

El presente trabajo desarrollado bajo la Dirección de la Dra. Susana B Etcheverry y la Codirección de la Dra. Ana M Cortizo, en la Cátedra de Bioquímica Patológica (Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata), constituye la Tesis Doctoral que elevo a consideración de las autoridades correspondientes, para optar al grado de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas.

La Plata, diciembre de 2005.

A mi madre, por enseñarme con su ejemplo, no sólo el espíritu de superación y ansias de conocimiento, sino también el amor a las Ciencias Farmacéuticas...

A Germán, por iluminar mi vida cada día...

Agradecimientos

Quiero expresar mi agradecimiento a todos aquellos que contribuyeron a la realización de este trabajo de tesis:

☞ A la Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata.

☞ Al CONICET, ANPCYT, CICPBA y UNLP, por aportar los fondos para el desarrollo de este trabajo de Tesis.

☞ Al Colegio de Farmacéuticos de La Provincia de Buenos Aires, por otorgarme la Beca que permitió el comienzo de mis estudios doctorales.

☞ Al CONICET, por otorgarme la Beca que permitió la continuación de mis estudios de Tesis.

-
- ✧ A Ana, mi mamá postiza, por todo lo compartido en estos años.
 - ✧ A Nené, por su guía, paciencia y cariño.
 - ✧ A Germán, por estar a mi lado acompañándome en los largos fines de semana de trabajo
 - ✧ A mis hermanos, por apoyarme continuamente, por quererme y estar siempre a mi lado.
 - ✧ A mi familia, por su apoyo constante, por su cariño y comprensión.
 - ✧ A la Dra. Adriana Scoccia, por brindarme su tiempo, sus conocimientos, su cariño y aliento en todo momento.
 - ✧ A la Dra. Liliana Bruzzone, por su cariño y por su invaluable ayuda en el desarrollo de los experimentos de fluorescencia.
 - ✧ A Natalia Melgar, por ayudarme en el diseño y presentación de este trabajo.
 - ✧ A Susana Tinelli, por sus alentadores matecitos dulces.



Índice

| | <i>Página</i> |
|--|---------------|
| 1. Introducción | 10 |
| 1.1 Vanadio un poco de historia | 11 |
| 1.2 Fisicoquímica del vanadio | 11 |
| 1.3 El vanadio en la naturaleza | 12 |
| 1.3.1 Impacto de la deficiencia de vanadio en animales superiores | 13 |
| 1.4 Efectos biológicos | 13 |
| 1.4.1 Toxicidad del vanadio y sus derivados | 14 |
| 1.4.2 Lipoperoxidación inducida por vanadio | 16 |
| 1.5 Fisiología del tejido óseo y sus mecanismos regulatorios básicos | 17 |
| 1.5.1 Reguladores locales de la homeostasis ósea | 18 |
| 1.5.2 Remodelado óseo a través de una unidad básica multicelular | 19 |
| 1.5.3 Osteoblastogénesis y osteoclastogénesis | 20 |
| 1.6 Cáncer | 22 |
| 1.6.1 Teoría del suelo y la semilla | 24 |
| 1.6.2 Mecanismos de las metástasis óseas | 25 |
| 1.6.3 Tratamiento antineoplásico | 27 |
| 1.6.4 Efectos antitumorales del vanadio | 27 |
| | |
| 2. Hipótesis | 30 |
| 2.1 Definición del problema | 31 |
| 2.2 Datos previos que soportan la hipótesis | 31 |
| Hipótesis | 31 |
| 2.3 Objetivos | 31 |
| 2.4 Modelo celular de estudio | 32 |
| | |
| 3. Materiales y Métodos | 34 |
| 3.1 Métodos generales | 35 |
| a.- Síntesis de los complejos de vanadio | 35 |
| b.- Ensayos de solubilidad | 36 |
| c.- Estudios de estabilidad | 36 |
| c.1.- Estabilidad en fase sólida | 36 |
| c.2.- Estabilidad en solución | 36 |
| d.- Cultivos celulares | 36 |
| 3.2 Ensayos de citotoxicidad | 37 |

| | |
|--|-----------|
| a.- Estudios morfológicos | 37 |
| b.- Ensayo mitogénico | 37 |
| c.- Estudio de la producción de radicales libres | 38 |
| c.1.-Detección de especies oxidantes: OH [·] y ONOO [·] / ONOOH | 38 |
| c.2.- Estudio de la producción de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico | 38 |
| c.3.- Producción de óxido nítrico | 39 |
| c.4.- Western blot para eNOS e iNOS | 39 |
| d.- Estudios de apoptosis | 39 |
| d.1.- Evaluación de la morfología apoptótica | 39 |
| d.2.- Evaluación de la externalización de fosfatidilserina | 40 |
| e.- Evaluación de la funcionalidad mitocondrial. Estudios del potencial de membrana mitocondrial | 40 |
| e.1.- Ensayo de reducción de azul de nitrotetrazolio (NBT) | 40 |
| e.2.- Ensayo de deslocalización de rodamina 123 | 40 |
| 3.3.- Estudios de potencialidad antitumoral | 41 |
| a.- Ensayos de adhesión celular | 41 |
| b.- Inmunofluorescencia para fibras de actina | 41 |
| c.- Ensayos de migración | 42 |
| d.- Estudios sobre el desarrollo de unidades formadoras de colonias | 43 |
| 4. Resultados | 44 |
| 4.1. Estudios de solubilidad y estabilidad | 44 |
| 4.1.a.- Determinación de la solubilidad | 45 |
| 4.1.b.- Estabilidad de los complejos de vanadio | 46 |
| 4.2. Ensayos de citotoxicidad | 47 |
| 4.2.a.- Evaluación de la morfología celular | 49 |
| 4.2.b.- Efectos sobre el crecimiento celular | 50 |
| 4.2.c.- Evaluación de la apoptosis celular | 52 |
| 4.2.d.- Estudios de producción de especies reactivas de oxígeno | 52 |
| 4.2.d.i.- Producción intracelular de ROS. Ensayo con dihidrorrodamina | 53 |
| 4.2.d.ii.- Evaluación de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico | 53 |
| 4.2.e.- Efecto de los complejos de vanadilo sobre la funcionalidad | 54 |

| | |
|--|-----------|
| mitocondrial | |
| 4.2.e.i.- Ensayo de reducción de NBT | 54 |
| 4.2.e.ii.- Tinción mitocondrial con Rh123 | 55 |
| 4.3.- Evaluación de la capacidad antitumoral de los complejos de vanadilo(IV) | 55 |
| 4.3.1.- Ensayos de adhesión / spreading celular | 58 |
| 4.3.2.- Inmunofluorescencia para fibras de estrés | 58 |
| 4.3.3.- Efecto de los complejos de vanadio sobre la migración celular | 58 |
| 4.3.4.- Evaluación de la capacidad antimetastásica | 58 |
| 4.4.- Determinación de la acción de VOAspi sobre células relacionadas al tejido óseo | 58 |
| 4.4.1.- Ensayo mitogénico | 59 |
| 4.4.2.- Efectos sobre la producción de óxido nítrico | 60 |
| 4.4.3.- Oxidación intracelular de dihidrorrodamina | 60 |
| 4.4.4.- Efecto de los complejos de vanadio sobre la NOS endotelial e inducible | 60 |
| 5. Discusión | 64 |
| 6. Conclusiones | 77 |
| 7. Bibliografía | 80 |
| 8. Publicaciones | 90 |

1. Introducción

1.1. Vanadio: un poco de historia

En la edad antigua, en Babilonia, aparecen las primeras prescripciones médicas escritas, las tablillas sumerias (2300 a.C.). Posteriormente, en el papiro de Ebers (1550 a.C.) del antiguo Egipto se citan algunos minerales (cobalto, azufre) para el tratamiento de enfermedades. Así, a lo largo de la historia de la farmacología, vemos como los metales han sido utilizados en terapéutica, llegando hasta nuestros días, donde aún existe el uso terapéutico de diversos minerales tales como platino, selenio, hierro, bismuto, calcio, vanadio, etc. (Litter 1986a).

El vanadio es un elemento del grupo V de los metales de transición de la tabla periódica. Fue descubierto por el español Del Río en 1801, quien le dio el nombre de erytronium, debido al color rojo intenso que presentaban los minerales que contenían



Figura 1.1.- Vanadis, diosa nórdica de la belleza, el misterio y la guerra. El vanadio recibe este nombre en su honor.

vanadio. Sin embargo, este elemento debe su denominación actual al suizo Nils Sefström quien lo redescubrió en 1830 y lo llamó vanadio en honor a Vanadis, la diosa escandinava de la belleza, el misterio y la guerra. Tal vez sea por esas dos primeras cualidades que haya sido nombrado de tal modo, ya que el vanadio presenta hermosos colores según sea su estado de oxidación que, al variar fácilmente en soluciones acuosas dependiendo del pH, le confería cualidades misteriosas (Nielsen 1995; Morinville et al 1998; Mukherjee et al 2004).

1.2. Físicoquímica del vanadio

El vanadio puro es un metal con brillo blanco - plateado, blando y dúctil (Tsiani y Fantus 1997, Mukherjee et al 2004). Sin embargo, no se presenta en estado puro, sino que forma parte de óxidos en diferentes minerales. En consecuencia, se obtiene como un subproducto del procesamiento de otros metales (Nielsen 1995; Tsiani y Fantus 1997).

