}_4)_2$, (**complejo 4**), contra bacterias patógenas, aisladas de procesos infecciosos y sobre cepas bacterias de referencias (cepas ATCC). Además, de investigar sus propiedades antivirulentas, inhibir un importante factor de virulencia, como lo es la formación de *biofilms*. Estos experimentos fueron llevados a cabo en la cátedra de Bacteriología de la Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia, de la Universidad Nacional de Tucumán.

5.2 Materiales y métodos

5.2.1 Cepas bacterianas

Las bacterias usadas en este estudio fueron provistas por el Laboratorio de Bacteriología de la Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia. UNT. Estas cepas fueron conservadas a $-70\text{ }^\circ\text{C}$.

Las cepas de referencia que se usaron para llevar a cabo este estudio fueron: *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Escherichia coli* ATCC 25922. Además

se utilizó una cepa de *Staphylococcus aureus* de aislamiento clínico, de una herida en el pie de paciente masculino, producto de la diabetes.

5.2.2 Medios y reactivos para las pruebas de sensibilidad

Para el aislamiento e identificación fenotípica de bacilos Gram negativos se utilizaron los siguientes medios de cultivo: agar sangre, agar chocolate, medio Mc Conckey , TSI (Agar-hierro-triple azúcar), citrato, urea y SIM (Sulfuro Indol Movilidad), rojo de metilo, Voges Proskauer , fenilalanina, LIA, MIO (movilidad, indol, lisina).

Para los cocos Gram positivos: agar sangre, agar chocolate, medio base con azida con y sin agregado de sangre, catalasa, coagulasa, DNasa termoestable, bilis esculina, BHI CINA 6,5% y PYR.

Para las pruebas de sensibilidad a los complejos de cobre se utilizaron: placas con agar Mueller Hinton (MH), solución salina estéril, patrón 0.5 del estándar de McFarland, pinzas, asa de platino, hisopos de algodón estériles.

Para la determinación de la inhibición de la formación de *biofilm* se utilizó placas de 96 wells fondo curvo, solución de cristal violeta al 0.1%, etanol al 96º, caldo Luria Bertani, espectrofotómetro TECAN.

5.3 Estudios microbiológicos

5.3.1 Identificación

Las cepas bacterianas una vez que fueron descongeladas, se las sembró en medios enriquecidos y diferenciales y luego se les realizaron las correspondientes pruebas bioquímicas básicas para corroborar su identificación. A todas ellas primero se le realizó una coloración de Gram y luego a las cepas de *E. coli*, *P. aeruginosa* y *K. pneumoniae*, se realizó una prueba de TSI (Agar-hierro-triple azúcar).

A la cepa *S. aureus* y *E. faecalis*, se le realizó las pruebas de catalasa, coagulasa DNasa termoestable, PYR, bilis esculina y BHI NaCl. Además, se confirmó la identificación por MALDITOF.

5.3.2 Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM)

En la actualidad se dispone de varios métodos para determinar el patrón de susceptibilidad de una bacteria a los antibióticos. El método de elección que fue utilizado en este trabajo de tesis fue el Método de dilución en agar, con el método *spot*.

Procedimiento

1. Cepa bacteriana a estudiar: Debe provenir de un cultivo fresco, preferiblemente de un cultivo en agar, de manera que podamos comprobar la pureza de la cepa.
2. Inóculo: Se transferieron una o dos colonias del cultivo a un tubo que contenga solución fisiológica estéril. La turbidez de la SF con el inóculo se ajustará a la turbidez del patrón 0.5 del estándar de McFarland, el cual contiene exactamente $1-2 \times 10^8$ UFC/ml. Diluir la suspensión 1/10 en caldo estéril o solución fisiológica (concentración de inóculo: 1×10^7 UFC/ml), y a partir de esta última, se siembra 2 μ l en la placa de agar para obtener una concentración final de 2×10^4 UFC/ml.
3. En 9 ml de caldo MH agregar 1 ml de la solución de complejo apropiada para cada dilución, en el agar fundido y enfriado previamente a 48-50° C (en la proporción de 1ml de complejo a 9 ml de agar). Mezclar suavemente (complejo-agar) y colocar en la placa antes de que se produzca la solidificación total o parcial del medio. Antes de utilizar las placas deben ser equilibradas a temperatura ambiente y no deben presentar gotas de agua sobre la superficie.
4. Aplicar 2 μ l de cada inóculo sobre la superficie del agar, por medio de un ansa calibrada o pipeta. Primero debemos inocular una placa de control de agar sin compuesto, y luego recién inocular las que contienen las distintas concentraciones del complejo, comenzando por la de menor concentración.
5. Las placas inoculadas se deben mantener a temperatura ambiente hasta que el agar absorba el líquido que deja el inóculo (10-15 minutos). Luego incubar invertidas a 35 ± 2 °C por el término de 16-20 h.
6. Transcurrido el tiempo de incubación se procede a leer las placas. Las placas se deben colocar sobre superficie negra y opaca para determinar el punto final. La **CIM** se define como: **“La menor concentración de antibiótico que inhibe completamente el**

desarrollo bacteriano” (Bacteriología, 2020). Un esquema representativo se puede observar en la figura 5.2.3.1.

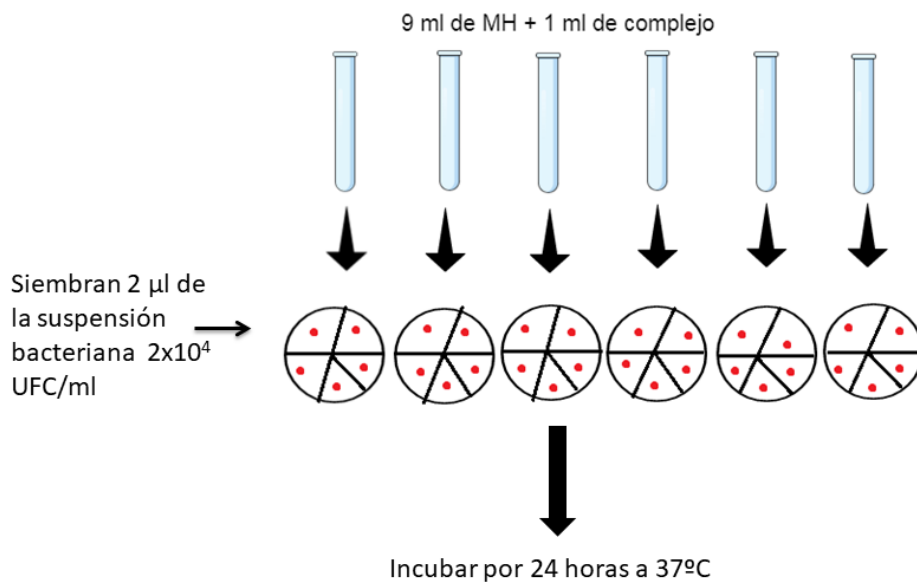


Figura 5.2.3.1: esquema de la determinación de CIM, en placas de agar MH por la técnica del spot.

5.3.3 Determinación de concentración bactericida mínima (CBM)

Se define como CBM a La mayor dilución que produce la muerte de $\geq 99,99\%$ de los organismos viables. A partir de los resultados anteriores, se realizó la determinación de CBM. Se colocó en tubos de kahn, 5 ml de medio MH más 3 diferentes concentraciones del complejo (valor de la CIM, una concentración menor a esta y una mayor), y se agregó el inóculo del microorganismo a testear (1×10^6 UFC/ml). Se realizaron diluciones seriadas de cada una de ellas, de 10^{-1} a 10^{-4} , y se colocó en placas de Petri y se distribuyeron con espátula sobre el medio de cultivo. Las mismas se incubaron por 18 a 20 hrs a 35°C. Luego de este tiempo se realizó el recuento de colonias y se determinó la CBM (Bacteriología, 2020).

Un esquema de la técnica se puede observar en la figura 5.2.3.2.

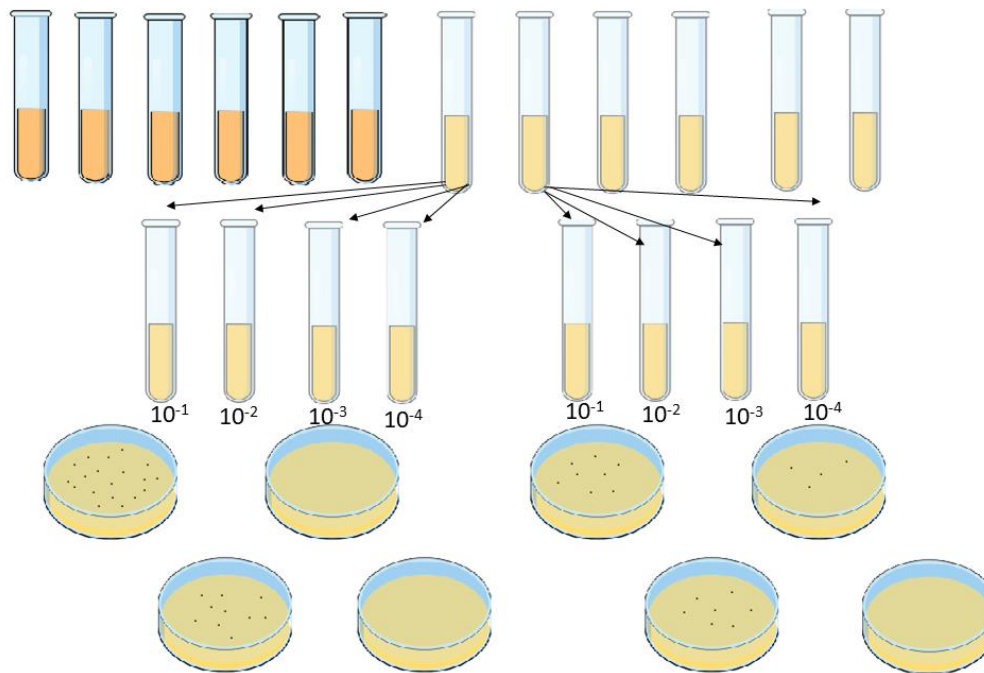


Figura 5.2.3.2. Esquema de la determinación de CBM.

5.3.4 Producción de biofilm (O'Toole y Kolter)

Este ensayo está basado en la capacidad de las bacterias de formar biofilms sobre plásticos PVC. La formación de biofilm se produce porque las bacterias se adhieren a las cubetas de las microplacas de poliestireno, fondo curvo. Para este ensayo se utilizó 1 cepa, *S. aureus* ATCC 25923 y un aislado de *S aureus* de una herida de pie diabético .. De un cultivo sólido fresco de la cepa bacteriana, se tomaron 3-4 colonias y se realizó una suspensión con densidad óptica (DO_{570}) de aproximadamente 0.01. En cada policubeta estéril, se sembraron 100 μ l de dicha suspensión de un cultivo de 12 hs en caldo Luria Bertani (LB). Luego se adicionó 100 μ l de la dilución de los complejos de cobre a evaluar. Se realizaron controles negativos con medio estéril. Se incubaron a 37°C durante 3, 12 y 16 h las diferentes placas. Luego de dicho tiempo se agregaron 25 μ l de una solución acuosa de cristal violeta (CV) al 0,1%, se dejó en contacto por 15 min a temperatura ambiente y posteriormente se realizaron dos lavados con solución fisiológica para eliminar las células planctónicas (no integrantes del biofilm). Sólo las

células adheridas formadoras de biofilm quedan en la superficie de la cubeta coloreadas con CV.

El CV unido al biofilm se extrajo con 2 lavados de 200 μ l de etanol 96° (el CV adherido se solubiliza). La cuantificación del biofilm formado se mide por absorbancia a (DO 590 nm) en un espectrofotómetro TECAN. Todos los ensayos se efectuaron por triplicado.

Se analizaron los promedios de las lecturas obtenidos para cada cepa, y se compara respecto al blanco para definir la producción de biofilm. A mayor DO se considera mayor productor de biofilm. Se puede observar un esquema de la técnica en la figura 5.2.3.4.

Por otro lado, se realizó la determinación de las bacterias plantónicas, en los mismo tiempo. Se procedió de la misma manera, que el ensayo anterior, sin adicionar el CV, si no que directamente se realizó la lectura de la DO a 570 nm en un espectrofluorómetro TECAN. En caso de disminución de la DO significa un descenso de la viabilidad bacteriana (Bacteriología, 2020).

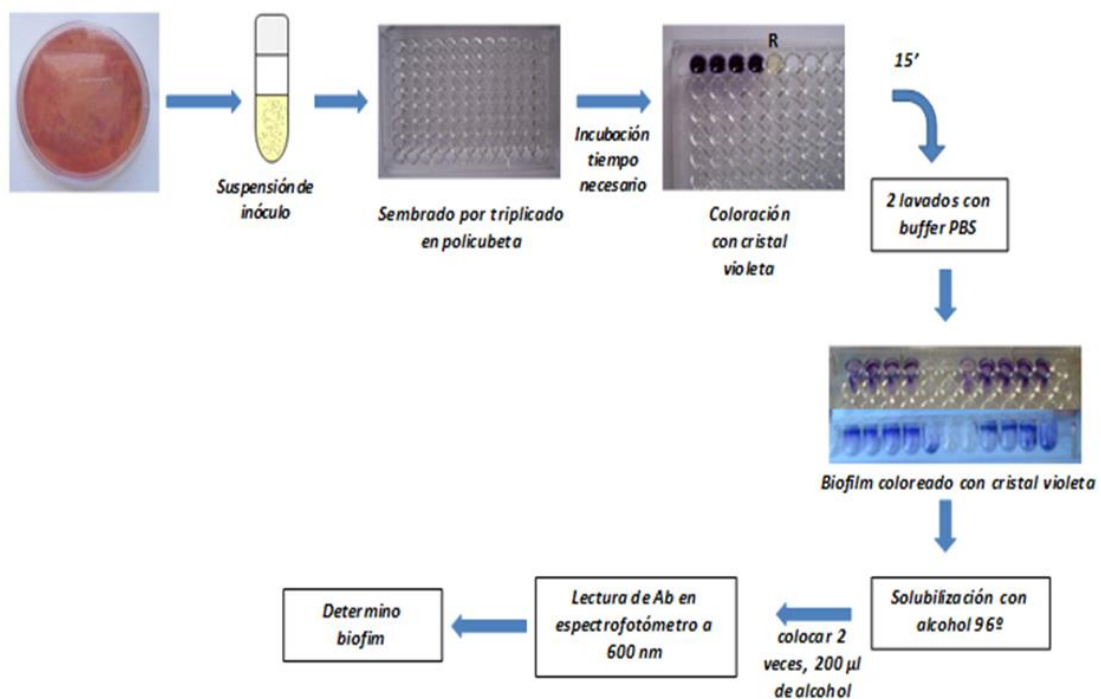


Figura 5.2.3.4 Esquema de la determinación de producción de biofilm por el método de cristal violeta.

5.4 Resultados

5.4.1 Identificación bacteriana

A partir de las pruebas bioquímicas fenotípicas realizadas se corroboró la identidad de las cepas de referencia y de aislamiento clínico, y además que las mismas se encontraban libres de contaminación.

Los resultados obtenidos fueron:

- *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 700603): bacilos Gram negativos. TSI: pico y fondo amarillo, positivo, Citrato: positivo, Urea: positivo, movilidad: negativo.
- *Escherichia coli* (ATCC 25922): bacilo Gram negativo. TSI: pico y fondo amarillo, positivo, citrato: negativa, urea: negativo, movilidad: reacción positiva.
- *Pseudomona aeruginosa* (ATCC 27853): bacilos Gram negativos. TSI: negativo, citrato: positivo, urea: negativo, movilidad: positivo.
- *Enterococcus faecium* (ATCC 29212): cocos Gram positivo, diplococos. Catalasa negativo. DNasa termoestable: negativo, bilis esculina: positiva, BHI NaCl: positivo y PYR: positivo
- *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) y cepa clínica: cocos Gram positivos. Catalasa: positivos, coagulasa: negativo. DNasa termoestable: positivo.

5.4.2 Determinación de la concentración bactericida mínima (CIM)

La actividad antibacteriana de los complejos de cobre, fue evaluada contra bacterias Gram positivas (*Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*) y contra bacterias Gram negativas (*Pseudomona aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli*). Los medios de cultivo para todas las cepas fue agar Muller Hinton (MH) con un inóculo inicial fue de 10^8 UFC/ml. Los complejos fueron disueltos inicialmente en DMSO. A partir de esta se prepararon las diluciones en agar MH fundido, y se obtuvieron concentraciones en un rango de 2 a 100 μ M. se incubaron a 37°C durante 18 a 24 hrs.

Los resultados de estas pruebas sugieren actividad antimicrobiana de los complejos de cobre 3 y 4 contra las cepas *S. aureus*, *E. faecalis* y *E. coli* (Tabla 5.3.2.1).

El complejo de cobre 3 mostró mayor actividad antimicrobiana que el complejo 4 para 2 cepas. Se puede observar que la cepa de *S. aureus* (ATCC 25923) es inhibida a partir

de los 4 μM (2.8 $\mu\text{g/ml}$) por el complejo de cobre 3, mientras que se necesita una concentración 2.2 veces mayor del complejo 4 para inhibir esta bacteria, es decir de 10 μM (6.2 $\mu\text{g/ml}$).

El crecimiento de la cepa de *E. faecalis* (ATCC 29212) se inhibió a partir de los 10 μM (7.2 $\mu\text{g/ml}$) del complejo 3, mientras que con el complejo 4 este efecto se produjo cuando fue tratada con 40 μM (24 $\mu\text{g/ml}$).

Frente a la cepa de *E. coli* (ATCC 25922), los complejos actuaron de manera distinta, el complejo 4 mostro mejor actividad (40 μM) que el complejo 3 (60 μM).