Se encuentra ampliamente distribuido en la corteza terrestre, aunque en bajas concentraciones (0,02 %), formando parte de diversos óxidos y minerales. La concentración promedio del vanadio en aguas de río, lago y océano es de 10^{-5} g/L (Crans y Tracey 1998). En solución, el vanadio posee principalmente los estados de oxidación +4 y +5, bajo las formas de vanadilo (V(IV)) y vanadato (V(V)), respectivamente. Sin embargo, puede llevar a cabo una serie de reacciones autocatalíticas

y de autocondensación. Estas reacciones son muy sensibles al pH de la solución y a la presencia de ligandos que puedan coordinar al vanadio para formar distintos complejos con geometrías de coordinación diferentes. A pH neutro o básico, el vanadilo puede oxidarse por acción del aire a vanadato, a menos que se halle estabilizado por complejación. La complejación también evita que precipite a pH neutro. Las especies de vanadio(IV) tienen gran afinidad por ligandos con grupos nitrogenados, oxigenados o sulfurados (Crans y Tracey 1998).

La esfera de coordinación interna de los metales de transición, tales como el vanadio, poseen una geometría bien definida, mientras que la esfera externa de coordinación no está sujeta a tales limitaciones. Los ligandos dentro de la esfera interna donan pares de electrones al metal, confiriéndole un alto grado de carácter covalente al enlace resultante. La facilidad relativa con la cual un ligando puede entrar y salir de la esfera de coordinación interna tipifica los complejos "lábil", mientras que la ausencia de movimiento caracteriza los complejos "inertes" (Morinville et al 1998).

El vanadilo forma fuertes complejos con funciones carboxilato que resultan más estables que los formados con arilóxidos ó alcóxidos. Por otro lado, tanto cisteínas como glutamatos pueden formar complejos muy estables con el vanadilo, a pH muy similares a los pKa del tiol (Crans y Tracey 1998). Por estos motivos es que es poco probable que el vanadilo se encuentre libre en medios biológicos.

1.3. El vanadio en la naturaleza

El vanadio puede ser también encontrado en tunicados, en peroxisomas de algas marinas, en nitrogenasas de azobacterias y en tejidos de mamíferos (Nielsen 1995). El vanadio puede entrar en la cadena alimentaria, debido a que en plantas se acumula fundamentalmente en raíces y semillas (Crans y Tracey 1998).

Las principales fuentes de exposición al vanadio en la población general las constituyen los gases provenientes de la combustión del petróleo y la ingesta de alimento (Mukherjee et al 2004). Una vez que ha ingresado al organismo, el vanadio(V) es rápidamente reducido a vanadilo(IV), el cual es transportado en plasma unido a albúmina y transferrina. Luego de su ingesta o inhalación, el vanadio se distribuye rápidamente. Inicialmente existe acumulación en pulmones, riñones, hígado y músculo, pero finalmente, el principal sitio de almacenamiento es el hueso (Upreti 1995). Sus mecanismos de excreción son urinarios, biliares y fecales. En particular, en orina, el vanadilo se halla complejado con ácido ascórbico (Kramer et al 1995; Mukherjee et al 2004). Las cantidades de vanadio en distintos tejidos corporales oscilan entre 3,5 y 10 ng / g de peso seco. El contenido total de este elemento en el cuerpo, luego de su incineración, es de 100 µg aproximadamente. En las células, el vanadio se distribuye en el núcleo y en las fracciones solubles del sobrenadante. En el citosol, el vanadilo se

halla unido a diferentes ligandos que contienen grupos fosfato, carboxilo o amino (Evangelou 2002).

1.3.1. Impacto de la deficiencia de vanadio en animales superiores

El vanadio es un elemento ultratraza, es decir, pertenece al grupo de metales para los cuales no se ha establecido claramente su importancia nutricional (Nielsen 1998). En general, se acepta que el vanadio es esencial para el normal desarrollo esquelético y el crecimiento de mamíferos, aunque en humanos no hay evidencias de signos de deficiencia. Se han realizado algunos estudios utilizando modelos murinos y caprinos, con el fin de demostrar esta hipótesis. En cabras alimentadas con dietas deficientes en vanadio, se ha observado que presentaban menor sobrevivencia que los controles, dolor en las extremidades y deformaciones esqueléticas así como también disminución en la producción de leche, disminución de los niveles de enzimas séricas y aumento de los niveles plasmáticos de glucosa. En ratas, se ha descrito que la privación del vanadio dietario causa un incremento en el peso de la tiroides, en la relación peso de tiroides / peso corporal, así como también una tendencia a disminuir el crecimiento. Se sabe también que el vanadio afecta el metabolismo de lípidos y de la glucosa. Sin embargo, se ha comprobado (utilizando métodos analíticos de alta sensibilidad) que las dietas “deprivadas”

de vanadio, contienen entre 0,5 y 2 μg vanadio / g de alimento (Nielsen 1995; Nielsen 1998; Mukherjee et al 2004). Por este motivo, la controversia sobre la esencialidad de este elemento continúa actualmente sin ser establecida inequívocamente.

1.4. Efectos biológicos

A fines del siglo XIX, aparece el primer estudio que muestra la efectividad de las sales de vanadio para el tratamiento de la Diabetes mellitus (Lyonnet y Martin 1899). Ya comenzado el siglo XX, el vanadio fue prescrito para una serie de tratamientos clínicos tales como anemia, tuberculosis y diabetes (Soler y Batlle 1947; Morinville et al 1998). Sin embargo, con el descubrimiento de la insulina y el desarrollo de fármacos sintéticos más potentes para el tratamiento de estas patologías, el vanadio cayó en desuso. No fue sino hasta las últimas décadas del siglo pasado que se renovó el interés en este elemento; particularmente, cuando se demostró que las soluciones de vanadio(V) producían efectos insulinomiméticos en modelos *in vitro* e *in vivo* (Morinville et al 1998).

A lo largo de las últimas décadas, diversos estudios *in vivo* e *in vitro* han mostrado que el vanadio posee acciones insulinomiméticas; efectos estimulatorios de la proliferación y diferenciación celular; efectos sobre el transporte de glucosa e iones a través de la membrana plasmática; interfiere con el movimiento del calcio ionizado intracelular;

modula diferentes enzimas y sistemas enzimáticos (Cortizo y Etcheverry 1995; Etcheverry y Cortizo 1998; Morinville et al 1998; Narla et al 2001a, 2001b; Shi et al 1999; Barrio et al 2003). Además se ha demostrado que el vanadio estimula la mineralización de huesos y dientes, y promueve la reparación ósea (Sakurai et al 1980, Shechter y Shisheva 1993). Diferentes complejos de vanadio (IV) y (V) estimulan la proliferación y la producción de colágeno en osteoblastos en cultivo (Barrio et al 2003). Se ha mostrado también que existen complejos de vanadio con capacidad antitumoral (Djorjevic 1995).

1.4.1. Toxicidad del vanadio y sus derivados

El vanadio es capaz de ejercer efectos tóxicos que dependen tanto de la especie, la dosis, la vía de administración y la duración del tratamiento como también de la naturaleza del compuesto. Se han realizado diversos estudios sobre su mecanismo de acción, los cuales indicarían que la generación de radicales libres mediada por vanadio, y la consiguiente generación de estrés oxidativo, podría jugar un rol en la toxicidad inducida por este elemento (Morinville 1998; Ye et al 1999a; Narla et al 2001c). Por ejemplo, puede modificar el estrés oxidativo en células animales tanto por generación de radicales libres, como en forma indirecta al liberar otros metales intracelulares que puedan generar a su vez radicales libres, o por modificación de las defensas antioxidantes endógenas y

enzimáticas (Evangelou 2002).

Debido a que es un elemento de transición, el vanadio posee varios estados de oxidación y por lo tanto es capaz de intervenir en reacciones que generan radicales libres (Evangelou 2002). La formación de radicales libres mediada por metales, específicamente por vanadio, es debida principalmente a la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y de nitrógeno (RNS). Las especies radicalarias reactivas incluyen un amplio rango de radicales de oxígeno, carbono, nitrógeno y azufre, originados de los radicales superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y radicales lipoperóxido (LOO^{\cdot}), pero también de quelatos de aminoácidos, péptidos, proteínas y otros ligandos complejados con metales tóxicos. Mecanismos comunes, involucrando la reacción de Fenton y Haber Weiss, la generación $O_2^{\cdot-}$ y radical oxhidrilo ($^{\cdot}OH$) parecen estar involucrados en la toxicidad inducida por metales tales como hierro, cromo y vanadio (Valko et al 2005).

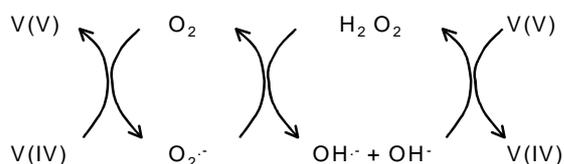
Intracelularmente, el vanadio se encuentra como vanadilo(IV), unido a fragmentos nucleares y citoplasmáticos. Sin embargo, una pequeña proporción, aproximadamente 1 %, puede hallarse en forma no unida. En un ambiente débilmente ácido, tal como las proximidades de la membrana plasmática, en presencia de vanadio(IV), (V), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y oxígeno molecular (O_2) puede existir la producción de radicales libres, principalmente

por la siguiente cadena de reacciones:



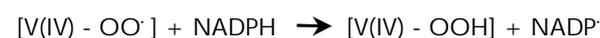
Los radicales hidroxilo generados, pueden conducir a la producción de mas radicales libres, por ejemplo superóxido que puede a su vez ser dismutado por la superóxido dismutasa (SOD) a H_2O_2 y O_2 . Además, el peróxido de hidrógeno puede reaccionar nuevamente con el VO^{++} y perpetuar la producción de $\cdot\text{OH}$ (Shi et al 1999; Ding et al 1999; Evangelou 2002).