Las cepas de *Kb. pneumoniae* (ATCC 700603) y de *Ps. aeruginosa* (ATCC 27853) no mostraron inhibición de su crecimiento luego del tratamiento con ambos complejos, en el rango de concentraciones usadas (2 a 100 μM).

| | Complejo 3 | Complejo 4 |
|--------------------------------|--|--|
| <i>S. aureus</i> (ATCC 25923) | 4 μM (2.8 $\mu\text{g/ml}$) | 10 μM (6.2 $\mu\text{g/ml}$) |
| <i>E. faecium</i> (ATCC 29212) | 10 μM (7.2 $\mu\text{g/ml}$) | 40 μM (24 $\mu\text{g/ml}$) |
| <i>E. coli</i> (ATCC 25922) | 60 μM (43 $\mu\text{g/ml}$) | 40 μM (24 $\mu\text{g/ml}$) |

Tabla 5.3.2.1 Resultados de CIM obtenida para el panel de bacterias luego de ser tratadas con los complejos de cobre 3 y 4.

El manual de CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*), describe los estándares y pautas para consensuar procesos de laboratorio, entre estos, describe criterios de interpretación para la evaluación de la sensibilidad de diferentes antibióticos frente a cepas bacterianas. Además enumera los antibióticos que deberían ensayarse para los microorganismos así como sus valores de CIM.

En el manual publicado en el año 2016, para la cepa de *E. coli* 25922, se publicaron los siguientes antibióticos con sus correspondientes valores de CIM: ampicilina 2-8 $\mu\text{g/ml}$,

Ampicilina/sulbactam 2/1-8/4 $\mu\text{gr/ml}$, cefuroxima 2-8 $\mu\text{gr/ml}$, cloranfenicol 2-8 $\mu\text{gr/ml}$, nitrofurantoina 4-16 $\mu\text{gr/ml}$ y rifampicina 4-16 $\mu\text{gr/ml}$. Para la cepa *E. faecium*, los valores de CIM son, trimetoprima/sulfametoxol 0.5/9.5 $\mu\text{gr/ml}$, rifampicina 0.5-4 $\mu\text{gr/ml}$ y gentamicina 4-16 $\mu\text{gr/ml}$ (Wayne, 2015).

Los resultados de CIM obtenidos, sugieren que el complejo 3, en el caso de *E. faecium*, tienen mejor o igual actividad antibacteriana comparada con los antibióticos de referencia, sulfametoxol y gentamicina, ya que están dentro de los valores de referencia o incluso son más bajos que estos.

Varios autores reportaron actividad de complejos metálicos con fenantrolina como ligando, con valores de CIM cercanos al obtenido en nuestro laboratorio. Por el año 1969, Dwyer y colaboradores publicaron la actividad antibacteriana de la fenantrolina libre y de complejos metálicos [Fe(II), Co(II), Ni(II), Cu(II), Zn(II), Cd(II) y Ru(II)] con este ligando. Los resultados demostraron que estos complejos eran más activos que el ligando y el metal libre contra *M. tuberculosis*, *S. aureus*, *K. pneumonia*, *C. Perfringens*, *E. coli* y *P. vulgaris*. Además encontraron que estos compuestos eran bacteriostáticos o bactericidas contra bacterias Gram (+), y eran menos efectivos contra bacterias Gram (-). Como en el caso de estos complejos, que resultaron ser activos solo contra *E. coli*, a CIM elevados, y no frente a *P. aeruginosa* y *K. pneumoniae*. Esto puede ser explicado, por un lado, por la complejidad de la membrana de las bacterias Gram (-), por su elevado contenido de lípidos altamente polares y la consecuente dificultad en la habilidad de los complejos para alcanzar el espacio intracelular (Viganor *et al.*, 2016). Y por otro lado, esta toxicidad selectiva dentro de las bacterias Gram (-), puede ser explicada por la permeabilidad de sus membranas. A pesar que la bacteria *P. aeruginosa* tiene mayor cantidad de poros que *E. coli*, la permeabilidad de la membrana externa de la primera es aproximadamente un 8% de la de *E. coli*. Esto se debe a que *P. aeruginosa* tiene poros que son no funcionales, restringiendo el grado de absorción. Al mismo tiempo, el mecanismo efectivo de salida es responsable de la resistencia intrínseca contra algunos antibióticos por parte de *P. aeruginosa*. (Viganor *et al.*, 2016).

Li y colaboradores, reportaron la actividad antimicrobiana de una serie de compuestos, que tienen como ligando aminoácidos/fenantrolina y como metal el cobre (II). Estos autores demostraron que la presencia de un ligando lipofílico en el complejo causaba la elevación de cobre intracelular cuando era comprado con CuCl_2 . Los valores de CIM que obtuvieron para la sal fue de 120 $\mu\text{gr/ml}$ y para los complejos un rango entre 7.5 y 31.4 $\mu\text{gr/ml}$, dependiendo del aminoácido que formaba el complejo (X. Li *et al.*, 2011)(X. Liu *et al.*, 2013).

En 2012, Budzisz y colaboradores, sintetizaron complejos de cobre(II) y paladio(II), con fenantrolina con metilos en las posiciones 4,7 y 5,6 o con diamonoetanos o diaminociclohexano como sustituyentes. Los complejos de paladio tienen actividad antibacteriana mínima, los complejos de cobre exhiben actividad contra *B. subtilis* (CIM: 8-64 $\mu\text{gr/ml}$), *S. aureus* (CIM: 8-32 $\mu\text{gr/ml}$) y *E. coli* (CIM: 8-32 $\mu\text{gr/ml}$). Ningún complejo exhibió actividad contra *P. aeruginosa*.(Budzisz *et al.*, 2012).

Muchos complejos de cobre han sido reportados por su acción antibacteriana. Djoko y colaboradores, probaron la acción antibacteriana de un complejo de cobre utilizando como ligando tiosemicarbazona. Demostraron acción antibacteriana contra varios patógenos humanos, incluyendo *Neisseria gonorrhoeae* y *Mycobacterium tuberculosis*, así como contra *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, obteniendo valores de CIM entre 10 y 25 μM (Djoko *et al.*, 2015).

Umarani y colaboradores, evaluaron la actividad de un complejo de cobre con un macrólido, contra un variado grupo de bacterias, incluidas, *S. aureus*, *E. faecalis*, *E. coli*, *P. aeruginosa* y *K. pneumoniae*. Solo para *S. aureus* se obtuvieron valores de CIM de 6.25 $\mu\text{gr/ml}$, para el resto de las bacterias las CIM fueron superiores a 100 $\mu\text{gr/ml}$ (Viganor *et al.*, 2016).

Los ligandos usados en este trabajo de tesis fueron, 1,10 fenantrolina, y un derivado, 1,3 dimetil fenantrolina. 1,10 fenantrolina es un heterociclo orgánico que tiene propiedades antimicrobianas contra un amplio espectro de bacterias. Esta actividad puede ser modulada significativamente modificando su estructura, ya sea extendiendo su estructura en las posiciones -5,6- o por protones aromáticos. Por otro lado, Dwyer y

colaboradores demostraron la relación entre lipofilicidad y actividad antibacteriana, cuando ellos demostraron que la actividad de un complejo, mejoraba por la introducción de metilos como sustituyentes en el ligando fenantrolina (Viganor *et al.*, 2016). Tal como demuestran estos resultados, el complejo 3, quien tiene 2 metilos en su estructura, resultó ser más activo en 2 de 3 cepas bacterianas, y además un potente inhibidor de la formación de biofilm.

5.4.3 Determinación de concentración bactericida mínima (CBM)

A partir de aquellos tubos que no presentaron turbidez, indicativo de inhibición bacteriana, se utilizaron concentraciones por encima y por debajo del valor de la CIM ($\pm 2 \mu\text{M}$), para la determinación de la CBM. Se realizaron 4 diluciones para determinar el número de unidades formadoras de colonias (UFC/ml). Se obtuvieron los siguientes resultados:

- Complejo 3 para *St. aureus* (6 y 8 μM) y *E. faecium* (12.5 y 15 μM) se mantiene el número de colonias.
- Complejo 3 *E. coli*: CBM 54 μM (38,8 $\mu\text{gr/ml}$).
- Complejo 4 para *E. coli* (40, 42.5 y 45 μM) y *S. aureus* (20 y 24 μM) se mantiene el número de colonias
- Complejo 4 para *E. faecium*: CBM 37,5 μM (23 $\mu\text{gr/ml}$).

Con estos datos, se podría inferir que los complejos que mantienen el número de colonias, tienen acción bacteriostática, mientras que en aquellos en los que los que no se observó aparición de colonias, tendrían acción bactericida.

5.4.4 Inhibición de la producción de biofilm

Además de estudiar la inhibición del crecimiento bacteriano determinando CIM y CBM para los diferentes complejos frente a diferentes bacterias Gram positivas y Gram negativas, se investigó su capacidad antivirulenta o sea la capacidad de inhibir un factor de virulencia.

Esta propiedad se experimentó sobre 2 cepas distintas de *St. aureus*. Una de ella, la cepa ATCC 25923, la segunda corresponde a una cepa que fue aislada del pie de un paciente diabético, producto de una infección. Este proceso se estudió en 3 tiempos distintos, 8, 12 y 16 hrs, y se utilizó 3 concentraciones de ambos complejos, 1, 2 y 3 μM .

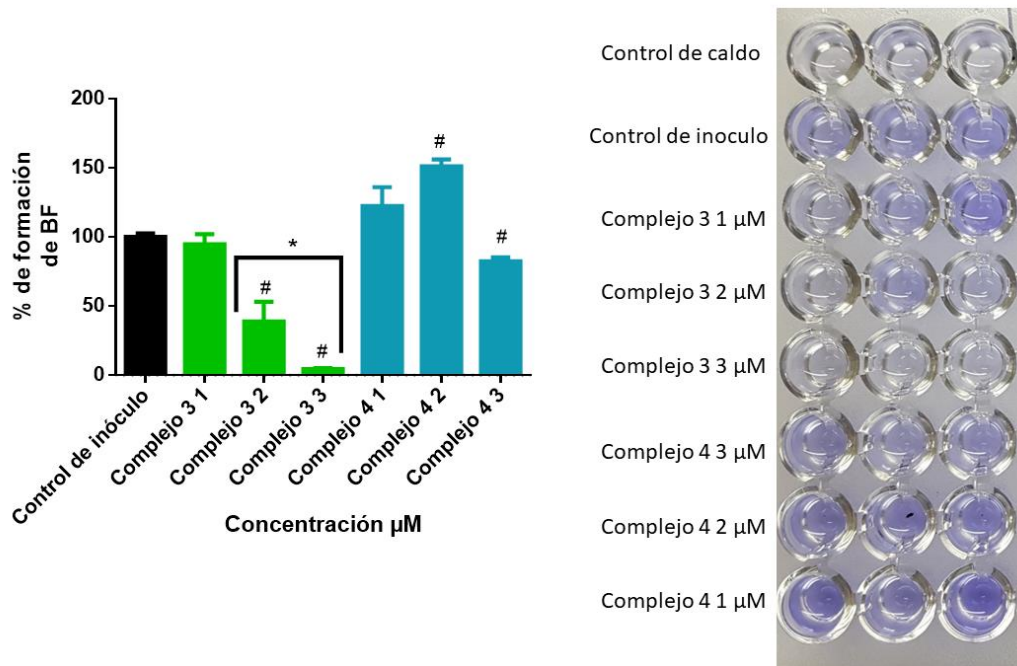


Figura 5.3.4.1. Inhibición de la formación de biofilm, luego del tratamiento por 8 hrs con los complejos 3 y 4 de cobre sobre la cepa de *St. aureus* ATCC. A la izquierda se puede observar el grafico de barras, y a la derecha una fotografía de la placa en la cual se llevó a cabo el experimento. Los resultados se expresan como la media \pm SEM (n=3). * Diferencia significativas entre control y los complejos. # Diferencia significativa entre complejos 3 y 4. ($p < 0.05$)

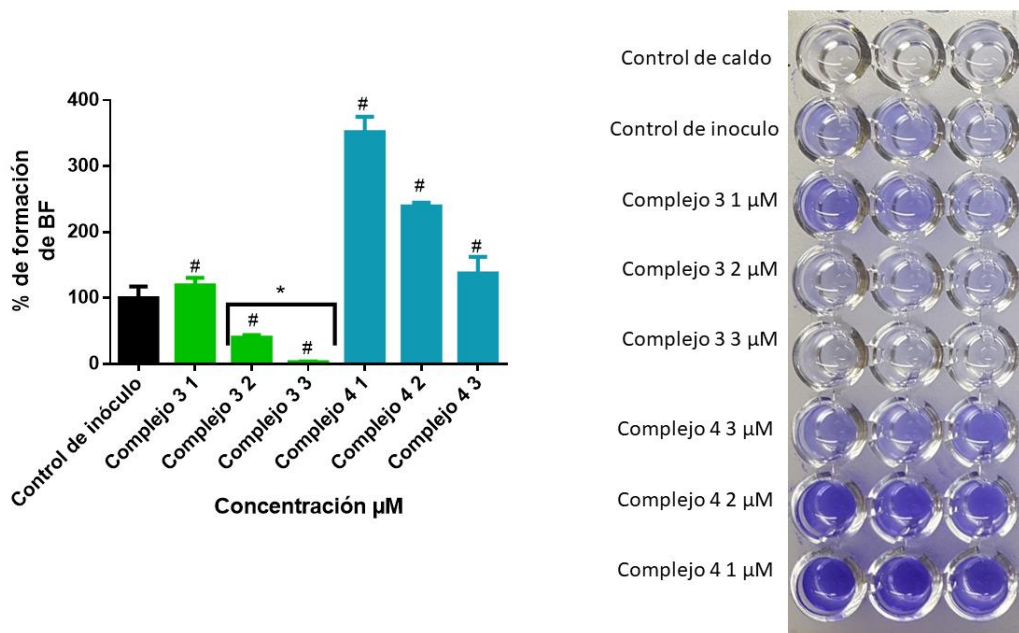


Figura 5.3.4.2. Inhibición de la formación de biofilm, luego del tratamiento por 12 hrs con los complejos 3 y 4 de cobre sobre la cepa de *St. aureus* ATCC. A la izquierda se puede observar el grafico de barras, y a la derecha una fotografía de la placa en la cual se llevó a cabo el experimento. Los resultados se expresan como la media \pm SEM (n=3). * Diferencia significativas entre control y los complejos. # Diferencia significativa entre complejos 3 y 4. (p<0.05)

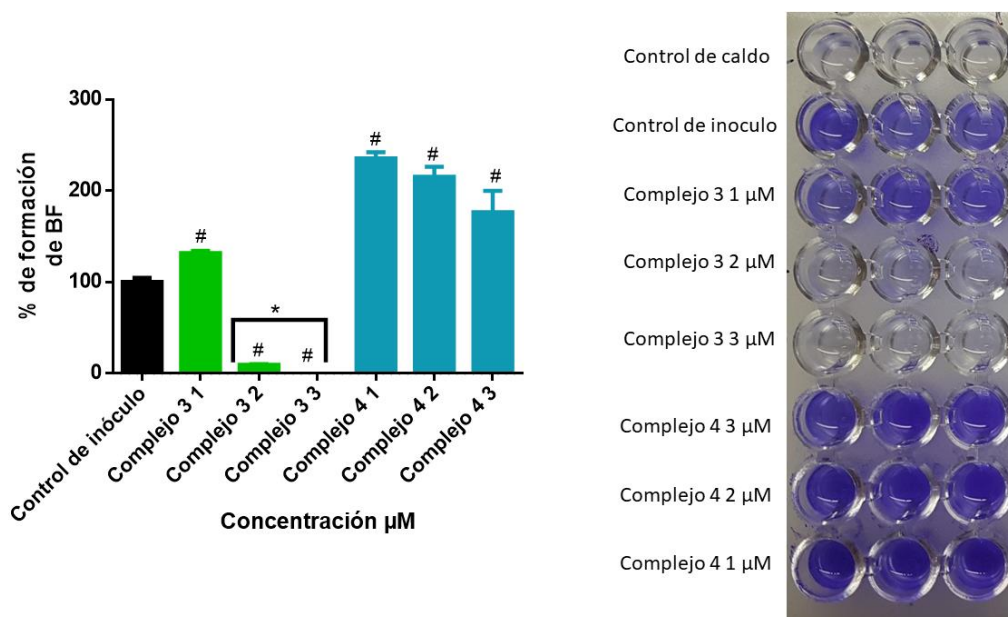


Figura 5.3.4.3. Inhibición de la formación de biofilm, luego del tratamiento por 16 hrs con los complejos 3 y 4 de cobre sobre la cepa de *St. aureus* ATCC. A la izquierda se puede observar el grafico de barras, y a la derecha una fotografía de la placa en la cual se llevó a cabo el experimento. Los resultados se expresan como la media \pm SEM (n=3). * Diferencia significativas entre control y los complejos. # Diferencia significativa entre complejos 3 y 4. (p<0.05)

Luego del tratamiento con los complejos de cobre se puede observar que, el complejo 3 produjo un efecto inhibitorio en la formación del biofilm, en los tres periodos de

tiempo testados a la concentración de 2 y 3 μM . No así el complejo 4, quien no mostró producir efecto inhibitorio alguno.

A las 8 hrs de incubación (figura 5.3.4.1) con el complejo 3, a 2 μM se produjo una inhibición de la formación del biofilm del 61.2% y a 3 μM una inhibición del 95.5%. A las 12 hrs (figura 5.3.4.2), a 2 μM el porcentaje de inhibición fue del 60%, y a 3 μM fue del 97%. A las 16 hrs (figura 5.3.4.3), los porcentajes de inhibición que se obtuvieron para 2 y 3 μM fue de 90.6% y del 100% respectivamente ($p < 0.05$). En los 3 casos a 1 μM , no se observó efecto sobre este factor de virulencia. Además, se puede observar que la inhibición fue dependiente de la concentración, a mayor concentración del complejo mayor inhibición. Con respecto a los tiempos de tratamiento, a las 8 y 12 hrs, no hay diferencias significativas entre los tratamientos, si por el contrario a las 16 hrs en la que el porcentaje de inhibición a 2 μM fue mayor comparado con los tiempos anteriores.