In vivo el vanadio(IV) puede reaccionar con el O_2 para generar $\text{O}_2^{\cdot-}$ y vanadio(V). Ambas especies pueden luego participar de reacciones de tipo Fenton - Haber Weiss, tal como muestra la siguiente reacción :



En la cadena respiratoria se produce $\text{O}_2^{\cdot-}$ que puede conducir a la formación de

peroxovanadilo [$\text{V(IV)} - \text{OO}^\cdot$] e hidroperóxido de vanadilo [$\text{V(IV)} - \text{OH}^\cdot$]. Los peróxidos de vanadio también pueden ser formados por las siguientes reacciones mediadas por NADPH:



Estos peróxidos promueven la inhibición de fosfatasa de tirosinas, dando como resultado un incremento de proteínas fosforiladas en residuos de tirosina. La acumulación de estas proteínas fosforiladas inicia un "incendio" oxidativo con abundante producción de superóxido que luego cataliza la formación de peróxidos de vanadio, estableciendo un círculo vicioso (Ye et al 1999; Shi et al 1999; Ding et al 1999; Evangelou 2002; Valko et al 2005).

Existe amplia evidencia que señala que el vanadio y sus complejos son capaces de inducir estrés oxidativo. El vanadilo genera radicales libres que catalizan la lipoperoxidación de ácidos grasos e

| | | | | |
|-----|---|-------------------|---|--------------------|
| (1) | Lípido + $\text{R}^\cdot / \cdot\text{OH}$ | \longrightarrow | Lípido \cdot | Iniciación |
| (2) | Lípido + O_2 | \longrightarrow | Lípido - OO^\cdot | Propagación |
| | Lípido - OO^\cdot + Lípido | \longrightarrow | Lípido - OOH + Lípido \cdot | |
| (3) | Lípido \cdot + Lípido \cdot | \longrightarrow | Lípido - Lípido | Terminación |
| | Lípido - OO^\cdot + Lípido \cdot | \longrightarrow | Lípido - OO^\cdot - Lípido \cdot | |

Figura 1.2.- Etapas de la lipoperoxidación

hidroperóxidos de la membrana celular, generando además dienos conjugados (El Naggar et al 1998; Shi et al 1999; Ding et al 1999; Evangelou 2002; Valko 2005).

Distintos estudios muestran que los complejos de vanadio regulan el potencial redox celular, inducen peroxidación lipídica, regulan la fosforilación enzimática y ejercen múltiples efectos biológicos (Ye et al 1999a; Ding et al 1999; Shi et al 1999; Etcheverry et al 2000; Narla et al 2001a, 2001b, 2001c).

Por otro lado, los radicales hidroxilo generados durante el estrés oxidativo además de causar lipoperoxidación, pueden generar daño al DNA y modificación de proteínas intracelulares (Shi et al 1999).

1.4.2. Lipoperoxidación inducida por vanadio

La peroxidación lipídica es un proceso autocatalítico, que una vez iniciado concluye por procesos de terminación o depleción del sustrato. Los residuos poliinsaturados de ácidos grasos (PUFA) pertenecientes a los fosfolípidos de membrana son extremadamente sensibles a la oxidación. En

particular, los PUFA mitocondriales son blancos preferenciales para la peroxidación conducida por metales (Valko et al 2005).

El proceso completo de peroxidación lipídica consiste en tres etapas: iniciación, propagación y terminación (Fig 1.2). La etapa de iniciación involucra el ataque de ROS capaces de sustituir un átomo hidrógeno del grupo metileno del lípido. La presencia de un doble enlace adyacente al metileno, debilita el enlace entre el carbono y el hidrógeno, entonces este último puede ser removido más fácilmente de la molécula de ácido graso. Los lípidos saturados también pueden sufrir oxidación, sin embargo no van a generar reacciones en cadena. El proceso de sustracción de hidrógeno genera un ácido graso con un electrón desapareado (reacción 1 fig 1.2), que puede reaccionar con el oxígeno presente en el medio conduciendo a la formación de radicales lipoperóxido (ROO \cdot) durante la fase de propagación (reacción 2 fig 1.2). Estos mismos radicales son por sí mismos muy reactivos y, por lo tanto, poseen la capacidad de sustraer hidrógenos lábiles de moléculas vecinas de ácidos grasos,

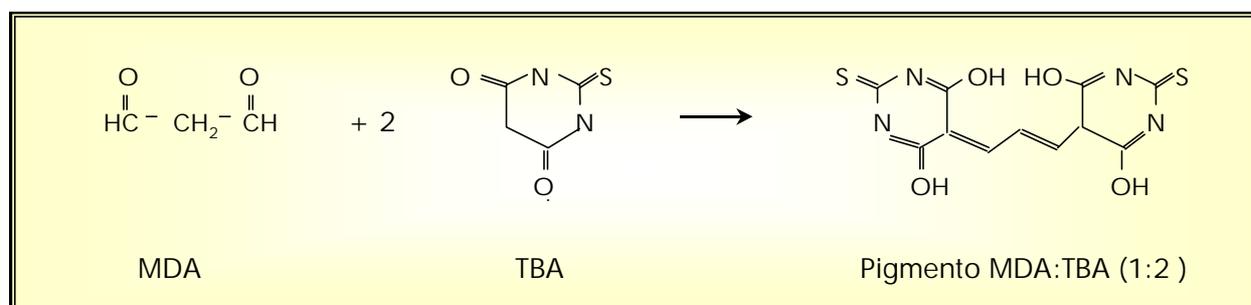


Figura 1.3.- Reacción de detección del producto de lipoperoxidación MDA.

generando hidroperóxidos lipídicos (RO - OH) de vida media relativamente corta y nuevos radicales lipídicos (reacción 3 fig 1.2). Los radicales lipoperóxido pueden reacomodarse, por reacciones de ciclización, a endoperóxidos para generar finalmente los productos finales de la lipoperoxidación, el malondialdehído (MDA) y 4 - hidroxinonenal (4 - HNE). Este último tiene marcados efectos en las vías de transducción de señales que finalmente afectan el fenotipo celular. Por otro lado, el MDA, que es altamente reactivo, puede interactuar con el DNA y generar aductos de dG, dA y dC (Valko et al 2005). El MDA generado en las reacciones de lipoperoxidación, puede determinarse por medio de la reacción con ácido tiobarbitúrico (TBA). A bajo pH y altas temperaturas, el MDA participa en la reacción de adición nucleofílica con TBA generando un aducto fluorescente

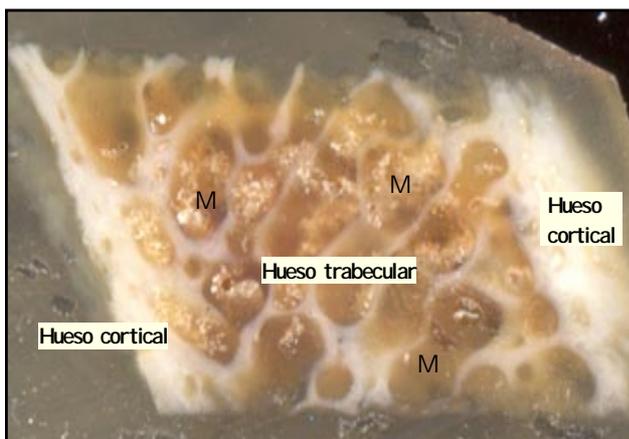


Figura 1.4. Corte transversal de hueso donde se observa la estructura trabecular y cortical. M: médula ósea (<http://depts.washington.edu/bonebio/ASBMRed>).

de coloración rosada, que puede ser determinado por espectroscopía UV - visible a 532nm o por espectroscopía de fluorescencia (Beuge y Aust 1978; Coudray et al 1995; Salahudeen et al 1995) (Fig 1.3).

El vanadio puede actuar tanto en la etapa de iniciación, por generar radicales que puedan iniciar la lipoperoxidación, como en la etapa de propagación (Valko et al 2005). Se ha encontrado que el vanadio y sus complejos son capaces de inducir lipoperoxidación de membranas celulares (Bay et al 1997).

1.5. Fisiología del tejido óseo y sus mecanismos regulatorios básicos

El hueso es un tejido dinámico que se halla en constante remodelación a lo largo de la vida (Ng et al 1997; Manolagas 2000; Harada y Rodan 2003). Este tejido posee alta organización, consistente de una fase mineral de hidroxapatita y cristales amorfos de fosfato de calcio contenidos en una matriz orgánica (Ng et al 1997). La integridad esquelética es mantenida por una estrecha homeostasis entre la resorción ósea y la formación de hueso (Evans 2002). Las funciones óseas incluyen la homeostasis del calcio, proveer de un soporte mecánico a los tejidos blandos, servir de anclaje a los músculos, participar en la hematopoyesis y servir de protección para el cerebro y la médula espinal (Harada y Rodan 2003). El tejido óseo consiste en células altamente especializadas, una matriz de tejido conectivo que puede hallarse

mineralizado o no mineralizado y espacios que incluyen cavidades para la médula ósea, canales vasculares, canalículos y lagunas (Manolagas 2000).