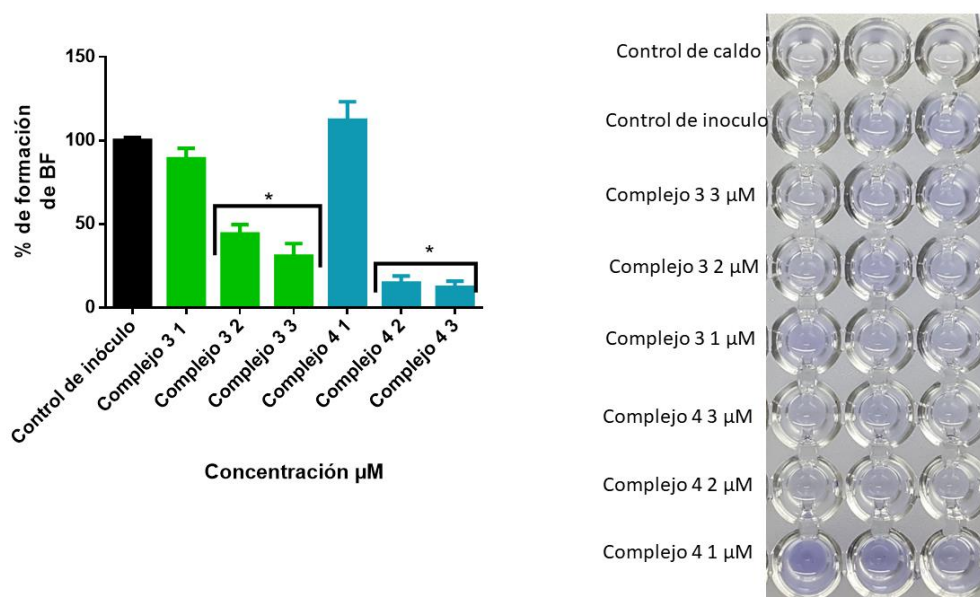


Figura 5.3.4.4 Inhibición de la formación de biofilm, luego del tratamiento por 8 hrs con los complejos 3 y 4 de cobre sobre la cepa de *St. aureus* de muestra clínica. A la izquierda se puede observar el grafico de barras, y a la derecha una fotografía de la placa en la cual se llevó a cabo el experimento. Los resultados se expresan como la media \pm SEM ($n=3$). * Diferencia significativas entre control y los complejos. # Diferencia significativa entre complejos 3 y 4. ($p < 0.05$).

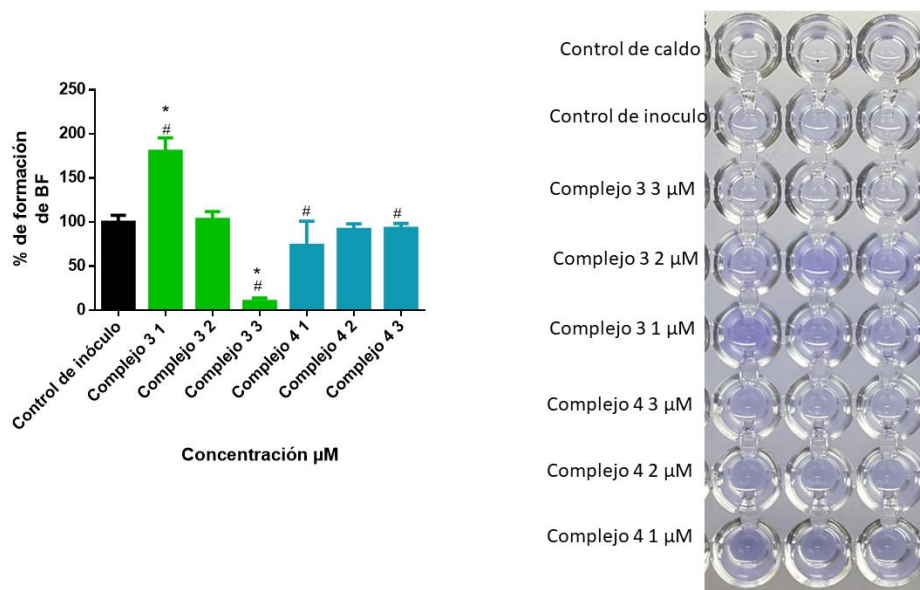


Figura 5.3.4.5. Inhibición de la formación de biofilm, luego del tratamiento por 12 hrs con los complejos 3 y 4 de cobre sobre la cepa de *St. aureus* de muestra clínica. A la izquierda se puede observar el grafico de barras, y a la derecha una fotografía de la placa en la cual se llevó a cabo el experimento. Los resultados se expresan como la media \pm SEM (n=3). * Diferencia significativas entre control y los complejos. # Diferencia significativa entre complejos 3 y 4. (p<0.05)

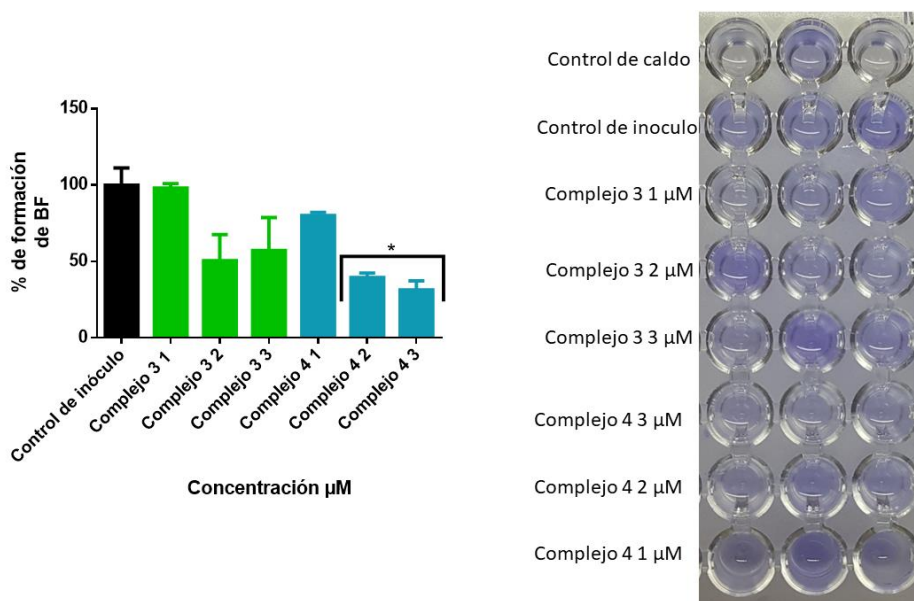


Figura 5.3.4.6. Inhibición de la formación de biofilm, luego del tratamiento por 16 hrs con los complejos 3 y 4 de cobre sobre la cepa de *St. aureus* de muestra clínica. A la izquierda se puede observar el grafico de barras, y a la derecha una fotografía de la placa en la cual se llevó a cabo el experimento. Los resultados se expresan como la media \pm SEM (n=3). * Diferencia significativas entre control y los complejos. # Diferencia significativa entre complejos 3 y 4. (p<0.05)

Como se puede observar en las figuras 5.3.4.4, 5.3.4.5 y 5.3.4.6, los complejos frente a esta cepa, se comportan de manera diferente que con la cepa ATCC. Ambos complejos

producen inhibición de la formación de BF en los 3 periodos de tiempo estudiados, a las concentraciones de 1, 2 y 3 μM .

En la figura 5.3.4.4, correspondiente al tiempo de incubación de 8 hrs, se puede observar que la formación de BF se vio significativamente disminuida con respecto al control luego del tratamiento con ambos complejos a 2 y 3 μM ($p < 0.05$). Entre los complejos, el complejo 4 es más activo que el complejo 3. A 2 μM , el complejo 4 produce una inhibición del 85.3% aproximadamente, mientras que la inhibición impartida por el complejo 3 fue de solo el 56%, es decir el complejo 4 fue 1.5 veces más potente que el 3. A 3 μM , la inhibición de la formación de BF fue del 88% y del 69% para los complejos 4 y 3 respectivamente.

A las 12 hrs, expuesto en la figura 5.3.4.5, a la concentración de 1 μM , el complejo 4 produce una inhibición de aproximadamente el 26.4%, mientras que el complejo 3 no produce efecto alguno. A 2 μM la inhibición es similar, no existen diferencia significativa entre ellos. Y finalmente a 3 μM , el complejo 3 es 12 veces más activo que el complejo 4, ya que produce una inhibición del 90.9% y el segundo complejo solo lo inhibe un 7.3%.

El efecto inhibitorio sobre la formación de BF producido por los complejos sobre la cepa *St. aureus* clínico a las 16 hrs (figura 5.3.4.6), fue similar. A 1 μM , la inhibición producida por el complejo 3 y 4 fue del 2% y del 20% respectivamente. A 2 μM la inhibición fue mayor, del 49.5% por el complejo 3 y del 60% por el complejo 4, y a 3 μM el efecto de inhibición fue similar a la concentración anterior. No existe diferencia significativa entre ellos ($p < 0.05$).

La diferencia en la acción de estos complejos sobre una misma especie de bacteria, podría explicarse principalmente por las diferencias en su estabilidad genética, siendo la cepa ATCC genéticamente estable, no así la cepa obtenida por aislamiento clínico. Otra de las diferencias, podría deberse a que el paciente infectado con la *S. aureus*, fue tratado previamente a su aislamiento, con antibióticos por vía sistémica y de uso tópico, pudiendo ser este tratamiento causante de una respuesta diferente frente a estos complejos metálicos. Sin embargo, el complejo 3 logró inhibir la formación de BF, en ambas cepas.

Además del estudio de la inhibición de la formación de BF, se investigó la viabilidad de las bacterias planctónicas luego del tratamiento con ambos complejos, estableciendo los mismos tiempos que el experimento anterior, es decir, a las 8, 12 y 16 hrs.

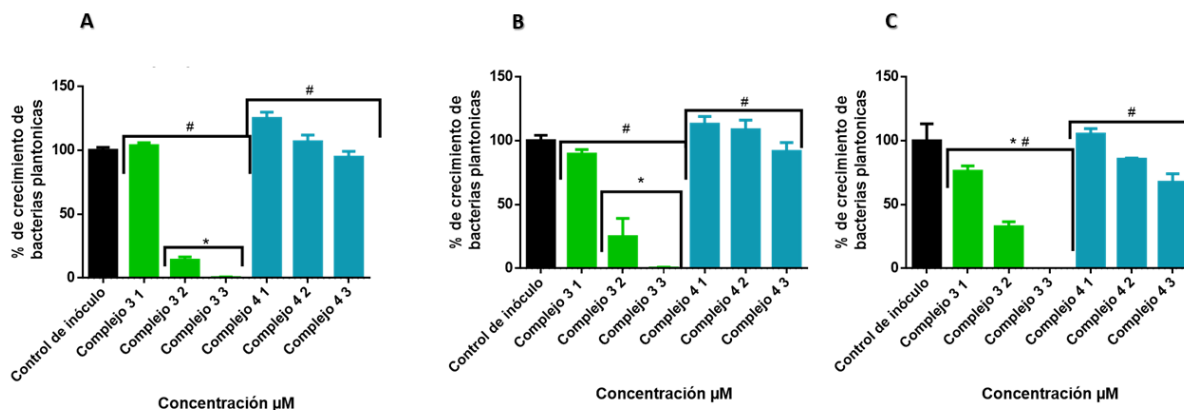


Figura 5.3.4.7. Graficas de barras que representan el porcentaje de crecimiento de la cepa *St. aureus* ATCC 25923 a diferentes tiempos, A: 8 hrs, B: 12 hrs y C: 16 hrs. Los resultados se expresan como la media \pm SEM ($n=3$). * Diferencia significativa entre control y los complejos. # Diferencia significativa entre complejos 3 y 4. ($p<0.05$)

En la figura 5.3.4.7, se puede observar que el complejo 3 ejerce un mayor efecto citotóxico sobre las bacterias de la cepa ATCC 25923, el cual es dependiente de la concentración de complejo.

Cuando las bacterias fueron tratadas con 1 μ M del complejo 3, solo a las 16 hrs se vio afectada su viabilidad con respecto al control ($p<0.05$), produciendo una inhibición del 24%. A 2 μ M se produjo una marcada disminución del crecimiento bacteriano, con valores de 13.95%, 25% y de 32.6% a las 8, 12 y 16 hrs respectivamente, y al aumentar la concentración a 3 μ M no se produjo crecimiento bacteriano, con respecto al control ($p<0.05$).

Con respecto al complejo 4, el porcentaje de crecimiento a la mayor concentración fue de aproximadamente el 90% a las 8 y 12 hrs, mientras que a las 16 hrs fue del 67.5%. Es decir que solo se disminuye el crecimiento bacteriano al ser tratadas con la máxima concentración y el máximo tiempo evaluados.

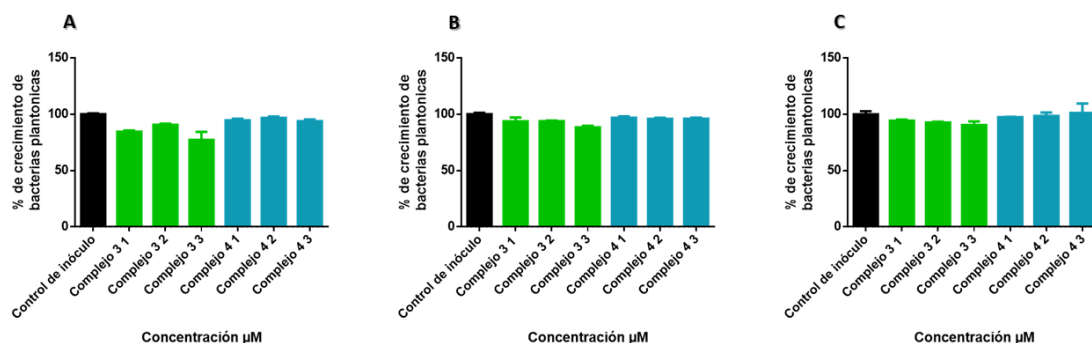


Figura 5.3.4.8. Graficas de barras que representan el porcentaje de inhibición del crecimiento de la cepa clínica de *St. aureus* a diferentes tiempos, A: 8 hrs, B: 12 hrs y C: 16 hrs. Los resultados se expresan como la media \pm SEM ($n=3$). * Diferencia significativas entre control y los complejos. # Diferencia significativa entre complejos 3 y 4. ($p<0.05$).

La cepa *St. aureus* de aislamiento clínico, luego de ser tratada con los complejos de cobre en los periodos de tiempo y con las concentraciones establecidas, no se produjo inhibición del crecimiento. Tal como puede observarse en la gráfica de la figura 5.3.4.8, la viabilidad de mantuvo en valores similares al inóculo sin tratar.

El efecto sobre la inhibición de BF por los complejos de cobre con fenantrolina con metilos como sustituyentes, contra *S. aureus* ha sido recientemente reportado. Los valores de CIM que obtuvieron fueron altos, al compararlos con el antibiótico de referencia, vancomicina, pero su actividad contra el BF es significativamente menor. Un mínimo de 100 $\mu\text{gr/ml}$ de vancomicina fueron necesarios para reducir la formación de BF un 44%, y con el complejo ya reportado se redujo un 68% (Beeton *et al.*, 2014). En este trabajo de tesis, fueron necesario 2.1 $\mu\text{gr/ml}$ del complejo 3 para inhibir la formación del BF un 95.5% luego de 8 hrs de exposición para la cepa ATCC 25922. En el caso de la cepa clínica, el complejo 3 y 4 tuvieron efectos similares, logrando una reducción de aproximadamente un 50%.

Las infecciones por BF tienen mayor importancia que las infecciones causadas por bacterias planctónicas. En el caso de infecciones asociadas a BF, elevadas concentraciones de antibióticos son necesarias, lo que hace que las infecciones sean difíciles de curar (Olsen, 2015)(Koch *et al.*, 2014). Estos resultados enfatizan que los complejos de cobre, en especial el complejo 3, pueden actuar como agentes antimicrobianos para tratar infecciones asociadas a BF.

5.5 Conclusiones

A partir de los datos obtenidos, podemos concluir que los complejos de cobre producen efectos bacteriostáticos y bactericidas sobre 3 cepas bacterianas, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecium* y *Escherichia coli*. Los valores de CIM que se obtuvieron, en algunos casos, fueron prometedores, comparando con los antibióticos que se usan en la clínica, principalmente para el complejo 3.

Los antimicrobianos son importantes no solo para el tratamiento de infecciones humanas o animales, sino también para aplicar como aséptico en hospitales, implantes y para instrumentos para procedimientos médicos invasivos, entre otros. Estos complejos de cobre arrojaron resultados parciales, prometedores, ya que además de ser inhibidores de bacterias, tienen acción para disminuir la capacidad de la formación de BF, que radica ser un problema de alta relevancia en el ambiente nosocomial.

Por lo tanto, estos estudios justifican una investigación más profunda para el desarrollo del complejo Cu como un agente eficaz contra las infecciones intracelulares crónicas y asociadas a biopelículas.