Durante el crecimiento, el esqueleto es formado mediante la remoción ósea en un sitio y la deposición de hueso en otro sitio diferente. Este proceso se llama *modelado óseo*. Una vez que el esqueleto ha alcanzado la madurez la regeneración ósea continua por el reemplazo periódico de hueso viejo por hueso nuevo en el mismo sitio. Este proceso se llama *remodelado*, y es el responsable de la completa regeneración del esqueleto adulto cada 10 años (Manolagas 2000).

Histológicamente se pueden distinguir dos tipos bien diferenciados de hueso (Fig. 1.4):

a.- *hueso trabecular*: encargado de darle fortaleza a las terminales de los huesos largos, que son los encargados de soportar el peso del cuerpo, y

b.- *hueso cortical*: que se encuentra en el exterior de los huesos largos confiriéndoles dureza.

Existen dos categorías de células óseas. En la primera se encuentran los *osteoclastos*, que son las células encargadas de la resorción ósea. En la otra categoría se encuentra la familia de los osteoblastos, constituida por los *osteoblastos*, cuya función es la formación de hueso; los *osteocitos*, insertados en el hueso, que se encargan de mantenerlo y finalmente las células que se encuentran en la superficie ósea (Manolagas y Jilka 1995; Evans 2002; <http://>

depts.washington.edu/bonebio/ASBMRed).

1.5.1. Reguladores locales de la homeostasis ósea

Existen diversos reguladores de las funciones óseas que son producidos localmente, ya sea en la médula ósea o por los propios osteoblastos, en respuesta a hormonas u otros factores. Entre los reguladores locales de la función osteoblástica, podemos mencionar:

a.- *Proteínas morfogénicas del hueso (BMP)*, que se producen en la médula ósea y se unen a sus propios receptores, presentes sólo en células mesenquimáticas pluripotentes (stem cells) dentro de la médula ósea. Las BMP activan la producción de Cbfa1 que induce transcripción génica conducente a la maduración osteoblástica.

b.- *Factores de crecimiento insulino -*

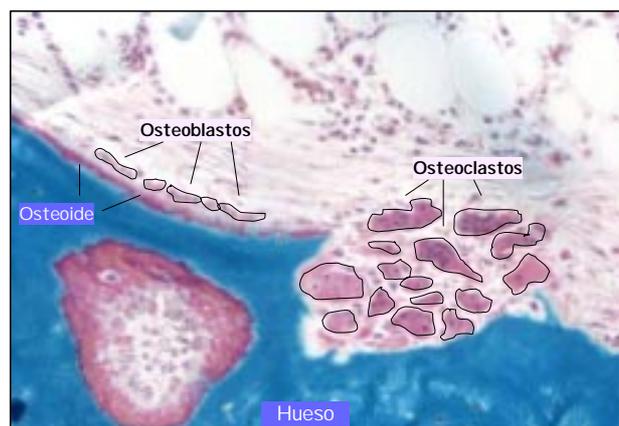


Figura 1.5. Histología de la unidad básica de remodelado. Se evidencia la presencia de osteoblastos, osteoclastos y osteoide (<http://depts.washington.edu/bonebio/ASBMRed>).

símiles (IGFs): son producidos por los osteoblastos en respuesta a varias hormonas con actividad ósea tales como hormona paratiroidea (PTH), estrógenos ó BMP. Estos factores se acumulan en la matriz ósea y son liberados por los osteoclastos durante la resorción ósea. Sus funciones son la estimulación de la proliferación y diferenciación de células óseas.

c.- *Citoquinas: interleuquina 1 y 6 (IL - 1, IL - 6) y factor de necrosis tumoral (TNF)*: son producidas por los osteoblastos en respuesta a hormonas sistémicas y otras citoquinas. La IL - 6 puede causar diferenciación de células pluripotentes mesenquimáticas a pre - osteoclastos; cambios en la proliferación y diferenciación e inhibición de la apoptosis de los osteoblastos.

d.- *RANKL*: es una citoquina presente en la superficie de células relacionadas al hueso. Le permite a las células responder a hormonas sistémicas (como la vitamina D) y a citoquinas (IL - 6). Cuando se producen contactos celulares entre células que expresan RANKL y células precursoras de osteoclastos, que expresan RANK, se induce el desarrollo osteoclástico (Manolagas 2000; Evans 2002; Harada y Rodan 2003).

1.5.2. Remodelado óseo a través de una unidad básica multicelular

En los adultos la masa ósea es mantenida localmente por un balance entre la resorción ósea y la formación de hueso (Harada y Rodan 2003). La resorción ósea es

llevada a cabo por los osteoclastos, células multinucleadas formadas por la fusión de progenitores mononucleares de la familia de los macrófagos / monocitos de origen hematopoyético (Teitelbaum 2000; Harada y Rodan 2003).

Los mecanismos de resorción y formación ósea se hallan acoplados localmente, a pesar de que la resorción ocurre mas rápidamente que la formación ósea (toma al menos 3 meses reconstruir el hueso resorbido en 2 - 3 semanas). En condicines fisiológicas existe un estrecho control de este proceso, llevado a cabo por diversos factores que conducen a un estado estacionario u homeostático entre estos fenómenos, tal que no existe pérdida neta de masa ósea (Ng 1997; Rodan y Martin 2000; Harada y Rodan 2003). Sin embargo, en diversas patologías, tales como la osteolisis asociada a neoplasias,

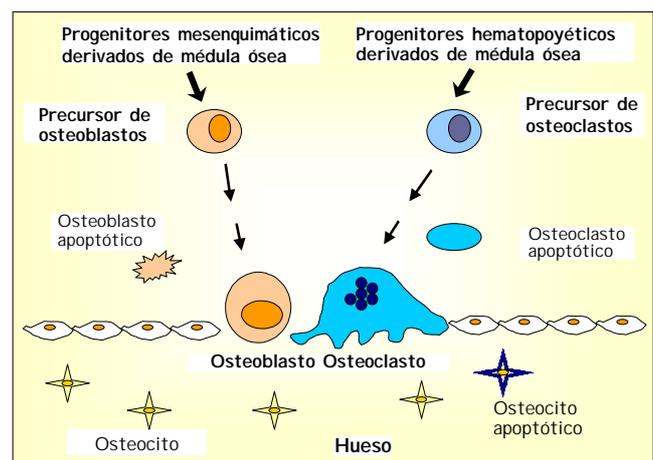


Figura 1.6. Formación de osteoblastos y osteoclastos a partir de células progenitoras alojadas en la médula ósea (Manolagas 2005).

la enfermedad de Paget, osteoporosis, etc., este balance se halla alterado resultando en una pérdida neta de masa ósea (Hamdy 1993; Manolagas y Jilka 1995; Rodan y Martin 2000). Como consecuencia de estas patologías existe dolor óseo, fracturas patológicas, etc. aumentando así la morbilidad sufrida por el paciente (Hamdy 1993; Rodan y Martin 2000).

En el esqueleto adulto sano, los osteoblastos y los osteoclastos pertenecen a una estructura temporaria única, conocida como unidad básica multicelular (BMU) (Fig. 1.5).

Durante los procesos de resorción / formación ósea, existe una coordinación espacio - temporal de la actividad de osteoclastos y osteoblastos; aunque la coordinación y reglas a las que se hallan sujetas las distintas BMU son diferentes si se trata del modelado óseo o del remodelado. Cada BMU se origina en un tiempo y lugar determinado, y avanza hacia su blanco, que es una región del hueso que necesita ser reemplazada, continuando su actividad durante una distancia variable desde el blanco (progresión) y, eventualmente arrestándose (terminación). Durante todo este proceso, los integrantes de una BMU mantienen una relación temporal perfectamente acoplada unos con otros. Los osteoclastos se adhieren al hueso y subsecuentemente causan su remoción por acidificación y digestión proteolítica. A medida que la BMU avanza, los osteoclastos abandonan los sitios de resorción y los osteoblastos se mueven hacia allí, para

cubrir el área excavada, comenzando el proceso de formación ósea por secreción del osteoide que es luego mineralizado para formar hueso nuevo (Ng et al 1997; Teitelbaum 2000; Manolagas 2000; Manolagas y Jilka 2004).

1.5.3. Osteoblastogénesis y Osteoclastogénesis

Tanto los osteoblastos como los osteoclastos derivan de precursores originados en la médula ósea. Los precursores de los osteoblastos son células germinales mesénquimáticas pluripotentes y los precursores de los osteoclastos son células hematopoyéticas del linaje de monocitos / macrófagos (Manolagas 2000) (Fig. 1.6). Se ha demostrado que los macrófagos causan efectos deletéreos sobre el metabolismo de osteoblastos en cultivo. Por otro lado, se sabe que existe alguna relación entre los macrófagos y los osteoclastos; sin embargo, la naturaleza exacta de su interacción no ha sido completamente elucidada (Evans 2002).

El desarrollo y diferenciación de osteoblastos y osteoclastos está controlado por factores de crecimiento, hormonas y citoquinas producidas en el microambiente óseo, así como también por moléculas de adhesión que median las interacciones de células entre sí y con la matriz extracelular (Manolagas 2000; Mackie 2003). Los osteoblastos poseen un rol central en la creación y posterior mantención de la arquitectura esquelética. Estas funciones las llevan a cabo por deposición de la matriz y a

través de la regulación de la diferenciación y actividad de los osteoclastos. Indirectamente, debido a su actividad reguladora de los osteoclastos, los osteoblastos participan en la homeostasis cálcica (Mackie 2003).

Los osteoblastos totalmente diferenciados producen y secretan proteínas que constituyen la matriz ósea, la cual es mineralizada a continuación, por deposición de hidroxapatita. Entre las principales proteínas secretadas por los osteoblastos se encuentran el colágeno tipo I, osteonectina y glicosaminoglicanos (biglicano y decorina). También existe secreción de proteínas minoritarias que son, sin embargo, importantes factores de adhesión que interaccionan con las integrinas. Entre estas proteínas podemos mencionar osteopontina, sialoproteína ósea, fibronectina, vitronectina y trombospondina (Manolagas 2000; Mackie 2003).

Los osteoclastos, células multinucleadas de gran tamaño, poseen abundantes mitocondrias, lisosomas y ribosomas libres. Entre sus características morfológicas se destacan también el borde en cepillo, un complejo sistema de protrusiones de membrana con forma de dedo cuya función es mediar la resorción de la matriz calcificada, y otra estructura especializada llamada la zona clara, que sella la zona próxima a ser resorbida, creando así el microambiente necesario para el funcionamiento del sistema de resorción. Los componentes de la matriz mineralizada son disueltos en un ambiente ácido, generado por una H^+ - ATPasa que

se encuentra en el borde en cepillo del osteoclasto, y por acción de las proteasas secretadas. Finalmente, los componentes de la matriz degradada son endocitados y transportados hacia la zona de la membrana osteoclástica opuesta al hueso (Manolagas 2000).

El hueso maduro se halla en continua remodelación. El hueso viejo es resorbido y reemplazado por hueso nuevo; este proceso es llevado a cabo por un equipo de osteoblastos y osteoclastos. Tanto los osteoblastos como los osteoclastos tienen un período de vida definido, luego del cual mueren por apoptosis (Manolagas 2000). El proceso de suicidio celular o apoptosis, es un proceso iniciado y continuado en forma ordenada. Existen genes que regulan cuidadosamente este proceso fisiológico; sin embargo, existen diversos agentes que pueden estimular o inhibir la apoptosis de los distintos tipos celulares presentes en el hueso, constituyendo así herramientas útiles para el tratamiento de las patologías óseas (<http://depts.washington.edu/bonebio/ASBMRed>; Chen y Shi 2002).

Los procesos apoptóticos pueden ser divididos en dos categorías: muerte celular mediada por receptores (vía extrínseca) y muerte mediada por la mitocondria (vía intrínseca); sin embargo, se sabe que existen entrecruzamientos entre estas dos vías. Bajo condiciones normales, la mitocondria podría ser la principal fuente para la generación basal y homeostática de ROS, por medio de la

cadena de transporte de electrones. Paradójicamente, esta organela es muy vulnerable a los efectos adversos de la generación excesiva de ROS. La generación excesiva de ROS, que no podría ser neutralizada por los recursos limitados de la capacidad reductora de la mitocondria y el citosol, no sólo aumenta la permeabilidad de la membrana mitocondrial, sino que también difunde dentro de la matriz mitocondrial para dañar la cadena respiratoria y consecuentemente amplificar aún más la generación de ROS, debido a la deficiente transferencia de electrones al oxígeno. Así, las membranas mitocondriales sufren un aumento en la permeabilidad que permite la liberación de varios promotores de la apoptosis (Chen y Shi 2002). De este modo, y teniendo en cuenta que el vanadio causa un incremento en la producción intracelular de radicales libres, la apoptosis mediada por la mitocondria podría ser la más importante y relevante en la muerte celular inducida por este metal.

1.6. Cáncer

El cáncer es una enfermedad de las células caracterizada por un cambio en los mecanismos de control que gobiernan la proliferación y diferenciación celular (Salmon y Sartorelli 1991). Fundamentalmente, el cáncer es una enfermedad en donde la proliferación resulta anormalmente excesiva. En contraste con las células normales, las células tumorales continúan proliferando aún

en ausencia de señales proliferativas. Sin embargo, no necesariamente van a proliferar a mayor velocidad que las células normales (Kufe et al 2003). Al parecer, en las células neoplásicas, existen funciones que podrían estar desreguladas:

a.- los mecanismos regulatorios de la proliferación son inefectivos;

b.- el programa de diferenciación celular puede estar distorsionado. Las células tumorales pueden bloquearse en un estadio particular de diferenciación, o pueden diferenciarse a un estadio inapropiado o a un tipo celular anormal.

c.- La organización cromosómica o genética puede hallarse desestabilizada, de forma tal que conduzca a la generación de células mutantes con alta frecuencia. Entre las alteraciones pueden encontrarse aquellas que modifiquen la capacidad de migración celular o la producción de enzimas proteolíticas que permitan invasión y metástasis.

d.- El programa de muerte celular (apoptosis) que usualmente se encuentra bajo estricto control y que permite la eliminación de células viejas o con alteraciones génicas, se halla inoperante en las células cancerígenas (Kufe et al 2003).

Los macrófagos tienen dos mecanismos principales para destruir células malignas. El primero de ellos está mediado por actividad proteolítica al activar células T citotóxicas. El segundo mecanismo depende de la generación extracelular de especies reactivas de nitrógeno y oxígeno. Algunas drogas,

aumentan la citotoxicidad inducida por macrófagos al estimular la producción de ROS y NOS (Matés et al 2000).

Las células que han sufrido transformaciones neoplásicas generalmente expresan antígenos de superficie que, al parecer, son del tipo fetal normal y aparentemente, también poseen otros signos de aparente "inmadurez" que pueden presentarse como anormalidades cuali y cuantitativas, incluyendo distintas translocaciones y secuencias amplificadas de genes. De este modo, las células tumorales escapan a los controles que ejerce el sistema inmunitario para eliminar células aberrantes. Las células cancerígenas proliferan en forma excesiva y forman tumores locales que pueden comprimir o invadir estructuras adyacentes (Salmon y Sartorelli 1991).

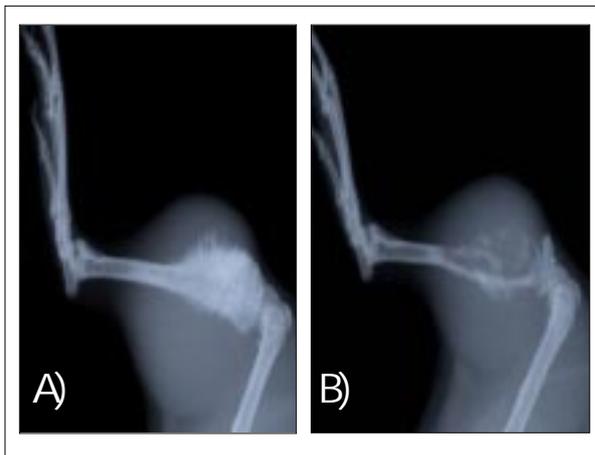


Figura 1.6.- Metástasis óseas: A) osteoblástica: se observa la excesiva deposición de hueso; B) osteolítica: se observa pérdida de la masa ósea, así como también gran actividad resortiva (<http://depts.washington.edu/bonebio/ASBMRRed>).

En el mundo occidental, la muerte por cáncer ocupa el segundo lugar de frecuencia, luego de las enfermedades cardiovasculares, en las causas de muerte de la población general. La frecuencia, distribución geográfica y comportamiento de distintos tipos específicos de cánceres, están relacionados con múltiples factores que incluyen sexo, edad, raza, predisposición génica y exposición a carcinógenos ambientales; siendo considerado este último el factor más importante (Salmon y Sartorelli 1991). En nuestro país, la tasa bruta de mortalidad por tumores es de 150,99 por cada 100.000 habitantes, según lo informan las estadísticas de Ministerio de Salud de la Nación (<http://www.deis.gov.ar/publicaciones/archivos/Boletines.pdf>). La mortalidad por tumores ocupa el segundo lugar entre las causas de mortalidad.

Los tumores son formaciones independientes que se comportan en forma extraña al organismo y viven a expensas del huésped, tomando sustancias nutritivas de él. Es decir, que su característica principal es el carácter autónomo del crecimiento (Litter 1986b).

Los cánceres o tumores malignos se caracterizan por poseer:

- a) crecimiento acelerado, con infiltración y destrucción de tejido.
- b) producción de metástasis.
- c) recidiva luego de la extirpación.
- d) evolución maligna que causa la muerte del paciente (Litter 1986b).

Al comienzo, las células cancerosas crecen en forma exponencial o logarítmica, pero a medida que aumenta la masa tumoral, el tiempo de duplicación del número de células (aumento del volumen tumoral) se prolonga, lo que se debe a la disminución de la fracción de crecimiento y aumento de la pérdida celular por envejecimiento y muerte (Litter 1986b).

En todo tumor maligno existen tres compartimientos celulares:

- a) células en estado de multiplicación;
- b) células en reposo, pero capaces de entrar en el ciclo celular (quiescentes);
- c) células en el período final, que han dejado definitivamente el ciclo celular y están destinadas a morir (arrestadas) (Litter 1986b).