5.6 Bibliografía

- Aldubayan, M. A., Elgharabawy, R. M., Ahmed, A. S., & Tousson, E. (2019). Antineoplastic activity and curative role of avenanthramides against the growth of Ehrlich solid tumors in mice. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/5162687>
- Ang, W. H., Casini, A., Sava, G., & Dyson, P. J. (2011). Organometallic ruthenium-based antitumor compounds with novel modes of action. In *Journal of Organometallic Chemistry* (Vol. 696, Issue 5, pp. 989–998). <https://doi.org/10.1016/j.jorganchem.2010.11.009>
- Aslan, C., Maralbashi, S., Salari, F., Kahroba, H., Sigaroodi, F., Kazemi, T., & Kharaziha, P. (2019). Tumor-derived exosomes: Implication in angiogenesis and antiangiogenesis cancer therapy. *Journal of Cellular Physiology*, 234(10), 16885–16903. <https://doi.org/10.1002/jcp.28374>
- Attoub, S., Arafat, K., Khalaf, T., Sulaiman, S., & Iratni, R. (2018). Frondoside a enhances the anti-cancer effects of oxaliplatin and 5-fluorouracil on colon cancer cells. *Nutrients*, 10(5). <https://doi.org/10.3390/nu10050560>
- Bacteriología, O. (2020). *Guía de Trabajos Prácticos Plantel docente*. 1–304.
- Balsa, L. M., Ruiz, M. C., Santa Maria de la Parra, L., Baran, E. J., & León, I. E. (2020). Anticancer and antimetastatic activity of copper(II)-tropolone complex against human breast cancer cells, breast multicellular spheroids and mammospheres. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 204(li), 110975. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2019.110975>
- Bansal, A., & Celeste Simon, M. (2018). Glutathione metabolism in cancer progression and treatment resistance. *Journal of Cell Biology*, 217(7), 2291–2298. <https://doi.org/10.1083/jcb.201804161>
- Baran, E. J. (2014). Metalofármacos: una nueva perspectiva para la farmacología y la

- medicina. *Anales Acad. Nac. de Cs. Ex., Fís. y Nat., Tomo, 66*, 5–21. http://www.ancefn.org.ar/biblioteca/anales/tomo_63/21.pdf
- Beeton, M. L., Aldrich-Wright, J. R., & Bolhuis, A. (2014). The antimicrobial and antibiofilm activities of copper(II) complexes. *Journal of Inorganic Biochemistry*, *140*, 167–172. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2014.07.012>
- Bergamo, A., & Sava, G. (2015). Linking the future of anticancer metal-complexes to the therapy of tumour metastases. *Chemical Society Reviews*, *44*(24), 8818–8835. <https://doi.org/10.1039/c5cs00134j>
- Biswas, R., Bugde, P., He, J., Merien, F., Lu, J., Liu, D. X., Myint, K., Liu, J., McKeage, M., & Li, Y. (2019). Transport-mediated oxaliplatin resistance associated with endogenous overexpression of MRP2 in Caco-2 and PANC-1 Cells. *Cancers*, *11*(9). <https://doi.org/10.3390/cancers11091330>
- Brahma, U., Kothari, R., Sharma, P., & Bhandari, V. (2018). Antimicrobial and anti-biofilm activity of hexadentated macrocyclic complex of copper (II) derived from thiosemicarbazide against *Staphylococcus aureus*. *Scientific Reports*, *8*(1), 1–8. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-26483-5>
- Budzisz, E., Bobka, R., Hauss, A., Roedel, J. N., Wirth, S., Lorenz, I. P., Rozalska, B., Więckowska-Szakiel, M., Krajewska, U., & Rozalski, M. (2012). Synthesis, structural characterization, antimicrobial and cytotoxic effects of aziridine, 2-aminoethylaziridine and azirine complexes of copper(ii) and palladium(ii). *Dalton Transactions*, *41*(19), 5925–5933. <https://doi.org/10.1039/c2dt12107g>
- Cadavid-Vargas, J. F., Villa-Pérez, C., Ruiz, M. C., León, I. E., Valencia-Urbe, G. C., Soria, D. B., Etcheverry, S. B., & Di Virgilio, A. L. (2019). 6-Methoxyquinoline complexes as lung carcinoma agents: induction of oxidative damage on A549 monolayer and multicellular spheroid model. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, *24*(2), 271–285. <https://doi.org/10.1007/s00775-019-01644-7>
- Cadavid-Vargas, J., Leon, I., Etcheverry, S., Santi, E., Torre, M., & Di Virgilio, A. (2016).

Copper(II) Complexes with Saccharinate and Glutamine as Antitumor Agents: Cytoand Genotoxicity in Human Osteosarcoma Cells. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 17(3), 424–433. <https://doi.org/10.2174/1871520616666160513130204>

Carlsson, J., Nilsson, K., Westermark, B., Pontén, J., Sundström, C., Larsson, E., Bergh, J., Pählman, S., Busch, C., & Collins, V. P. (1983). Formation and growth of multicellular spheroids of human origin. *International Journal of Cancer*, 31(5), 523–533. <https://doi.org/10.1002/ijc.2910310502>

Casali, P. G., Bielack, S., Abecassis, N., Aro, H. T., Bauer, S., Biagini, R., Bonvalot, S., Boukovinas, I., Bovee, J. V. M. G., Brennan, B., Brodowicz, T., Broto, J. M., Brugières, L., Buonadonna, A., De Álava, E., Dei Tos, A. P., Del Muro, X. G., Dileo, P., Dhooge, C., ... Blay, J. Y. (2018). Bone sarcomas: ESMO-PaedCan-EURACAN Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*, 29(August), iv79–iv95. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdy310>

Chohan, Z. H., Arif, M., Akhtar, M. A., & Supuran, C. T. (2006). Metal-based antibacterial and antifungal agents: Synthesis, characterization, and in vitro biological evaluation of Co(II), Cu(II), Ni(II), and Zn(II) complexes with amino acid-derived compounds. *Bioinorganic Chemistry and Applications*, 2006, 1–13. <https://doi.org/10.1155/BCA/2006/83131>

COVID-19 significantly impacts health services for noncommunicable diseases. (n.d.). Retrieved December 28, 2020, from <https://www.who.int/news/item/01-06-2020-covid-19-significantly-impacts-health-services-for-noncommunicable-diseases>

De Grandis, R. A., Santos, P. W. da S. dos, Oliveira, K. M. de, Machado, A. R. T., Aissa, A. F., Batista, A. A., Antunes, L. M. G., & Pavan, F. R. (2019). Novel lawsone-containing ruthenium(II) complexes: Synthesis, characterization and anticancer activity on 2D and 3D spheroid models of prostate cancer cells. *Bioorganic Chemistry*, 85, 455–468. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2019.02.010>

Delgado, M. D., Cestari, J. J., Hernán, A., Tauret, L., & Alemanno, G. (2018). ARTÍCULO DE

REVISIÓN SÍNDROME DE LISIS TUMORAL. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA A 90 AÑOS DE SU DESCRIPCIÓN TUMOR LYSIS SYNDROME. BIBLIOGRAPHIC REVIEW AT 90 YEARS OF ITS DESCRIPTION. *Lestón Tauret y Col. Rev Nefrol Dial Traspl*, 38(2), 148–159. www.renal.org.ar

Deng, J., Yu, P., Zhang, Z., Wang, J., Cai, J., Wu, N., Sun, H., Liang, H., & Yang, F. (2018). Designing anticancer copper(II) complexes by optimizing 2-pyridine-thiosemicarbazone ligands. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 158, 442–452. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.09.020>

Denoyer, D., Masaldan, S., La Fontaine, S., & Cater, M. A. (2015). Targeting copper in cancer therapy: “Copper That Cancer.” In *Metallomics* (Vol. 7, Issue 11, pp. 1459–1476). Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/c5mt00149h>

Díaz-Sánchez, A., Riesco, J. M., Moya, E., González, M. R., Rivero, M., Manzano, R., Nevarez, F., Díaz Muñoz de la Espada, V. M., Margineam, F., & Campos, R. (2015). Carcinoma primario de células en anillo de sello de íleon terminal. In *Gastroenterología y Hepatología* (Vol. 38, Issue 7, pp. 472–473). Ediciones Doyma, S.L. <https://doi.org/10.1016/j.gastrohep.2014.10.001>

Dickreuter, E., & Cordes, N. (2017). The cancer cell adhesion resistome: Mechanisms, targeting and translational approaches. *Biological Chemistry*, 398(7), 721–735. <https://doi.org/10.1515/hsz-2016-0326>

Djoko, K. Y., Goytia, M. M., Donnelly, P. S., Schembri, M. A., Shafer, W. M., & McEwan, A. G. (2015). Copper(II)-bis(thiosemicarbazonato) complexes as antibacterial agents: Insights into their mode of action and potential as therapeutics. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59(10), 6444–6453. <https://doi.org/10.1128/AAC.01289-15>

El ciclo celular eucarionte y el cáncer. (n.d.). Retrieved August 3, 2020, from <https://www.biointeractive.org/es/classroom-resources/el-ciclo-celular-eucarionte-y-el-cncer>

- Ferguson, J. L., & Turner, S. P. (2018). Bone cancer: Diagnosis and treatment principles. *American Family Physician, 98*(4), 205–213.
- Ganeshpandian, M., Ramakrishnan, S., Palaniandavar, M., Suresh, E., Riyasdeen, A., & Akbarsha, M. A. (2014). Mixed ligand copper(II) complexes of 2,9-dimethyl-1,10-phenanthroline: Tridentate 3N primary ligands determine DNA binding and cleavage and cytotoxicity. *Journal of Inorganic Biochemistry, 140*, 202–212. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2014.07.021>
- Griesinger, F., Korol, E. E., Kayaniyil, S., Varol, N., Ebner, T., & Goring, S. M. (2019). Efficacy and safety of first-line carboplatin-versus cisplatin-based chemotherapy for non-small cell lung cancer: A meta-analysis. *Lung Cancer, 135*, 196–204. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2019.07.010>
- Gu, Y. Y., Chen, M. H., May, B. H., Liao, X. Z., Liu, J. H., Tao, L. T., Man-yuen Sze, D., Zhang, A. L., & Mo, S. L. (2018). Matrine induces apoptosis in multiple colorectal cancer cell lines in vitro and inhibits tumour growth with minimum side effects in vivo via Bcl-2 and caspase-3. *Phytomedicine, 51*, 214–225. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2018.10.004>
- Guo, Y., Wang, L., Lv, P., & Zhang, P. (2015). Transferrin-conjugated doxorubicin-loaded lipid-coated nanoparticles for the targeting and therapy of lung cancer. *Oncology Letters, 9*(3), 1065–1072. <https://doi.org/10.3892/ol.2014.2840>
- Hadi, N. I., & Jamal, Q. (2015). “OMIC” tumor markers for breast cancer: A review. *Pakistan Journal of Medical Sciences, 31*(5). <https://doi.org/10.12669/pjms.315.7627>
- Haeili, M., Moore, C., Davis, C. J. C., Cochran, J. B., Shah, S., Shrestha, T. B., Zhang, Y., Bossmann, S. H., Benjamin, W. H., Kutsch, O., & Wolschendorf, F. (2014). Copper complexation screen reveals compounds with potent antibiotic properties against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 58*(7), 3727–3736. <https://doi.org/10.1128/AAC.02316-13>

- Hee Park, M., & Tae Hong, J. (2016). *cells Roles of NF- κ B in Cancer and Inflammatory Diseases and Their Therapeutic Approaches*. <https://doi.org/10.3390/cells5020015>
- Hepatopathology for gastroenterologists and hepatologists. Part Two: Useful terminology in the interpretation of the histopathological findings*. (n.d.). Retrieved October 26, 2020, from http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-99572013000300010
- Hwang, H. J., Oh, M. S., Lee, D. W., & Kuh, H. J. (2019). Multiplex quantitative analysis of stroma-mediated cancer cell invasion, matrix remodeling, and drug response in a 3D co-culture model of pancreatic tumor spheroids and stellate cells. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, 38(1). <https://doi.org/10.1186/s13046-019-1225-9>
- Katt, M. E., Placone, A. L., Wong, A. D., Xu, Z. S., & Searson, P. C. (2016). In vitro tumor models: Advantages, disadvantages, variables, and selecting the right platform. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 4(FEB). <https://doi.org/10.3389/fbioe.2016.00012>
- Koch, G., Yepes, A., Förstner, K. U., Wermser, C., Stengel, S. T., Modamio, J., Ohlsen, K., Foster, K. R., & Lopez, D. (2014). Evolution of resistance to a last-resort antibiotic in staphylococcus aureus via bacterial competition. *Cell*, 158(5), 1060–1071. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.06.046>
- Lenis-Rojas, O. A., Robalo, M. P., Tomaz, A. I., Carvalho, A., Fernandes, A. R., Marques, F., Folgueira, M., Yáñez, J., Vázquez-García, D., López Torres, M., Fernández, A., & Fernández, J. J. (2018). Rull(p-cymene) Compounds as Effective and Selective Anticancer Candidates with No Toxicity in Vivo. *Inorganic Chemistry*, 57(21), 13150–13166. <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.8b01270>
- Leon, I., Cadavid-Vargas, J., Di Virgilio, A., & Etcheverry, S. (2016). Vanadium, Ruthenium and Copper Compounds: A New Class of Nonplatinum Metallodrugs with Anticancer Activity. *Current Medicinal Chemistry*, 24(2), 112–148.

<https://doi.org/10.2174/0929867323666160824162546>

- Li Cavoli, G., Passantino, D., Tortorici, C., Bono, L., Ferrantelli, A., & Rotolo, U. (2015). Acute interstitial nephritis overlapping chronic renal damage. *Saudi Journal of Kidney Diseases and Transplantation : An Official Publication of the Saudi Center for Organ Transplantation, Saudi Arabia*, 26(5), 1020–1022. <https://doi.org/10.4103/1319-2442.164597>
- Li, J. Z., Liu, C. Z., & Sato, T. (2016). Novel antitumor invasive actions of p-cymene by decreasing MMP-9/TIMP-1 expression ratio in human fibrosarcoma HT-1080 cells. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 39(8), 1247–1253. <https://doi.org/10.1248/bpb.b15-00827>
- Li, T., Kang, G., Wang, T., & Huang, H. (2018). Tumor angiogenesis and anti-angiogenic gene therapy for cancer (Review). In *Oncology Letters* (Vol. 16, Issue 1, pp. 687–702). Spandidos Publications. <https://doi.org/10.3892/ol.2018.8733>
- Li, X., Zhang, Z., Wang, C., Zhang, T., He, K., & Deng, F. (2011). Synthesis, crystal structure and action on Escherichia coli by microcalorimetry of copper complexes with 1,10-phenanthroline and amino acid. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 105(1), 23–30. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2010.09.001>
- Lin, S. W., Lee, M. T., Ke, F. C., Lee, P. P. H., Huang, C. J., Ip, M. M., Chen, L., & Hwang, J. J. (2000). TGF β 1 stimulates the secretion of matrix metalloproteinase 2 (MMP2) and the invasive behavior in human ovarian cancer cells, which is suppressed by MMP inhibitor BB3103. *Clinical and Experimental Metastasis*, 18(6), 493–499. <https://doi.org/10.1023/A:1011888126865>
- Liu, J., Lai, H., Xiong, Z., Chen, B., & Chen, T. (2019). Functionalization and cancer-targeting design of ruthenium complexes for precise cancer therapy. *Chemical Communications*, 55(67), 9904–9914. <https://doi.org/10.1039/c9cc04098f>
- Liu, X., Li, X., Zhang, Z., Dong, Y., Liu, P., & Zhang, C. (2013). Studies on antibacterial mechanisms of copper complexes with 1,10-phenanthroline and amino acid on

- Escherichia coli. *Biological Trace Element Research*, 154(1), 150–155.
<https://doi.org/10.1007/s12011-013-9707-7>
- Lu, M., Zessin, A. S., Glover, W., & Hsu, D. S. (2017). Activation of the mTOR Pathway by oxaliplatin in the treatment of colorectal cancer liver metastasis. *PLoS ONE*, 12(1).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0169439>
- Matesanz, A. I., Jimenez-Faraco, E., Ruiz, M. C., Balsa, L. M., Navarro-Ranninger, C., León, I. E., & Quiroga, A. G. (2018). Mononuclear Pd(II) and Pt(II) complexes with an α -N-heterocyclic thiosemicarbazone: Cytotoxicity, solution behaviour and interaction: Versus proven models from biological media. *Inorganic Chemistry Frontiers*, 5(1), 73–83. <https://doi.org/10.1039/c7qi00446j>
- McQuitty, R. J. (2014). Metal-based drugs. *Science Progress*, 97(1), 1–19.
<https://doi.org/10.3184/003685014X13898980185076>
- Mehta, G., Hsiao, A. Y., Ingram, M., Luker, G. D., & Takayama, S. (2012). Opportunities and challenges for use of tumor spheroids as models to test drug delivery and efficacy. *Journal of Controlled Release*, 164(2), 192–204.
<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.04.045>
- Moloney, J. N., & Cotter, T. G. (2018). ROS signalling in the biology of cancer. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 80, 50–64.
<https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2017.05.023>
- Moncharmont, C., Auberdiac, P., Mélis, A., Afqir, S., Pacaut, C., Chargari, C., Merrouche, Y., & Magné, N. (2011). Cisplatine ou carboplatine, telle est la question. In *Bulletin du Cancer* (Vol. 98, Issue 2, pp. 164–175). John Libbey Eurotext.
<https://doi.org/10.1684/bdc.2011.1307>
- Morgan, M. J., & Liu, Z. G. (2011). Crosstalk of reactive oxygen species and NF- κ B signaling. *Cell Research*, 21(1), 103–115. <https://doi.org/10.1038/cr.2010.178>
- Ndagi, U., Mhlongo, N., & Soliman, M. E. (2017). Metal complexes in cancer therapy –

An update from drug design perspective. In *Drug Design, Development and Therapy* (Vol. 11, pp. 599–616). Dove Medical Press Ltd. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S119488>

Ng, C. H., Kong, S. M., Tiong, Y. L., Maah, M. J., Sukram, N., Ahmad, M., & Khoo, A. S. B. (2014). Selective anticancer copper(ii)-mixed ligand complexes: Targeting of ROS and proteasomes. *Metallomics*, 6(4), 892–906. <https://doi.org/10.1039/c3mt00276d>

Olsen, I. (2015). Biofilm-specific antibiotic tolerance and resistance. In *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* (Vol. 34, Issue 5, pp. 877–886). Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s10096-015-2323-z>

Ottaviani, G., & Jaffe, N. (2009). The epidemiology of osteosarcoma. *Cancer Treatment and Research*, 152, 3–13. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-0284-9_1

Pal, M., Nandi, U., & Mukherjee, D. (2018). Detailed account on activation mechanisms of ruthenium coordination complexes and their role as antineoplastic agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 150, 419–445. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.03.015>

Patel, M., Horgan, P. G., McMillan, D. C., & Edwards, J. (2018). NF- κ B pathways in the development and progression of colorectal cancer. *Translational Research*, 197, 43–56. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2018.02.002>

Pavlova, N. N., & Thompson, C. B. (2016). The Emerging Hallmarks of Cancer Metabolism. In *Cell Metabolism* (Vol. 23, Issue 1, pp. 27–47). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.12.006>

Perou, C. M., Sørile, T., Eisen, M. B., Van De Rijn, M., Jeffrey, S. S., Ress, C. A., Pollack, J. R., Ross, D. T., Johnsen, H., Akslén, L. A., Fluge, Ø., Pergammenschlkov, A., Williams, C., Zhu, S. X., Lønning, P. E., Børresen-Dale, A. L., Brown, P. O., & Botstein, D. (2000). Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, 406(6797), 747–752. <https://doi.org/10.1038/35021093>

- Pizarro, A. M., Habtemariam, A., & Sadler, P. J. (2010). Activation mechanisms for organometallic anticancer complexes. *Topics in Organometallic Chemistry*, 32, 21–56. https://doi.org/10.1007/978-3-642-13185-1_2
- Porchia, M., Pellei, M., Del Bello, F., & Santini, C. (2020). Zinc Complexes with Nitrogen Donor Ligands as Anticancer Agents. In *Molecules (Basel, Switzerland)* (Vol. 25, Issue 24). NLM (Medline). <https://doi.org/10.3390/molecules25245814>
- Preya, U. H., Lee, K. T., Kim, N. J., Lee, J. Y., Jang, D. S., & Choi, J. H. (2017). The natural terthiophene α -terthienylmethanol induces S phase cell cycle arrest of human ovarian cancer cells via the generation of ROS stress. *Chemico-Biological Interactions*, 272, 72–79. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2017.05.011>
- Richards, C. H., Roxburgh, C. S. D., Anderson, J. H., McKee, R. F., Foulis, A. K., Horgan, P. G., & McMillan, D. C. (2012). Prognostic value of tumour necrosis and host inflammatory responses in colorectal cancer. *British Journal of Surgery*, 99(2), 287–294. <https://doi.org/10.1002/bjs.7755>
- Riffle, S., & Hegde, R. S. (2017). Modeling tumor cell adaptations to hypoxia in multicellular tumor spheroids. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, 36(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s13046-017-0570-9>
- Riffle, S., Pandey, R. N., Albert, M., & Hegde, R. S. (2017). Linking hypoxia, DNA damage and proliferation in multicellular tumor spheroids. *BMC Cancer*, 17(1). <https://doi.org/10.1186/s12885-017-3319-0>
- Salehi, F., Behboudi, H., Kavooosi, G., & Ardestani, S. K. (2017). Chitosan promotes ROS-mediated apoptosis and S phase cell cycle arrest in triple-negative breast cancer cells: Evidence for intercalative interaction with genomic DNA. *RSC Advances*, 7(68), 43141–43150. <https://doi.org/10.1039/c7ra06793c>
- Schreiber-Brynzak, E., Klapproth, E., Unger, C., Lichtscheidl-Schultz, I., Göschl, S., Schweighofer, S., Trondl, R., Dolznig, H., Jakupec, M. A., & Keppler, B. K. (2015). Three-dimensional and co-culture models for preclinical evaluation of metal-based

- anticancer drugs. *Investigational New Drugs*, 33(4), 835–847.
<https://doi.org/10.1007/s10637-015-0260-4>
- Shi, X., Chen, Z., Wang, Y., Guo, Z., & Wang, X. (2018). Hypotoxic copper complexes with potent anti-metastatic and anti-angiogenic activities against cancer cells. *Dalton Transactions*, 47(14), 5049–5054. <https://doi.org/10.1039/c8dt00794b>
- Shi, Y., Tang, B., Yu, P. W., Tang, B., Hao, Y. X., Lei, X., Luo, H. X., & Zeng, D. Z. (2012). Autophagy Protects against Oxaliplatin-Induced Cell Death via ER Stress and ROS in Caco-2 Cells. *PLoS ONE*, 7(11), 51076.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051076>
- Śliwa, E. I., Śliwińska-Hill, U., Bażanów, B., Siczek, M., Kłak, J., & Smoleński, P. (2020). Synthesis, structural, and cytotoxic properties of new water-soluble copper(II) complexes based on 2,9-dimethyl-1,10-phenanthroline and their one derivative containing 1,3,5-triaza-7-phosphaadamantane-7-oxide. *Molecules*, 25(3).
<https://doi.org/10.3390/molecules25030741>
- Srinivas, U. S., Tan, B. W. Q., Vellayappan, B. A., & Jeyasekharan, A. D. (2019). ROS and the DNA damage response in cancer. *Redox Biology*, 25(October 2018), 101084.
<https://doi.org/10.1016/j.redox.2018.101084>
- Stein, A., & Arnold, D. (2012). Oxaliplatin: A review of approved uses. In *Expert Opinion on Pharmacotherapy* (Vol. 13, Issue 1, pp. 125–137). Expert Opin Pharmacother.
<https://doi.org/10.1517/14656566.2012.643870>
- Sutherland, R. M., Inch, W. R., McCredie, J. A., & Kruuv, J. (1970). A multi-component radiation survival curve using an in vitro tumour model. In *International Journal of Radiation Biology* (Vol. 18, Issue 5, pp. 491–495). Informa Healthcare.
<https://doi.org/10.1080/09553007014551401>
- Tien, C. C., Peng, Y. C., Yang, F. L., Subeq, Y. M., & Lee, R. P. (2016). Slow infusion rate of doxorubicin induces higher pro-inflammatory cytokine production. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 81, 69–76.

<https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2016.08.002>

Viganor, L., Howe, O., McCarron, P., McCann, M., & Devereux, M. (2016). The Antibacterial Activity of Metal Complexes Containing 1,10-phenanthroline: Potential as Alternative Therapeutics in the Era of Antibiotic Resistance. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 17(11), 1280–1302. <https://doi.org/10.2174/1568026616666161003143333>

Waks, A. G., & Winer, E. P. (2019). Breast Cancer Treatment: A Review. *JAMA - Journal of the American Medical Association*, 321(3), 288–300. <https://doi.org/10.1001/jama.2018.19323>

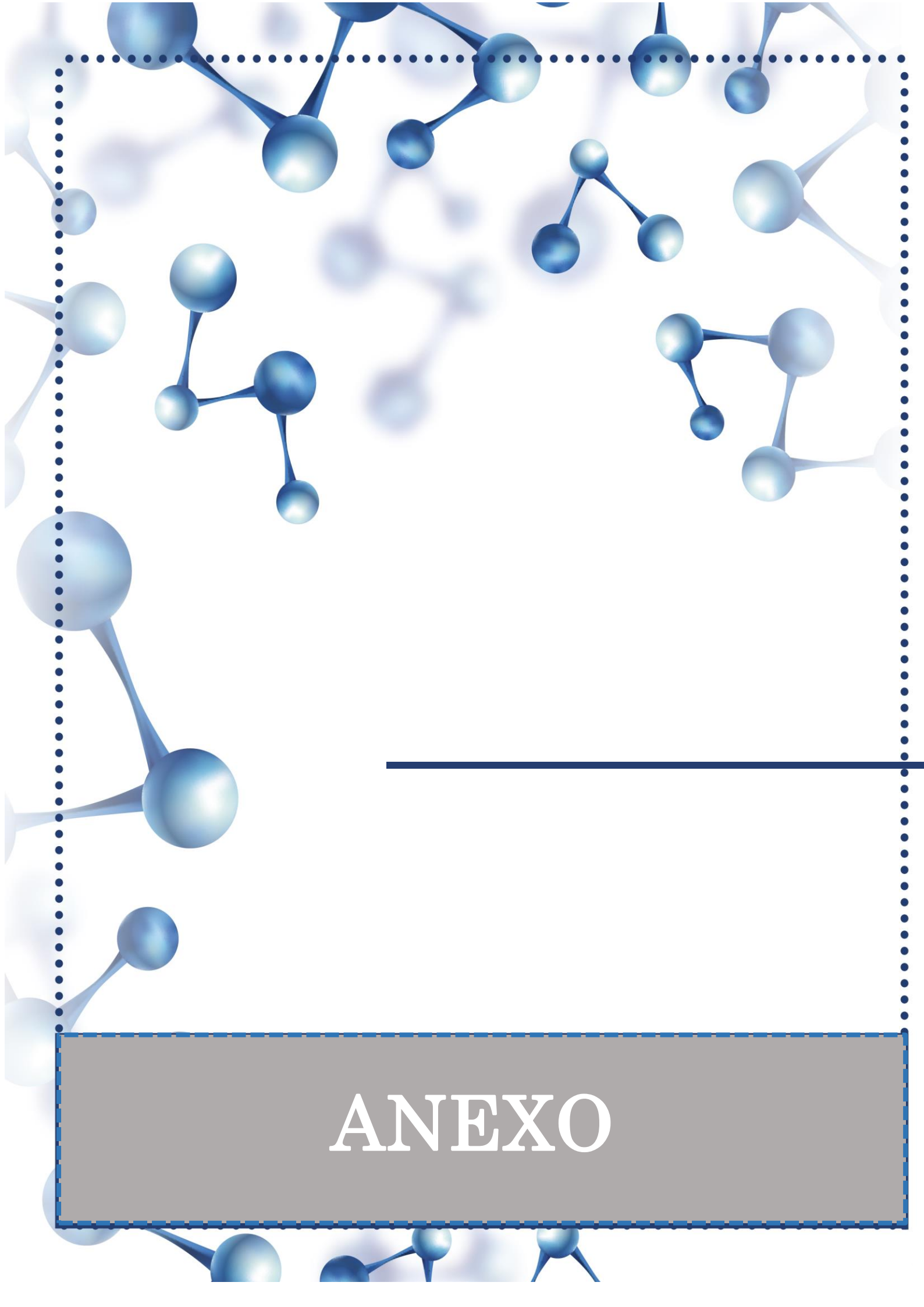
Wayne, P. (2015). *M100S Performance Standards for Antimicrobial (CLSI)*.

Weiswald, L. B., Bellet, D., & Dangles-Marie, V. (2015). Spherical Cancer Models in Tumor Biology. In *Neoplasia (United States)* (Vol. 17, Issue 1, pp. 1–15). Neoplasia Press, Inc. <https://doi.org/10.1016/j.neo.2014.12.004ANE>

Winer, A., Adams, S., & Mignatti, P. (2019). *Past Failures into Future Successes*. 17(6), 1147–1155. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-17-0646.Matrix>

Yang, H., Villani, R. M., Wang, H., Simpson, M. J., Roberts, M. S., Tang, M., & Liang, X. (2018). The role of cellular reactive oxygen species in cancer chemotherapy. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, 37(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s13046-018-0909-x>

Zhang, Y., Wan, R., Zhang, Q., & Mo, Y. (2019). *Chapter 8. 1894*, 133–143. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8916-4>

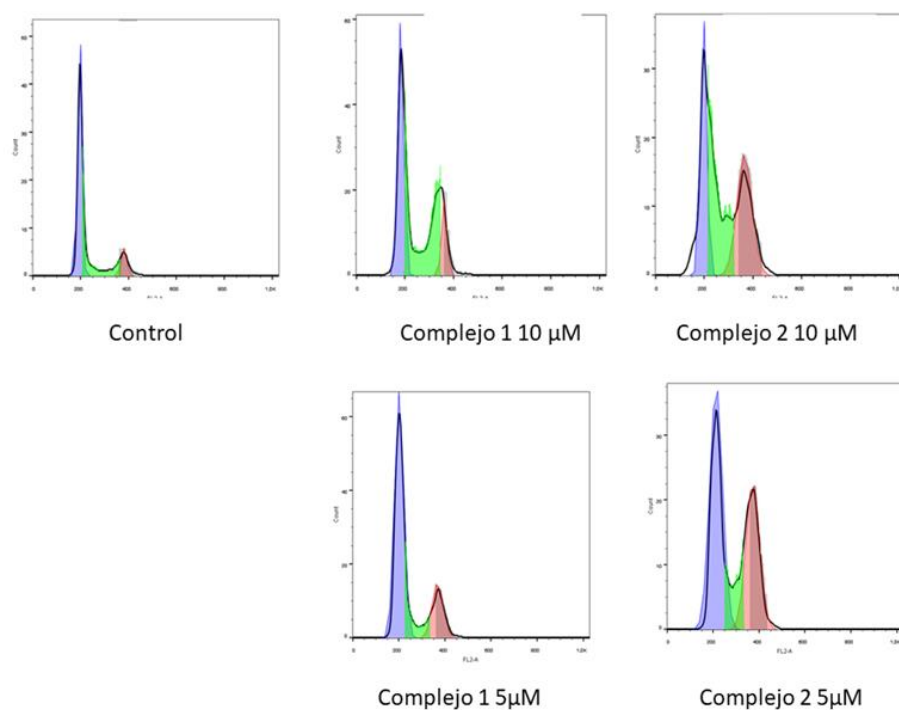


ANEXO

6. ANEXO

Figura 1. Ciclo celular. Histograma de frecuencias obtenidos en el citometro de flujo, luego del tratamiento con los complejos de rutenio de las lineas celulares A: MG-63, B: A549 y C: MCF7

A.



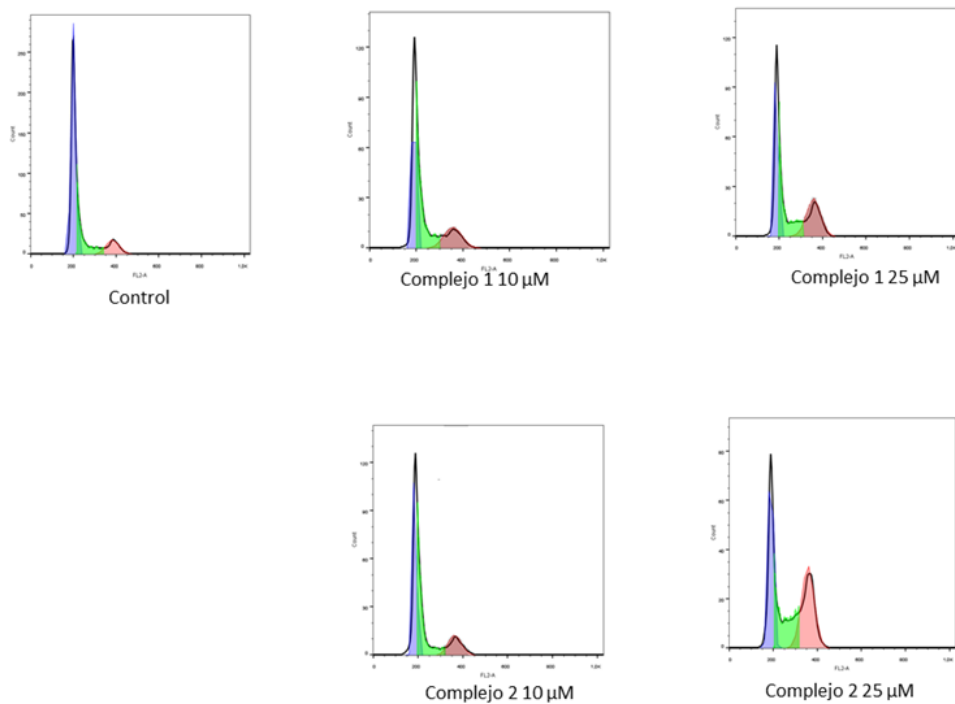
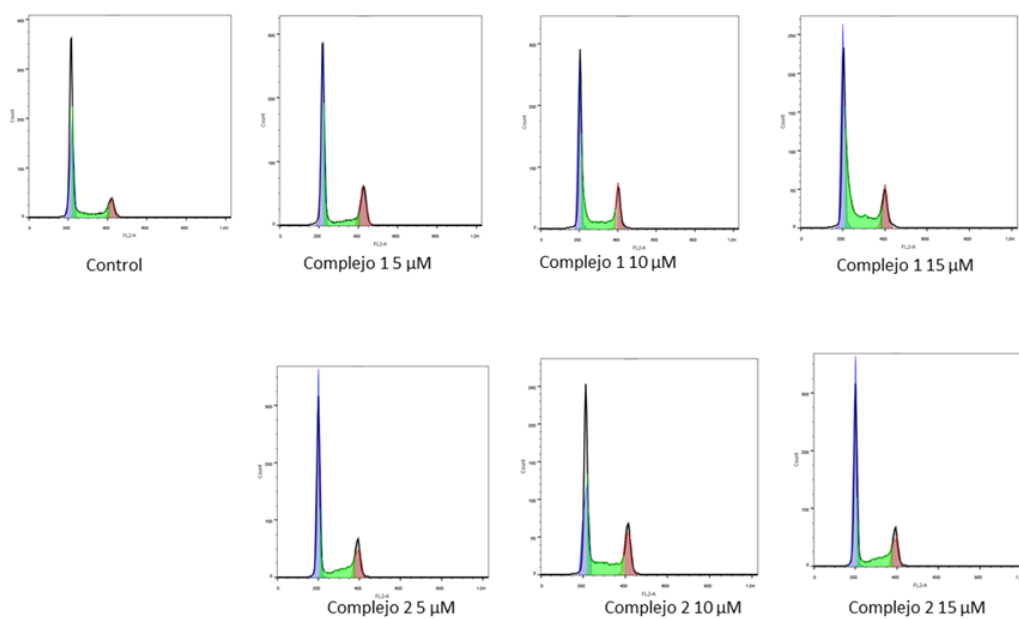
B.**C.**

Figura 2. Tablas y *dot plots* de los resultados de apoptosis Línea celular (A) MG-63, (B) A549, (C) MCF7, obtenidos luego del tratamiento con los complejos de rutenio.