Dentro del tumor, existe una pequeña

población de células que pueden describirse como “células madre tumorales”. Éstas conservan la capacidad de sufrir repetidos ciclos de proliferación y también de emigrar hacia sitios distantes en el cuerpo para colonizar órganos, en el proceso denominado metástasis. De este modo, las células neoplásicas tienen la capacidad de ser clonógenas, o sea formadoras de colonias. Los fenómenos invasivos y metastásicos, así como una serie de anormalidades metabólicas que son consecuencia del cáncer, producen la enfermedad y finalmente la muerte del paciente, a menos que el neoplasma pueda ser erradicado con el tratamiento (Salmon y Sartorelli 1991).

1.6.1. Teoría del «suelo y la semilla»

A fines del siglo XIX, Paget propuso la teoría del “suelo y la semilla”, luego de realizar autopsias y estudiar 735 mujeres que habían fallecido de cáncer de mama. Esta teoría postula que las células cancerígenas circulantes (semilla) pueden producir metástasis sólo en aquellos órganos donde el microambiente (suelo) sea ventajoso para el crecimiento. Mas específicamente, la habilidad de las células para sobrevivir, expandirse clonalmente y generar angiogénesis son las propiedades que permiten a las células tumorales generar metástasis en sitios distintos a su lugar de origen. Esta teoría, ampliamente aceptada en la actualidad, es el principio básico en el campo de las metástasis neoplásicas y es

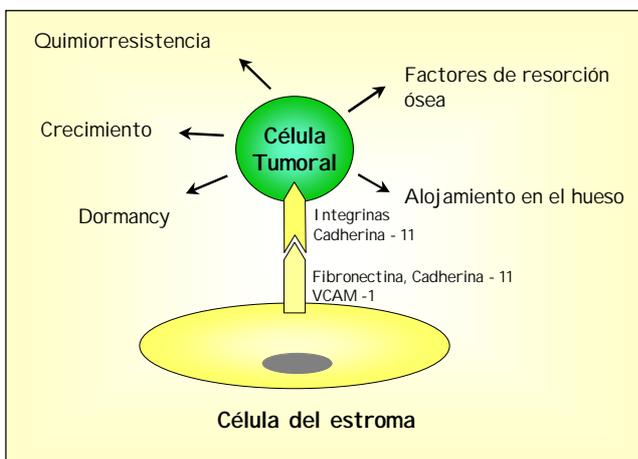


Figura 1.7.- Interacciones entre la célula del estroma de la médula ósea y la célula tumoral. Los contactos entre células neoplásicas y estromales, a través de diferentes moléculas de adhesión, favorecen la colonización por células tumorales, la producción de factores de resorción ósea, la quimiorresistencia y el *dormancy* en hueso (Yoneda, 2003).

particularmente relevante en las metástasis óseas (Roodman 2004; Yoneda e Hiraga 2005; Yin et al 2005).

Las metástasis son formaciones secundarias, a distancia del tumor primitivo. Se pueden producir por transmisión a través de la sangre, el líquido linfático o por implantación (Litter 1986).

1.6.2. Mecanismos de las metástasis óseas

Las metástasis óseas son complicaciones comunes en pacientes con cánceres avanzados. Su presencia genera habitualmente morbilidad seria y pronóstico grave (Yin et al 2005). A pesar de que el mecanismo molecular subyacente a las metástasis óseas preferenciales no ha sido

puesto aún en evidencia, pareciera que el hueso provee el microambiente que le permite a las células tumorales circulantes arrestarse, sobrevivir y colonizar preferentemente este tejido (Yin et al 2005; Yoneda e Hiraga 2005). Basados en la alteración de los procesos óseos, las metástasis en hueso se clasifican en *osteolíticas*, *osteoblásticas* y *mixtas*. En las del primer tipo, las células del tumor invaden la médula ósea y posteriormente activan los osteoclastos. De este modo, la resorción ósea está mediada por los osteoclastos y no por las células tumorales, dando como resultado una disminución de la masa ósea. Las metástasis osteoblásticas se caracterizan por una formación anormal de hueso, debido a una exacerbación de la actividad osteoblástica (Roodman 2004) (Fig. 1.7)

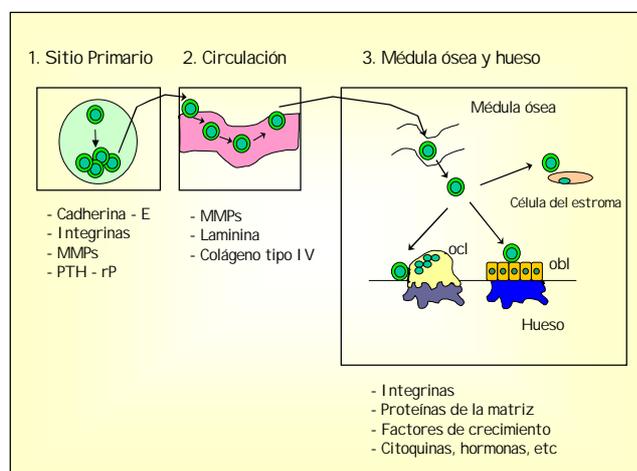


Figura 1.8.- Moléculas involucradas en las metástasis óseas. Para producir metástasis óseas, las células neoplásicas deben recorrer tres ambientes que incluyen el sitio primario del tumor, la circulación y la médula ósea. En cada ambiente las moléculas descritas afectan el comportamiento metastásico de las células tumorales (Yoneda, 2003).

Microambiente óseo: existe amplia evidencia que sugiere que los osteoclastos, más que las células tumorales son los encargados de la resorción ósea en la patofisiología de las metástasis óseas, siendo ésta una característica distintiva de la enfermedad. Así, la formación y activación de osteoclastos conjuntamente con la colonización por células neoplásicas, son factores críticos para el establecimiento de las metástasis óseas (Roodman 2004; Yoneda e Hiraga 2005; Yin et al 2005).

Las matrices óseas son ricas en depósitos de factores de crecimiento y citoquinas que serían liberados por la actividad continua de los osteoclastos en la matriz mineralizada. Las citoquinas pueden estimular

la producción de diferentes sistemas hormonales, que bien pueden estimular la resorción ósea o la proliferación celular. Los factores de crecimiento estimularían la proliferación y quimotaxia, así como también actuarían inhibiendo la apoptosis de las células cancerígenas que han invadido el hueso, conduciendo por lo tanto al establecimiento de las metástasis (Roodman 2004; Yoneda e Hiraga 2005).

Las células mesenquimáticas progenitoras de la médula ósea dan lugar a las células del estroma. Estas células estromales, son las que alojan células hematopoyéticas, estimulando su proliferación, diferenciación y supervivencia, así como también a las células tumorales que migran hacia la médula. De esta manera, las células del estroma son las que favorecen la colonización de la médula ósea por células tumorales y le confieren, además, resistencia a los tratamientos quimioterápicos (Fig. 1.8) (Roodman 2004; Yoneda e Hiraga 2005).

La resorción ósea mediada por los osteoclastos crea un microambiente a través de la liberación de los factores de crecimiento almacenados en la matriz del hueso, así como también por liberación de calcio y fosfato. Además, por acción de los factores y minerales liberados, las células neoplásicas producen citoquinas que estimulan los osteoclastos, así como también PTH - rP y prostaglandina E₂ incrementando la resorción, con la participación de las células osteoblásticas y estromales que producen

RANKL. Este microambiente, establece un círculo vicioso que involucra células tumorales, osteoblastos y osteoclastos que conduce al desarrollo y progresión de las metástasis óseas (Yoneda e Hiraga 2005) (Fig 1.8).

El proceso de metástasis ósea consiste básicamente de tres pasos:

- 1.- Proliferación e invasión de las células tumorales en el sitio primario,
- 2.- Intravasación, migración en la circulación y posterior extravasación, y
- 3.- Arresto de las células neoplásicas en la médula ósea, salida desde el sinusoide, adhesión a la superficie ósea, destrucción osteoclástica y colonización de las células tumorales en hueso (Yoneda e Hiraga 2005) (Fig 1.8).

1.6.3. Tratamiento antineoplásico

El tratamiento antineoplásico ideal debería cumplir con los siguientes requisitos:

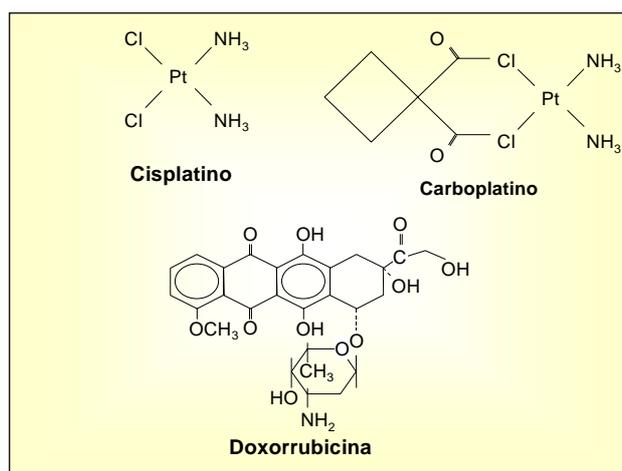


Figura 1.9.- Estructuras químicas de los principales agentes antineoplásicos utilizados para el tratamiento de los osteosarcomas y las metástasis óseas.

a.- disminuir la tasa de crecimiento (efecto antiproliferativo);

b.- poseer acciones citotóxicas o citostáticas, por efectos apoptóticos o necróticos;

c.- disminuir o inhibir el potencial metastásico de las células neoplásicas;

d.- baja o nula capacidad de generar resistencia celular (Evangelou 2002).