A.

| | V+ | V+IP+ | IP+ |
|-------------------|------------|-----------|------------|
| Control | 1.13 ±0.34 | 0.78±0.29 | 5.15±0.57 |
| Complejo 1 2.5 µM | 2.58±0.72 | 1.76±0.90 | 6.32±0.89 |
| Complejo 1 5 µM | 3.77±0.76 | 3.27±0.60 | 11.85±1.90 |
| Complejo 1 10 µM | 1.70±0.08 | 1.94±0.17 | 16.07±0.55 |
| Complejo 2 2.5 µM | 1.79±0.36 | 1.07±0.29 | 8.18±1.19 |
| Complejo 2 5 µM | 0.98±0.59 | 0.71±0.26 | 13.67±2.05 |
| Complejo 2 10 µM | 6.11±0.55 | 1.83±0.16 | 6.16±1.17 |

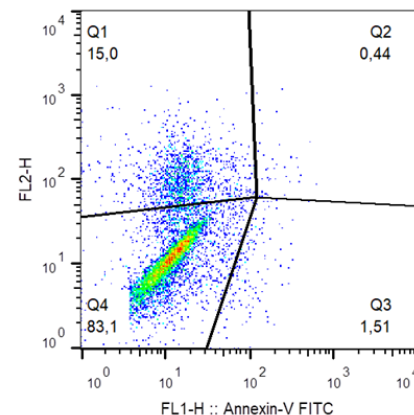
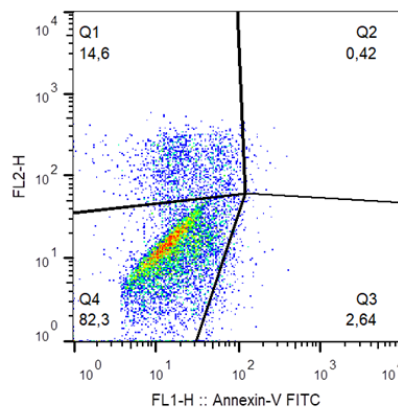
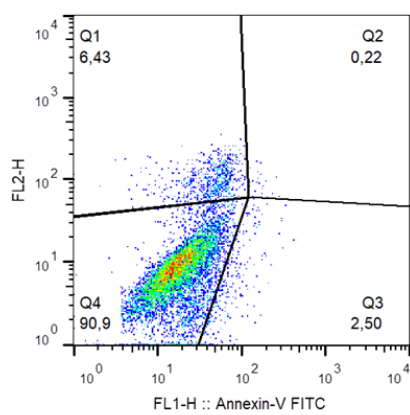
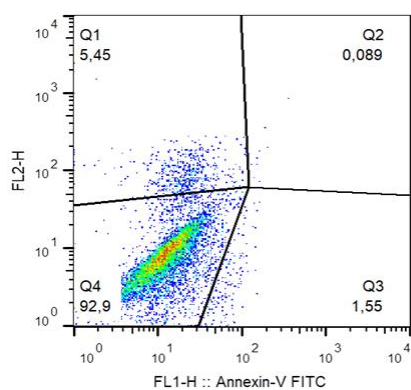
B.

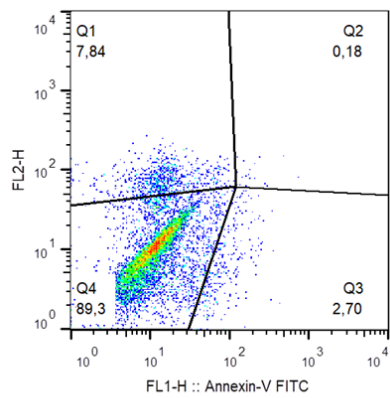
| | V+ | V+IP+ | IP+ |
|-------------------|------------|-----------|-----------|
| Control | 1.94±0.32 | 0.53±0.15 | 1.98±0.67 |
| Complejo 1 2.5 µM | 1.70 ±0.04 | 0.26±0.08 | 2.41±0.73 |
| Complejo 1 5 µM | 2.49±1.04 | 0.43±0.22 | 5.09±0.56 |
| Complejo 1 10 µM | 0.68±0.22 | 0.36±0.05 | 3.66±0.36 |
| Complejo 2 2.5 µM | 2.94±0.67 | 0.57±0.21 | 2.05±0.88 |
| Complejo 2 5 µM | 2.09±0.34 | 0.28±0.03 | 2.48±0.75 |
| Complejo 2 10 µM | 1.62±0.21 | 0.23±0.01 | 3.60±0.25 |

C.

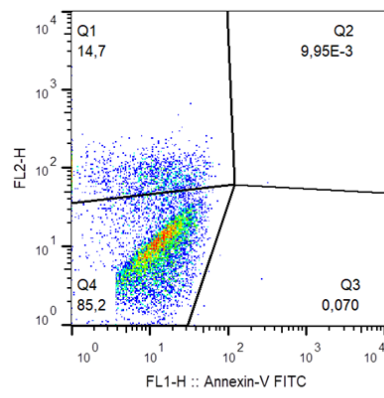
| | V+ | V+IP+ | IP+ |
|------------------|-----------|------------|------------|
| control | 0.43±0.02 | 2.31±0.25 | 6.62±0.35 |
| complejo 1 5 µM | 1.40±0.20 | 6.99±0.86 | 5.14±0.53 |
| complejo 1 10 µM | 0.96±0.18 | 16.13±2.73 | 9.80±0.93 |
| complejo 1 15 µM | 1.23±0.25 | 27.39±4.92 | 16.75±0.48 |
| complejo 2 5 µM | 2.09±0.76 | 17.29±1.51 | 10.19±3.04 |
| Complejo 2 10 µM | 1.04±0.38 | 27.12±0.39 | 37.82±2.01 |
| Complejo 2 15 µM | 0.03±0.01 | 4.23±0.93 | 92.38±0.99 |

A.

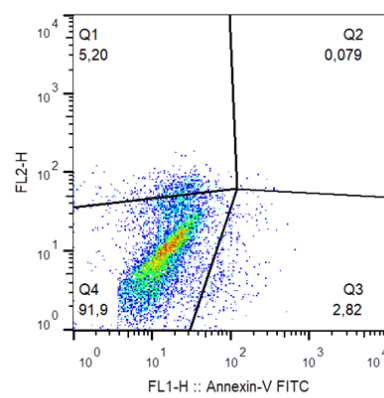




Complejo 2 2.5 μ M

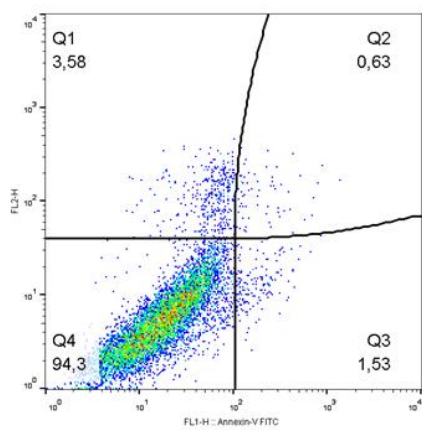


Complejo 2 5 μ M

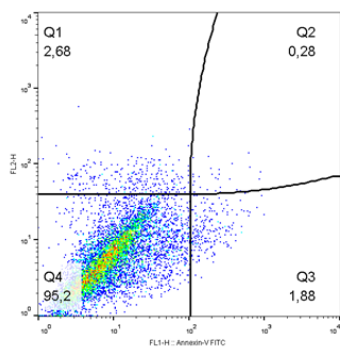


Complejo 2 10 μ M

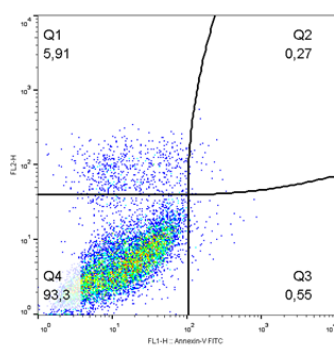
B.



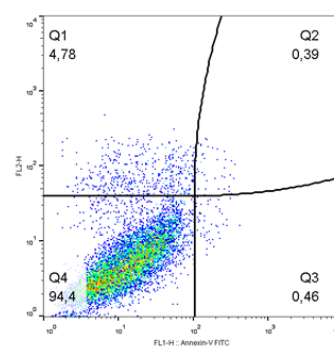
Control



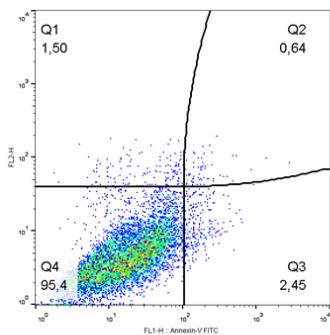
Complejo 1 2.5 μ M



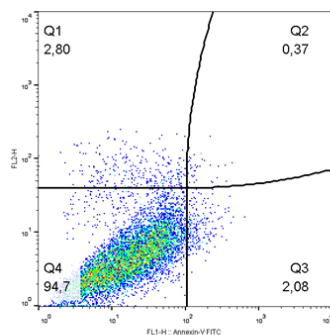
Complejo 1 5 μ M



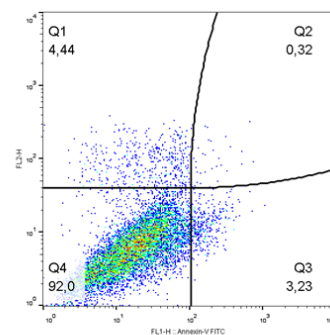
Complejo 1 10 μ M



Complejo 2 2.5 μ M

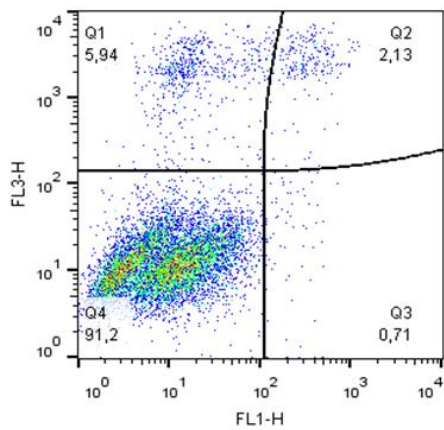


Complejo 2 5 μ M

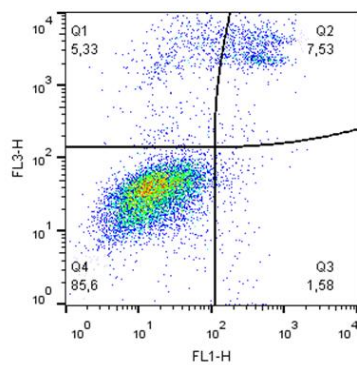


Complejo 2 10 μ M

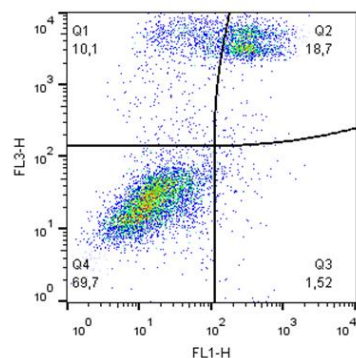
C.



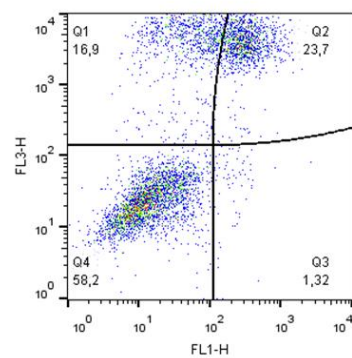
Control



Complejo 1 5 μ M



Complejo 1 10 μ M



Complejo 1 15 μ M

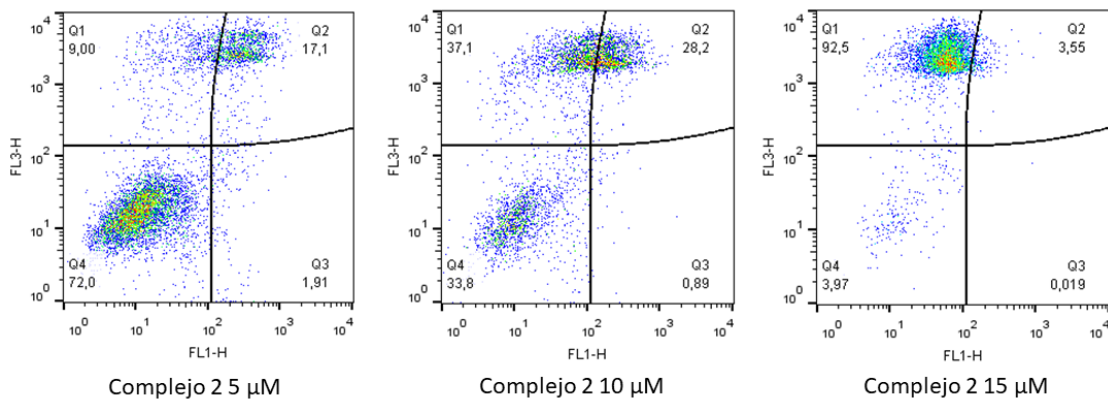


Figura 3. Viabilidad esferoides de las líneas celulares A: MG-63, B: A549 y C: MCF7 luego del tratamiento con los complejos de rutenio.

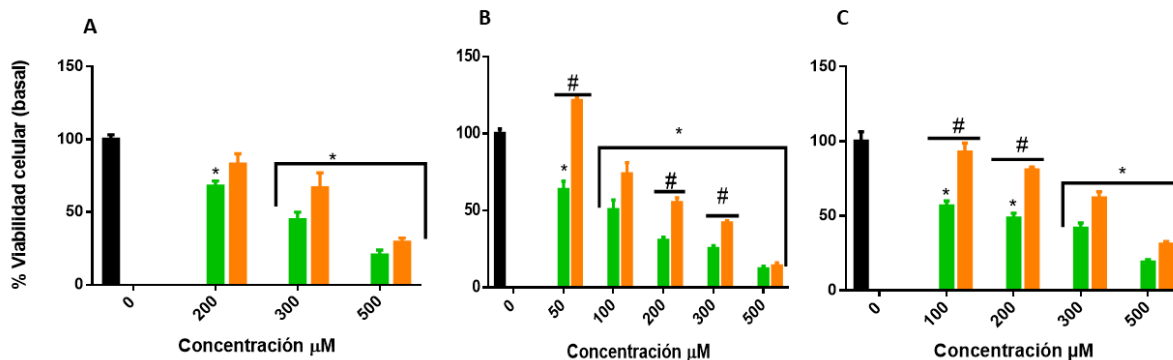


Figura 4. PMM. Histogramas de frecuencia poblacional originados a partir del estudio de la alteración del PMM de la línea celular HT-29 luego del tratamiento con los complejos de cobre. Se observan las 2 poblaciones celulares, polarizadas (con mayor fluorescencia) y despolarizadas (con menor fluorescencia).

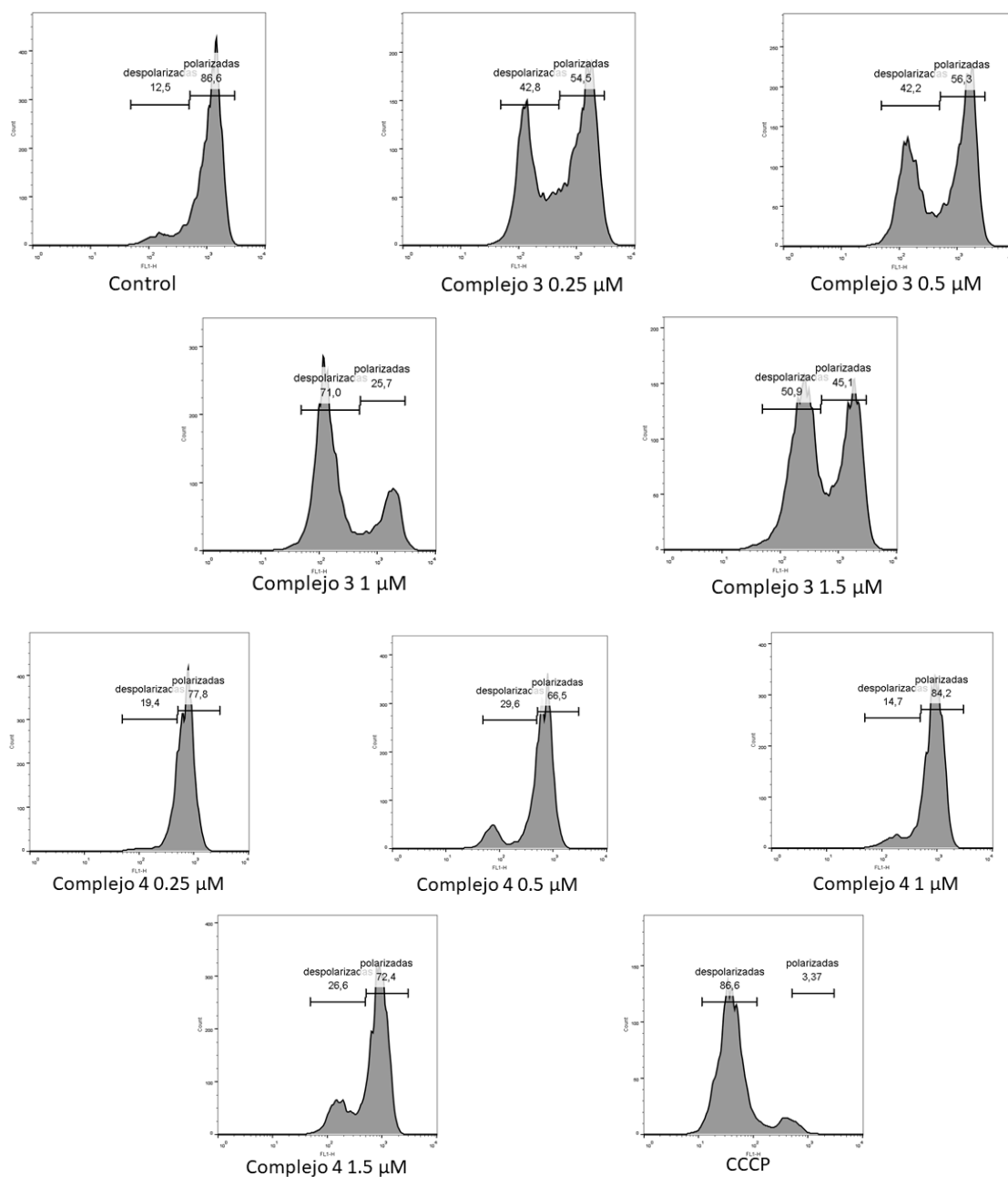


Figura 5. Histograma de frecuencia del ciclo celular de la línea celular CACO-2, luego del tratamiento con los complejos de cobre por 24 hrs.

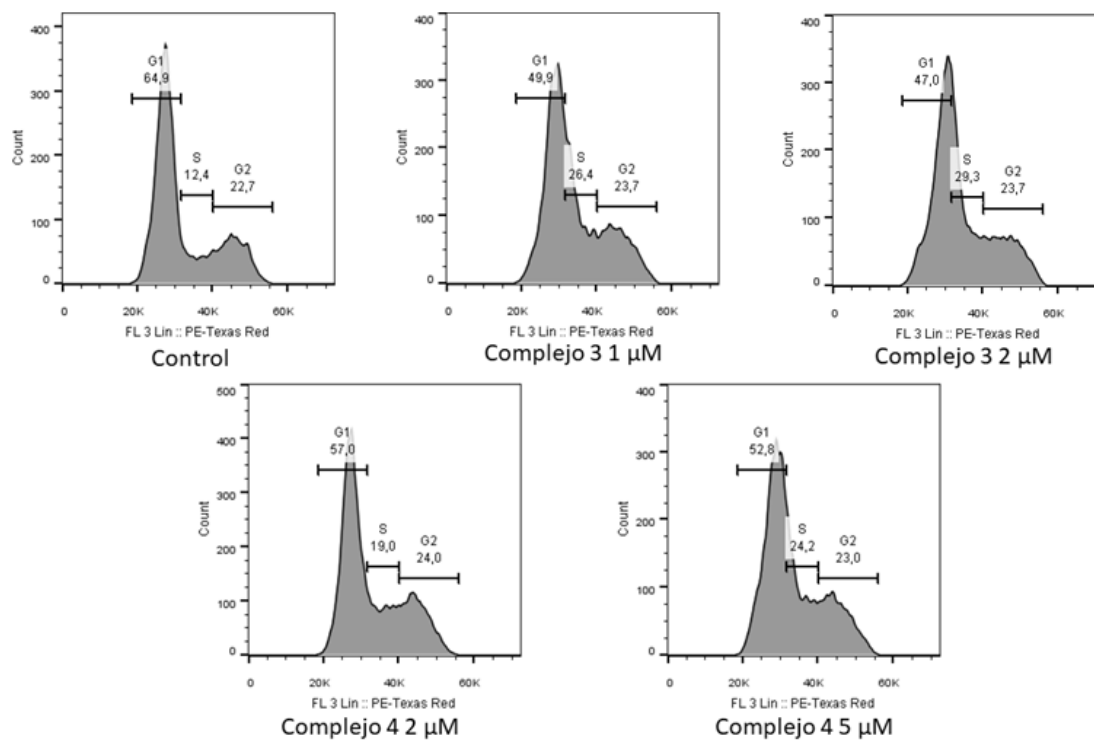


Figura 6. Dot Plots. Apoptosis de la línea celular Caco-2, luego del tratamiento con los complejos de cobre por 6 hrs.

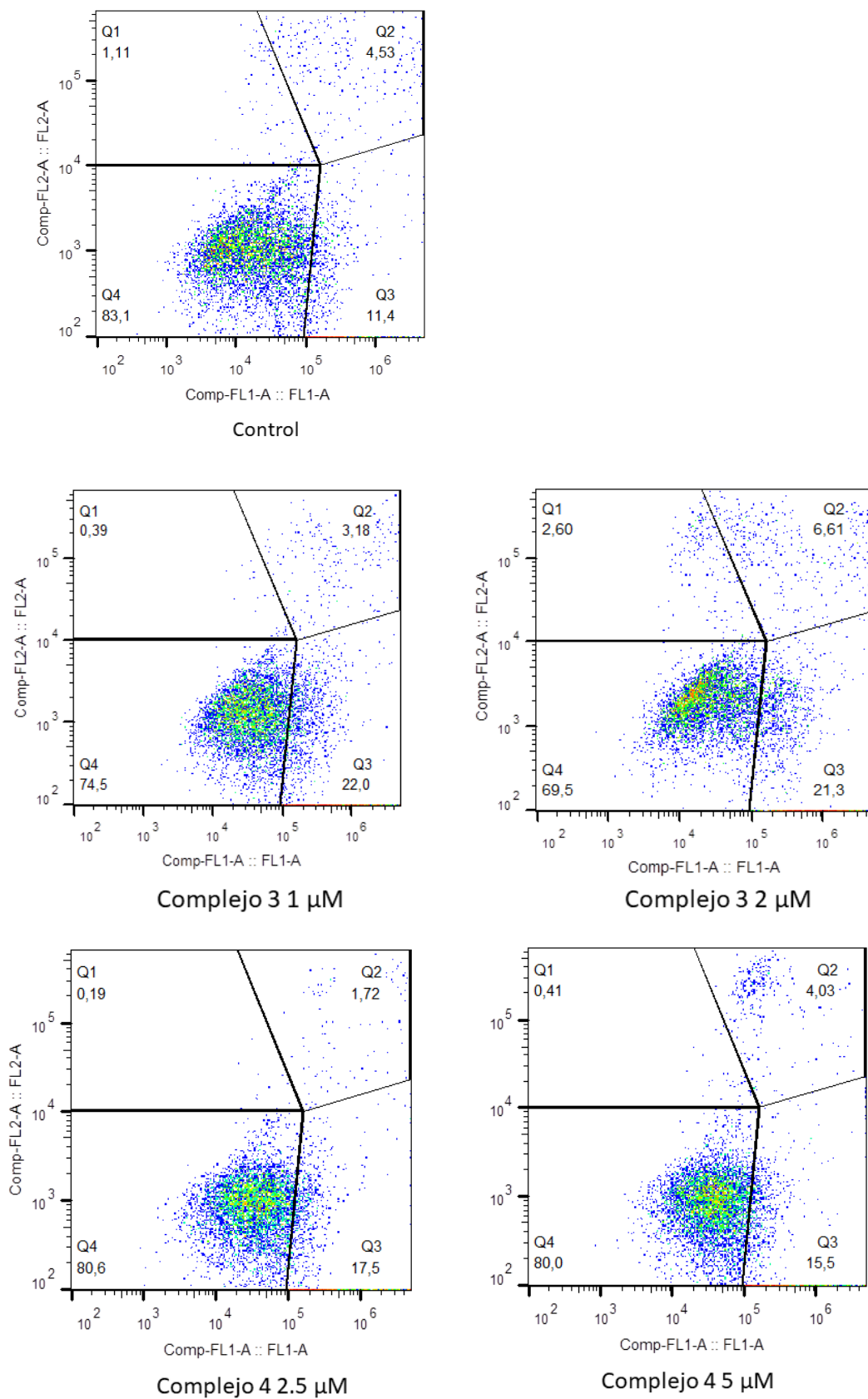
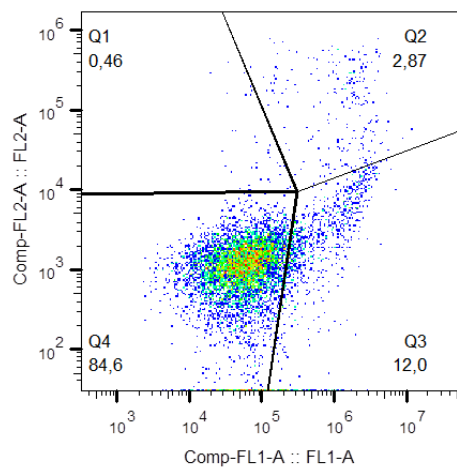
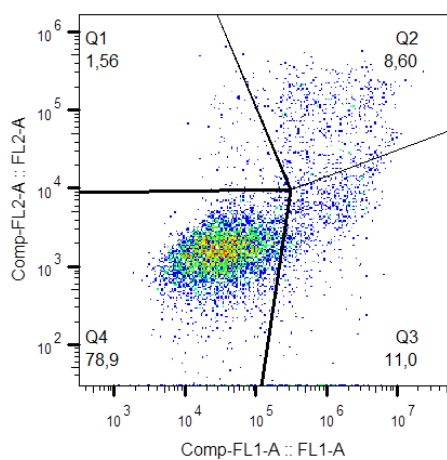


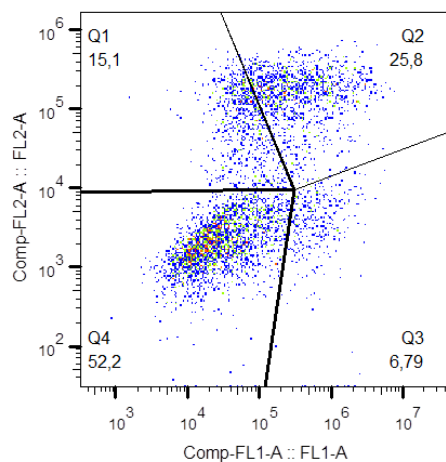
Figura 7. Dot Plots. Apoptosis de la línea celular Caco-2, luego del tratamiento con los complejos de cobre por 24 hrs.



Control



Complejo 3 0.5 μ M



Complejo 3 1 μ M

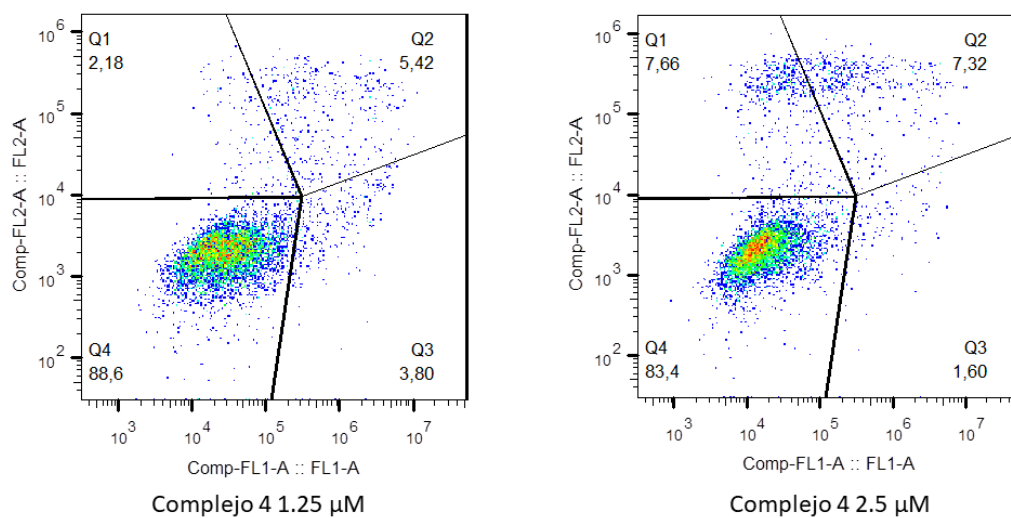
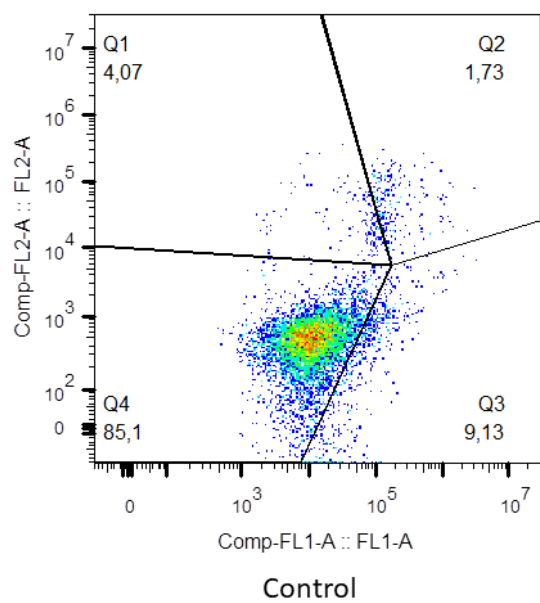


Figura 8. Dot Plots. Apoptosis de la línea celular LS174T, luego del tratamiento con los complejos de cobre por 6 hrs.



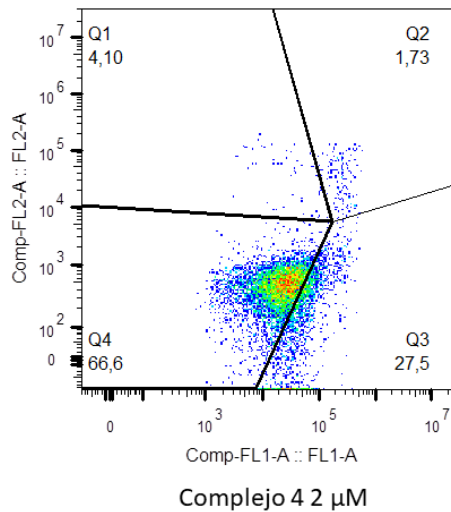
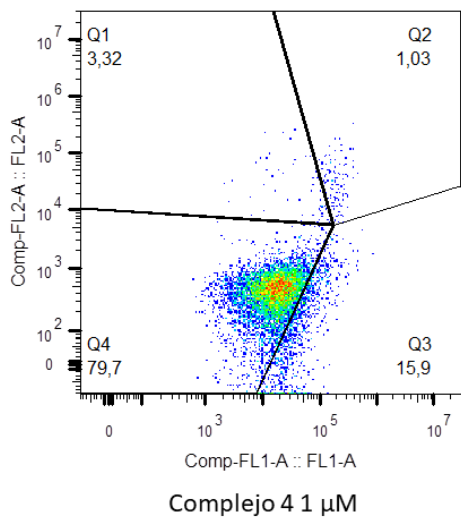
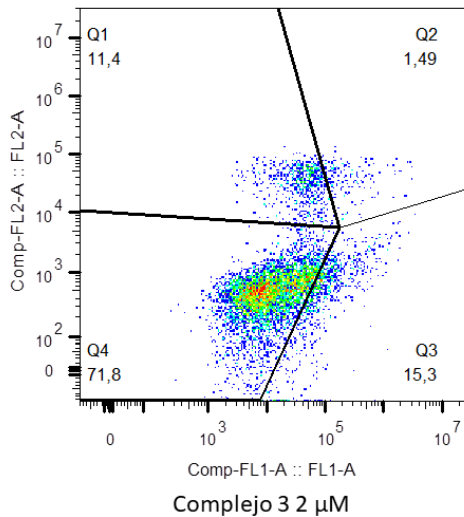
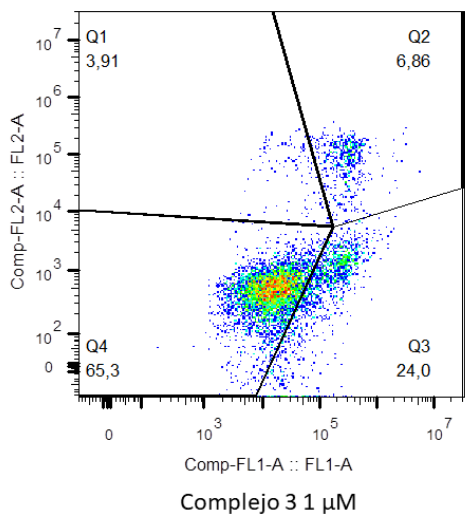
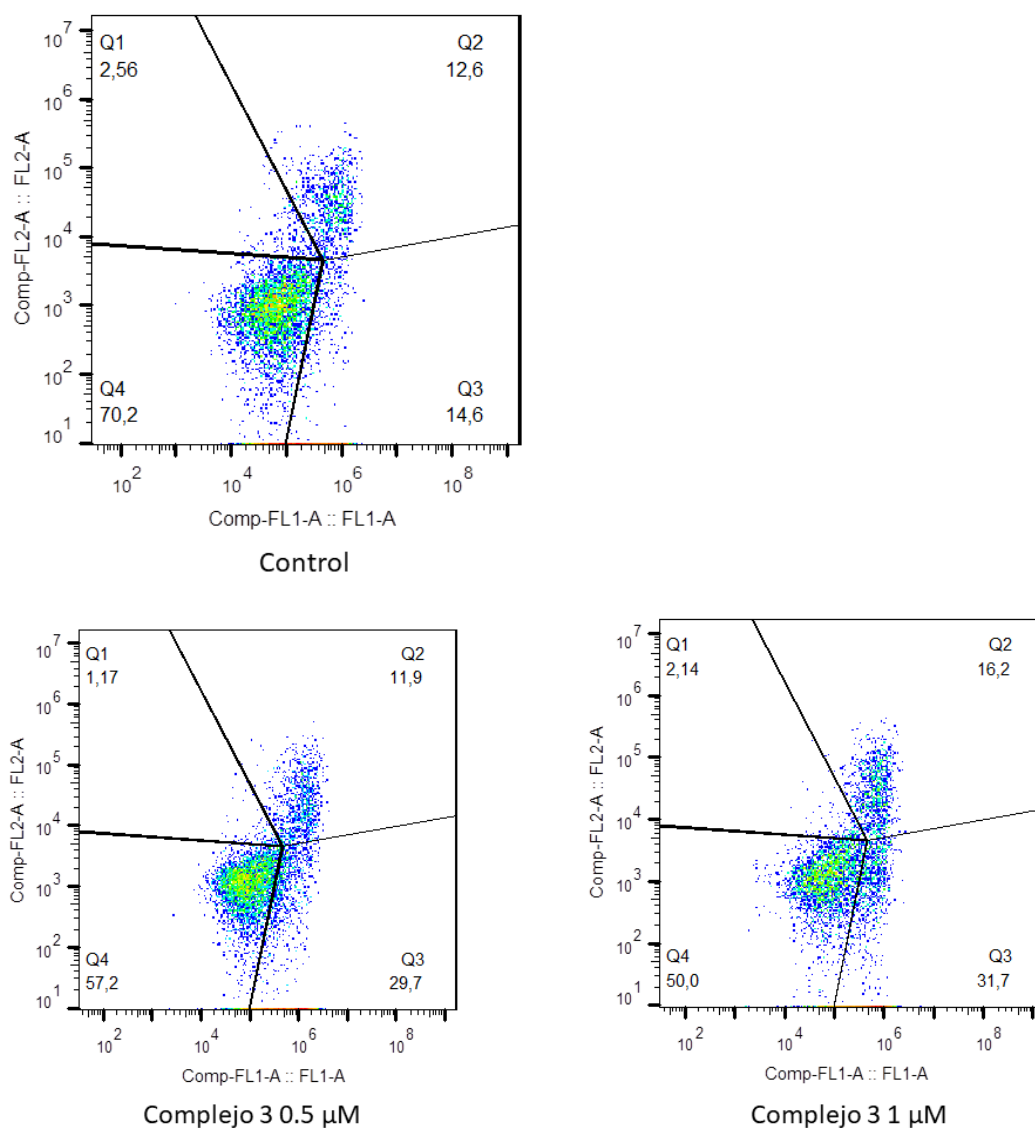
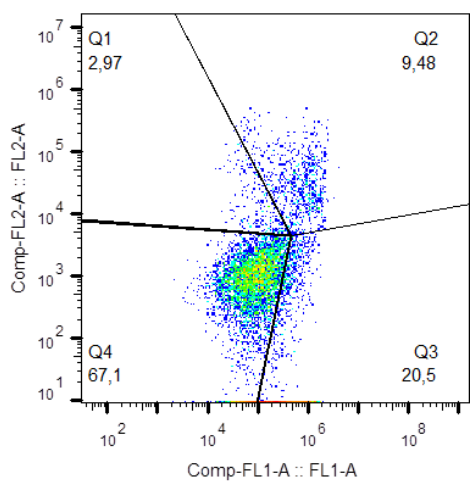
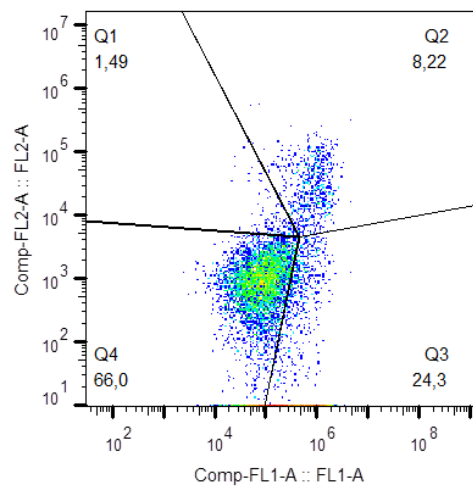


Figura 9. Dot Plots. Apoptosis de la línea celular LS174T, luego del tratamiento con los complejos de cobre por 24 hrs.