Con la denominación de "agentes quimioterápicos antineoplásicos", se comprende a las drogas capaces de dañar las células malignas respetando relativamente al organismo. Los medicamentos anticancerosos ideales serían los que eliminen células cancerosas sin lesionar los tejidos normales (Litter 1986). Sin embargo, las drogas actualmente empleadas en quimioterapia antineoplásica son relativamente inespecíficas y causan toxicidad de células normales (Salmon y Sartorelli 1991).

Idealmente, la farmacoterapia antineoplásica debería eliminar todas las células tumorales con el fin de evitar recidivas. (Litter 1986). Los tratamientos antineoplásicos actuales se basan en la *Hipótesis de la muerte logarítmica*, que predice que una dosis dada de una droga antineoplásica exterminará un porcentaje constante de células malignas sin relación con el número existente de células. Sin embargo, los métodos actuales de detección de tumores no poseen sensibilidad suficiente como para detectar números de células menores a 10^9 . Por este motivo, el paciente es sometido a ciclos repetidos de

tratamiento con el fin de tener una probabilidad logarítmica de erradicación de todas las células tumorales (Litter 1986).

En la actualidad, los tratamientos coadyuvantes con fármacos antineoplásicos son ampliamente utilizados como complemento a los métodos locales de tratamiento, tales como cirugía o radioterapia, aunque la naturaleza del tratamiento oncológico y sus métodos fundamentales cambian constantemente. El osteosarcoma, ya sea primario o como consecuencia de metástasis óseas, se trata habitualmente con análogos del ácido fólico (metotrexato), antibióticos antraciclínicos (doxorrubicina), análogos del pirofosfato (bifosfonatos) y complejos de platino (cisplatino y, en menor medida, carboplatino) (fig 1.9) (Hamdy 1993; Goodman et al 1996). Tanto el metotrexato como la doxorrubicina y los complejos de platino interfieren con las funciones normales del DNA y del RNA (Goodman et al 1996); mientras que el mecanismo de acción de los bifosfonatos parecería estar relacionado con la inhibición de la actividad de los osteoclastos (Hamdy 1993).

1.6.4. Efectos antitumorales del vanadio

El vanadio administrado en dosis adecuadas es capaz de ejercer acciones antitumorales (Evangelou et al 1997). Este elemento y sus derivados han presentado marcados efectos anticarcinogénicos tanto en tumores inducidos experimentalmente o implantados en modelos animales, como así

también en cultivos de células tumorales (Jackson et al 1997; El - Naggar et al 1998; Narla et al 2000; Mukerjee et al 2004).

Se ha demostrado que diversos complejos de vanadio causan citotoxicidad en modelos neoplásicos in vitro (Jackson et al 1997; Narla et al 2000; Cortizo et al 2001; Narla et al 2001a, 2001b, 2001c). Evangelou y su grupo demostraron que un complejo de vanadio administrado oralmente, producía efectos beneficiosos sobre ratas a las que se les había implantado un tumor. Este estudio muestra que en las ratas tratadas con vanadio aumentaba el tiempo de supervivencia, induciendo remisión completa y retardando la tasa de crecimiento del tumor (Evangelou et al 1997). En concordancia, otros grupos también observaron efectos similares al administrar intraperitonealmente complejos de vanadio en

modelos tumorales animales (Jackson et al 1997; El - Naggar et al 1998; Liasko et al 1998; Gosh et al 2000).

Este efecto citotóxico parece correlacionar con la inducción de apoptosis que podría estar relacionada al incremento generado en la producción de radicales libres; así como también por interacción con el DNA, que conduce al arresto del ciclo celular (Thompson et al 1984; Djordjevic 1995; El - Naggar et al 1998; Aubrecht et al 1999; Evangelou 2002). Sin embargo, los mecanismos subyacentes en la acción antitumoral de los complejos de vanadio permanecen sin clarificarse completamente. Además de los mencionados anteriormente, alguno de los siguientes mecanismos estarían probablemente relacionados con su actividad antineoplásica: el vanadio, dependiendo de

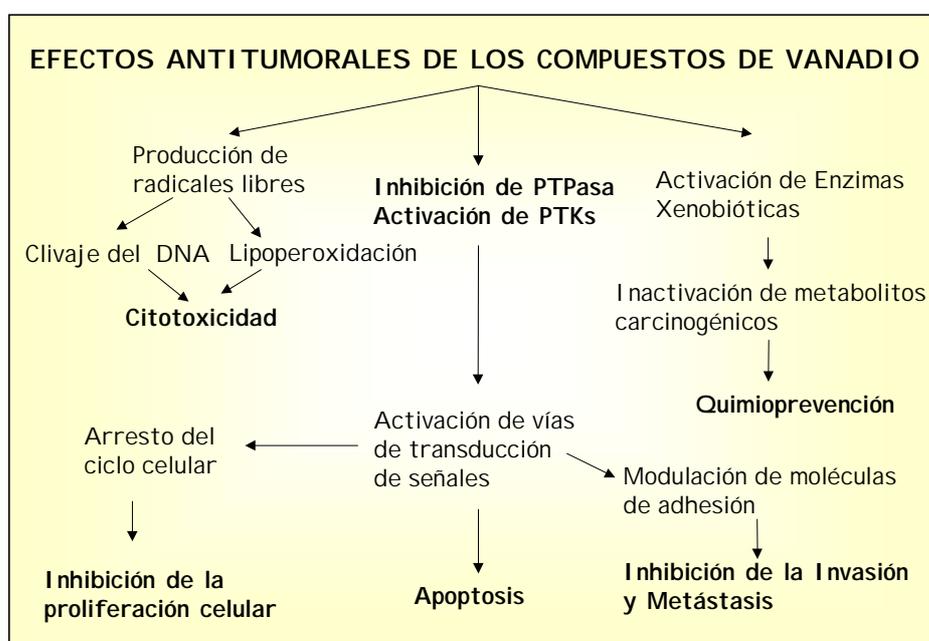


Figura 1.10.- Representación esquemática de los mecanismos por los cuales el vanadio ejerce sus acciones antitumorales (Evangelou 2002).

la concentración, puede estimular o inhibir la síntesis de DNA; puede inhibir la DNA polimerasa, la nucleotidil transferasa, así como también la fosforilasa (Liasko et al 1998). El vanadio(IV) y (V) puede inducir clivaje del DNA, probablemente por medio de la producción de ROS, especialmente $\cdot\text{OH}$ (Sakurai 1994). En la figura 1.10 se muestran esquemáticamente los mecanismos por los cuales el vanadio ejercería sus acciones antitumorales.

Se ha señalado que el vanadilo(IV) juega un papel fundamental en la actividad antitumoral de sus complejos y que esa actividad citotóxica estaría influenciada por la estructura de los complejos formados, poniendo en evidencia que la potencia citotóxica de los complejos depende del centro activo de vanadilo así como también de la estructura de los complejos (Narla et al 2000; Gosh et al 2000).

Las proteínas de adhesión, ya sea que provean adhesión entre células o con la matriz extracelular, están involucradas en los procesos de metástasis e invasión tumoral (Alonso et al 1996; Evangelou 2002; Yoneda e Hiraga 2005). La fosforilación de restos tirosinas de las proteínas inducida por vanadio, podría influenciar el potencial metastásico e invasivo de las células tumorales, ya que regularía las adhesiones entre células así como también las adhesiones al sustrato (matriz extracelular) e induciría cambios en el citoesqueleto de actina (Matsuyoshi 1992; Takenaga 1996; Cortizo y Kreda 2000; Evangelou 2002).

Por otro lado, se sabe que las células cancerígenas poseen propiedades diferentes de las células normales. Por ejemplo, poseen menor pH intracelular, niveles de enzimas antioxidantes alterados y, en consecuencia una producción continua de peróxido de hidrógeno; su estado redox también es diferente y poseen mayor contenido de agua (Evangelou 2002). Tal vez sea el menor pH intracelular, la propiedad que le permite a las células tumorales captar mayores cantidades de vanadio (Djordjevic 1995; Evangelou et al 1997). Esta característica confiere cierta especificidad en la terapéutica antineoplásica del vanadio, ya que resulta esperable que los compuestos de vanadio posean mayor citotoxicidad en células tumorales que en las normales.

2. Hipótesis y Objetivos

2.1. Definición del problema

El cáncer es una enfermedad de alta prevalencia en el mundo, ocupando los primeros lugares entre las causas de muerte (Salmon y Sartorelli 1991; <http://www.deis.gov.ar/publicaciones/archivos/Boletín.pdf>). En particular, las metástasis óseas de algunos tipos de cánceres, tales como el cáncer de mama, próstata o pulmón, agravan la morbilidad y el pronóstico de la enfermedad (Yin et al 2005; Yoneda e Hiraga 2005).