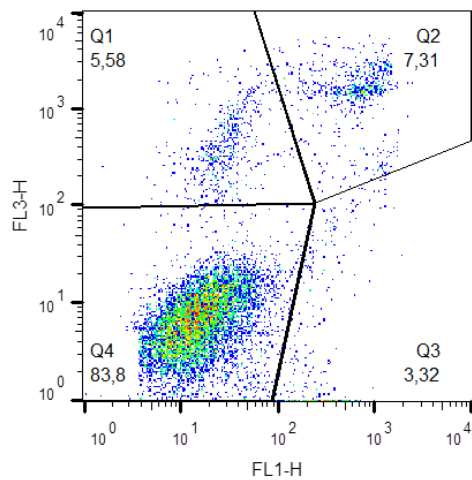


Complejo 4 0.5 μ M



Complejo 4 1 μ M

Figura 10. Dot plot de la línea celular HT29, luego de 24 hrs de tratamiento con los complejos de cobre



Control

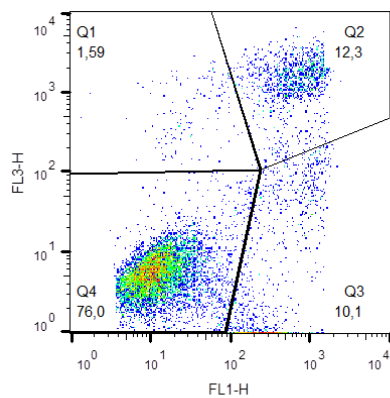
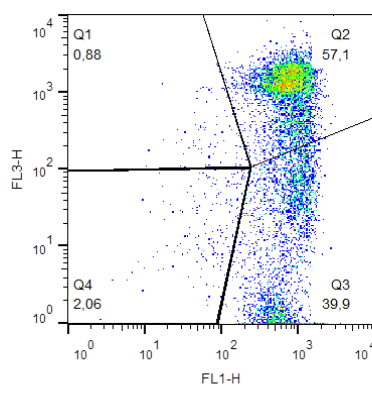
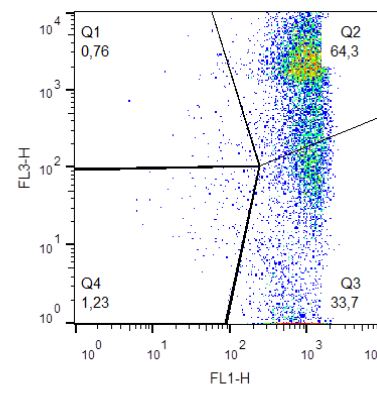
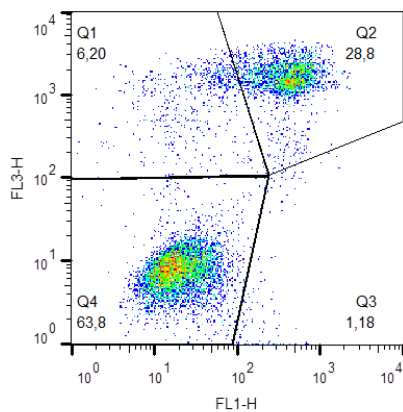
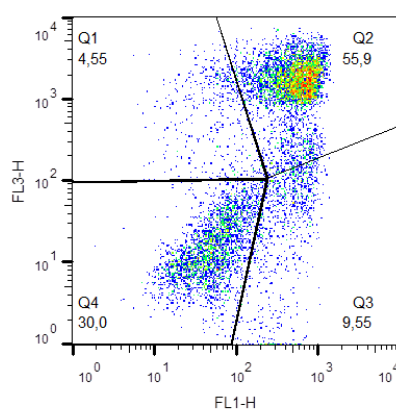
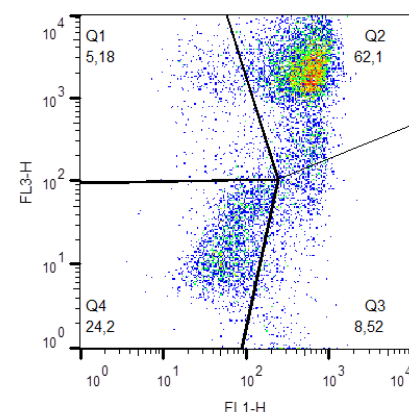
Complejo 3 1 μ MComplejo 3 2.5 μ MComplejo 3 3 μ MComplejo 4 1 μ MComplejo 4 2.5 μ MComplejo 4 3 μ M

Figura 11. Dot plot, activación de caspasa luego de 3 hrs de tratamiento con los complejos de cobre, de la línea celular Caco2.

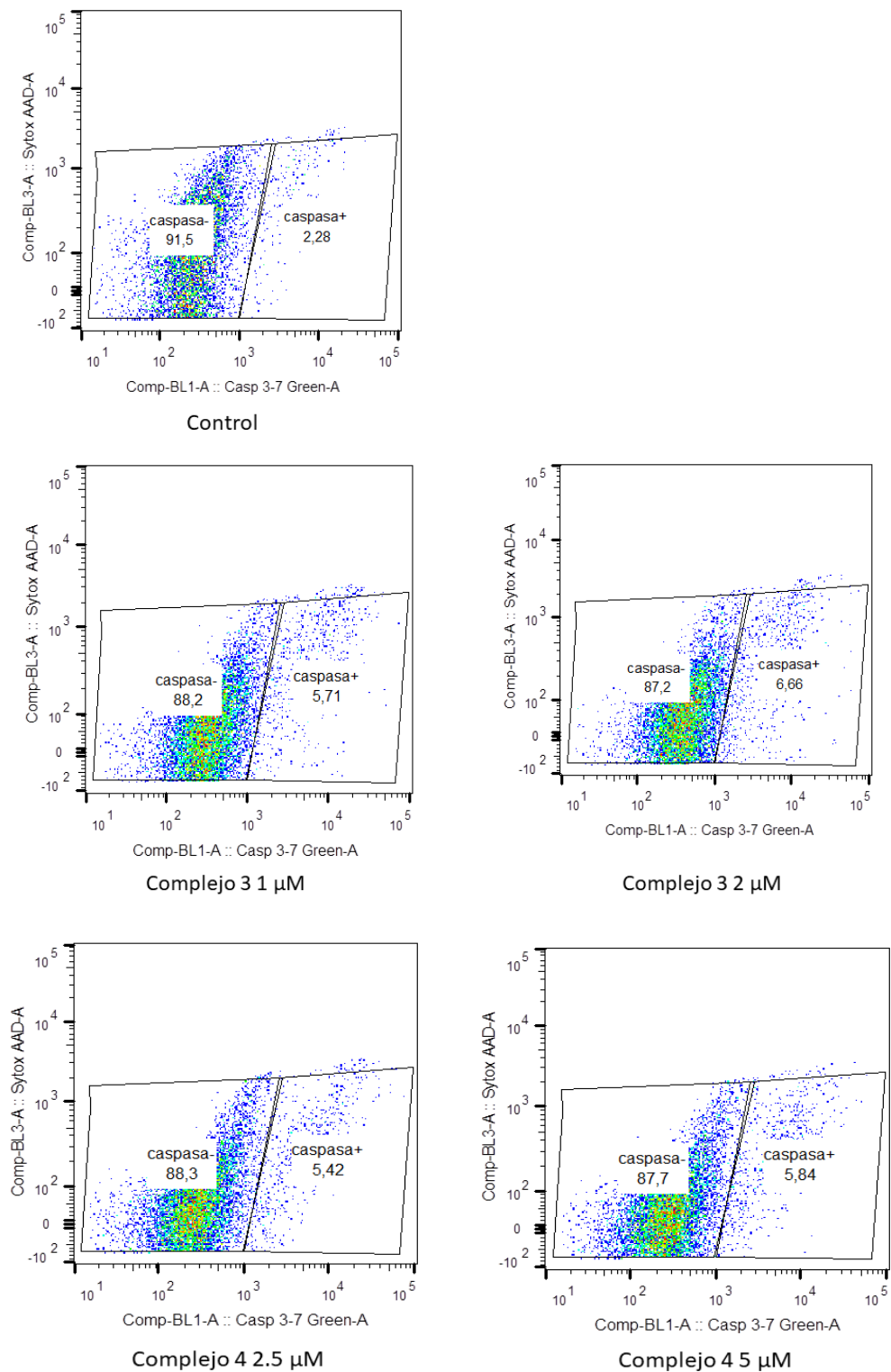
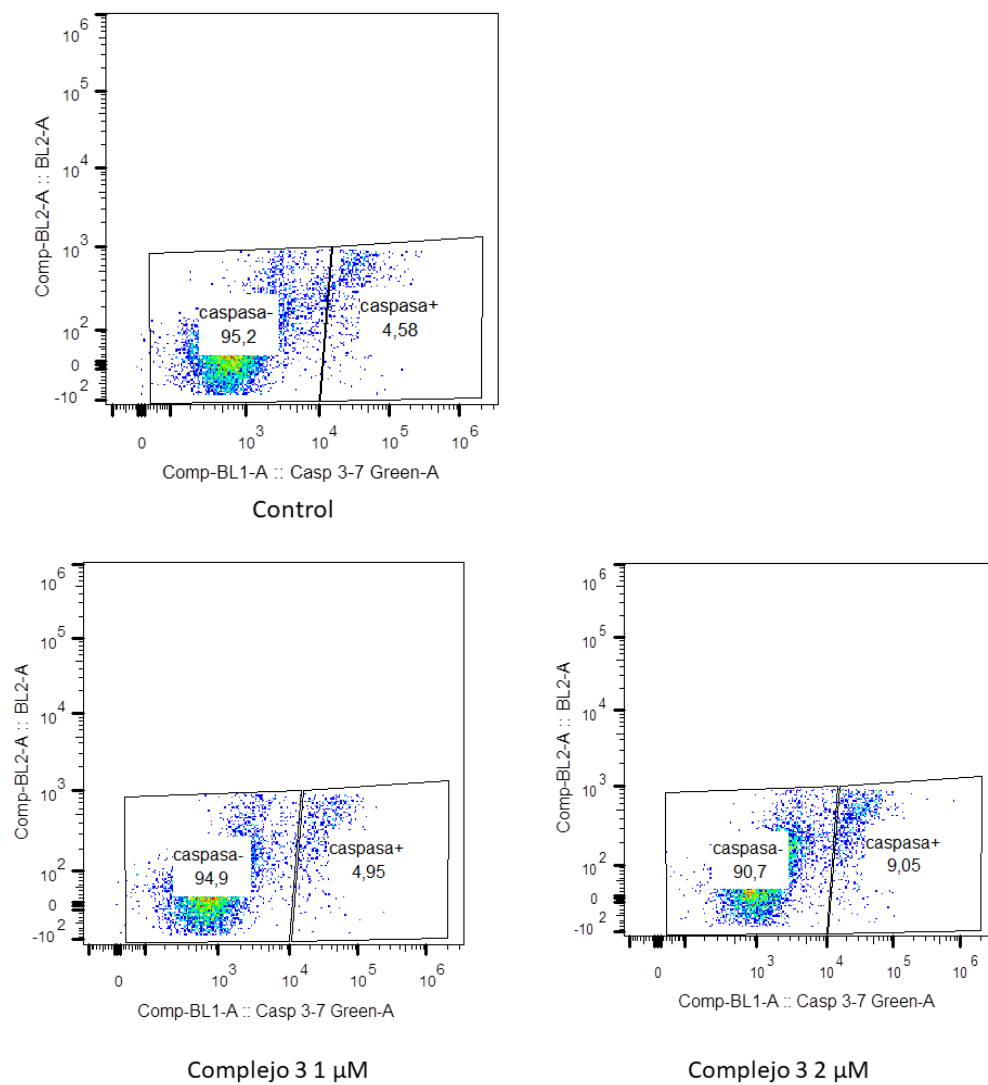


Figura 12. *Dot plot*, activación de caspasa luego de 6 hrs de tratamiento con los complejos de cobre, de la línea celular Caco2.



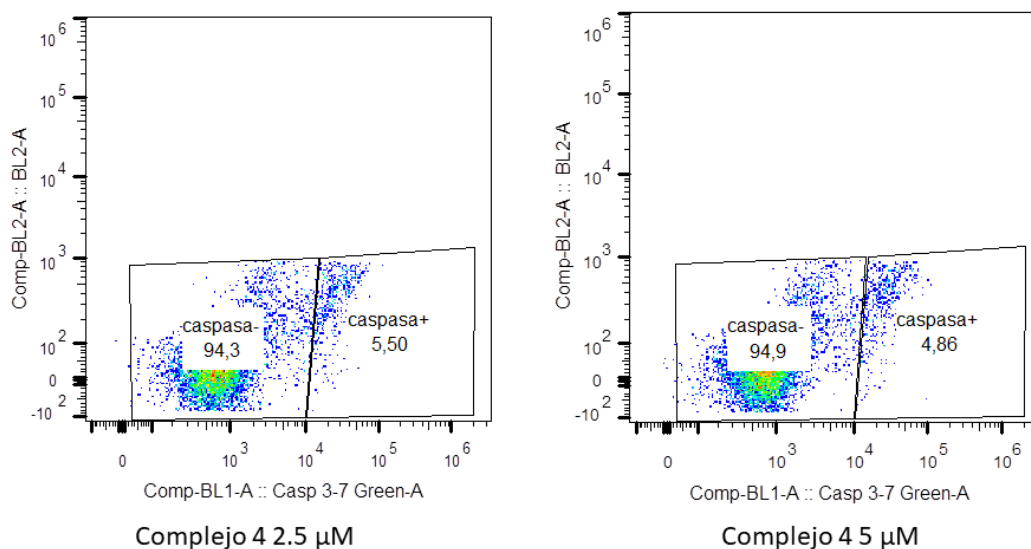


Figura 13. Viabilidad esferoides luego del tratamiento de los mismos con los complejos de cobre. A: MG-63, B: A549, C: MCF7

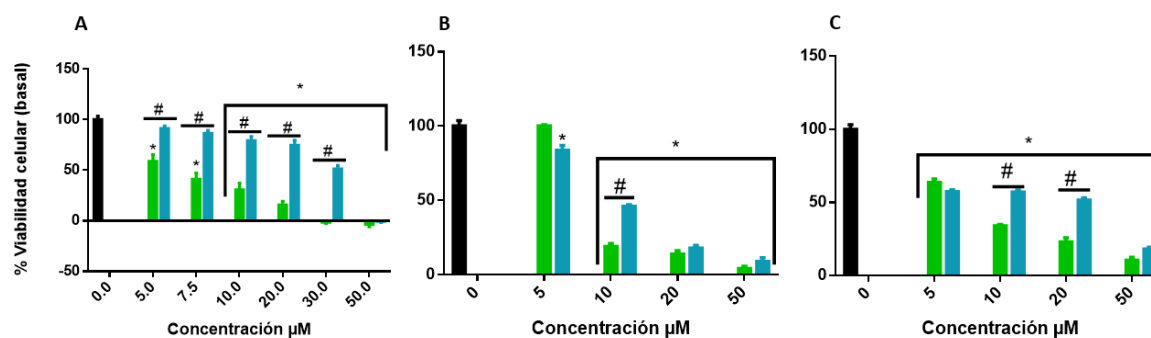


Figura 14. Viabilidad esferoides de la línea MG-63 bajo la acción de CisPt.

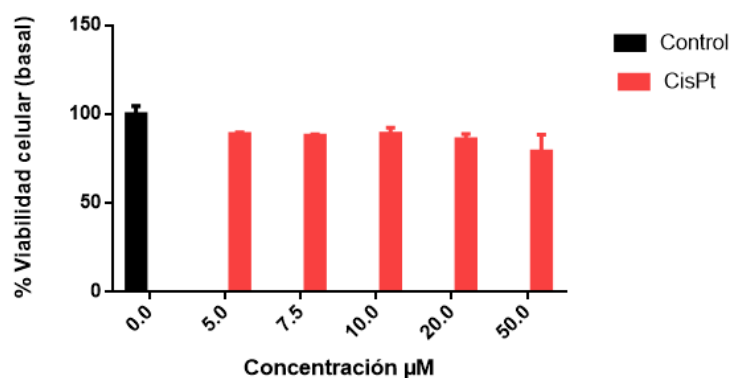


Figura 15. *Dot-blot*, obtenidos en el citómetro de flujo al analizar los esferoides estimulados con TNF- α , luego del tratamiento.