Si bien se cuenta con tratamientos de eficacia comprobada, tales como el uso de cisplatino, metotrexato o bifosfonatos, todos estos compuestos poseen severos efectos secundarios. Por otro lado, una complicación frecuente de los tratamientos es la resistencia a los mismos que generan las células tumorales (Litter 1986b; Salmon y Sartorelli 1991; Goodman et al 1996). Por tal motivo, aún continúa la búsqueda de compuestos para el tratamiento de esta enfermedad que presenten ventajas terapéuticas. Los complejos de vanadio constituyen una nueva clase de agentes terapéuticos (Evangelou 2002); pero para establecer su utilidad clínica, aún hace falta más investigación básica y clínica. Así, la farmacología experimental es indispensable como base para la aplicación eventual de nuevas drogas (Salmon y Sartorelli 1991).

2.2. Datos previos que soportan la hipótesis

Estudios previos realizados en nuestro laboratorio han mostrado que algunos complejos orgánicos de vanadio poseen actividad citotóxica sobre cultivos de células de osteosarcoma (Sálice et al 1999; Etcheverry et al 2000; Etcheverry et al 2002). Diferentes estudios sugieren que los efectos tóxicos del vanadio y sus derivados serían causados por un incremento sostenido en la producción de radicales libres, con el consecuente daño al DNA, las membranas celulares y otras estructuras celulares (sistemas enzimáticos, proteínas estructurales, etc) (Evangelou et al 1997; Ye et al 1999; Shi et al 1999; Ding et al 1999; Huang et al 2000; Cortizo y Kreda 2000).

Hipótesis

La hipótesis que se pretende demostrar en este trabajo es que los complejos de vanadio ejercerían acción antitumoral por medio de mecanismos que regulan la adhesión, migración y proliferación de células neoplásicas, como así también regulando la actividad de macrófagos. Los mecanismos de acción podrían involucrar efectos proapoptóticos mediados por la mitocondria y / o la generación de estrés oxidativo a través de la producción de ROS y especies reactivas de nitrógeno (RNS).

2.3. Objetivos

1.- Sintetizar, caracterizar y estudiar la

estabilidad de complejos de vanadio en solución y en estado sólido.

2.- Analizar la potencia citotóxica de los complejos de vanadio sobre cultivos de células óseas.

3.- Evaluar la generación de ROS y RNSy su eventual relación con los procesos apoptóticos así como también con la potencia citotóxica.

4.- Analizar los efectos de los complejos de vanadio sobre los procesos metastásicos (adhesión, invasión y clonogenicidad).

5.- Estudiar el efecto de los complejos sobre la activación de células macrofágicas en cultivo.

2.4. Modelo celular de estudio

Para demostrar nuestra hipótesis hemos usado tres modelos de estudio relacionados a células óseas: osteoblastos MC3T3E1, células de osteosarcoma murino UMR106 y monocitos / macrófagos RAW264.7.

La línea celular clonal MC3T3E1 es un modelo de cultivo celular bien definido que retiene competencia para análogos de diferenciación de cultivos primarios de osteoblastos derivados de calvaria de ratón. (Fratzl - Zelman et al 1997). Son células no transformadas que pueden pasar por tres estadios definidos, cuando son sometidas a las condiciones adecuadas de cultivo:

- *proliferación*: ocurre hasta el tercer día de cultivo en medio de cultivo suplementado con 10 % de suero fetal bovino;

- *diferenciación*: dentro de los 15 primeros días de cultivo las células comienzan a diferenciarse a osteoblastos, expresando distintos marcadores de diferenciación y secretando matriz extracelular.

- *mineralización*: en esta etapa, las células mineralizan la matriz secretada en la etapa anterior, depositando calcio y fosfato. La mineralización ocurre hasta el día 25 de cultivo in vitro. Luego de este período, las células entran en apoptosis y mueren.

Las células MC3T3E1 pueden expresar distintos marcadores de diferenciación tales como fosfatasa alcalina, osteoprotegerina y osteocalcina. Además, producen y secretan colágeno tipo I (Sudo et al 1983; Quarles et al 1992). Se ha descrito que en cultivos a largo plazo de estas células, existen formaciones llamadas nódulos, que son considerados sitios de calcificación. Estos nódulos están caracterizados por la acumulación de matriz colagenosa que subsecuentemente puede ser mineralizada (Fratz - Zelman et al 1997; Suzuki et al 2002). Esta línea celular resulta por lo tanto un buen modelo para el estudio de los fenómenos naturales que ocurren durante el desarrollo óseo.

La línea celular UMR106 es una línea celular clonal osteoblástica derivada de un osteosarcoma de rata (Chak et al 1995). Esta línea celular expresa varios marcadores osteoblásticos, entre ellos FAL y síntesis de colágeno tipo I (Partridge et al 1983).

Las células derivadas de macrófagos de ratón, RAW264.7, fueron establecidas a partir

de ascitos de un tumor inducido en ratones machos por la inyección intraperitoneal del virus de leucemia Abselon (A - MuL - V). Estas células expresan distintos tipos de marcadores de activación, tales como síntesis de interleuquinas, formación de vesículas de fagocitosis, expresión de NF-KB, expresión de sintasas de óxido nítrico (NOS) y producción de óxido nítrico (NO) (Chen et al 1999). Por este motivo, resultan útiles para el estudio de acciones citotóxicas normales de las células de linaje monocito / macrófago.

3. Materiales y Métodos

3.1.- Métodos Generales

a.- Síntesis de los compuestos de vanadio

[VO(Aspirina)ClH₂O]₂:

En el complejo $[VO(Aspirina)ClH_2O]_2$, la coordinación entre aspirina y el catión vanadilo tiene lugar a través de grupos carboxilato desprotonados que se comportan como puentes ligando bidentados. En la estructura sugerida por los autores, el átomo de vanadio presenta una esfera de coordinación de tipo pirámide cuadrada (Etcheverry et al 2000; Etcheverry et al 2002).

El complejo vanadilo(IV) - aspirina, VOAspi, se sintetizó mezclando aspirina y $VOCl_2$ (50% solución acuosa) en una relación molar 2:1. La aspirina se disolvió en etanol 96° bajo atmósfera de N_2 y se agregó gota a gota la solución de $VOCl_2$ (pH = 3,5; 0°C). Se formó una sustancia aceitosa de color verdoso que produce un sólido verde cuando se lo lava exhaustivamente con $H_2O(d)$. Este sólido se filtró y secó inmediatamente en estufa a 60 °C, para evitar la descomposición. El compuesto obtenido se identificó por espectroscopía infrarroja (IR). Se almacenó a temperatura ambiente en frascos protegidos de la luz y humedad (Etcheverry et al 2002).

Para los estudios descriptos en este trabajo, se prepararon diariamente soluciones stock de trabajo (100 mM), pesando una cantidad adecuada del complejo y disolviéndola en una mezcla etanol 96° - agua (1 : 1). Las diluciones se realizaron en medio de cultivo con el fin de minimizar las cantidades de alcohol agregadas a los ensayos celulares.

Na₃[VO(Glucosa)₂OH].5H₂O

En este complejo, la coordinación del vanadilo con el azúcar depende fuertemente del pH al cual se realiza la síntesis. Debido a que el ligando libre es el α - anómero de la forma piranosa de la glucosa, los autores sugieren que el catión vanadilo es quelado por la D - glucosa a través de los átomos en posición cis de los oxígenos anoméricos 1 y 2. La esfera de coordinación consiste en dos glucosas con los grupos hidroxilo desprotonados; así el catión vanadilo queda hexacoordinado por cuatro átomos de oxígeno desprotonados pertenecientes al azúcar y la posible presencia de otro grupo OH en la sexta posición. La estequiometría metal : ligando del complejo resulta ser 1:2 (Etcheverry et al 1997).

La síntesis del complejo se realizó disolviendo 2 mmoles de D - glucosa en 10 ml de agua destilada; esta solución se llevó a pH = 12 y se le agregó, bajo agitación constante, 1 mmol de $VOCl_2$. Se formó una solución verdosa de la cual se obtuvo un sólido cristalino verde luego de la adición de etanol absoluto en varias veces sucesivas, con agitación y descarte del sobrenadante. Este sólido se lavó exhaustivamente con etanol absoluto, se secó y almacenó en estufa a 60°C para evitar la descomposición. El complejo sintetizado se identificó por espectroscopía IR (Etcheverry et al 1997).

Na₆[VO(Trehalosa)₂].4H₂O

En el complejo trehalosa - vanadilo, TreVO, el catión vanadilo está unido al O(2) de la trehalosa, con participación del O(4) u O(6) en la formación del quelato (Barrio et al 2003).

Para sintetizar el complejo, se agregó 1 mmol de VOCl_2 (50%, solución acuosa) a una solución de 2 mmoles de trehalosa en agua. El pH de la mezcla se ajustó a 13 con granallas de NaOH. Luego de la adición de etanol absoluto se formó un sólido microcristalino verde grisáceo, el cual fué filtrado, lavado con etanol absoluto y secado en estufa a 60°C para ser posteriormente identificado por espectroscopía IR (Barrio et al 2003).

$\text{Na}_6[\text{VO}(\text{Diclof})(\text{BuO})_3]$

El complejo diclofenac - vanadilo posee una estructura de pirámide cuadrada, donde se hallan involucrados cinco átomos de oxígeno (Williams et al 2005).

Se preparó una solución de la sal sódica de diclofenac (2 mmol) en butanol caliente y se le agregó, bajo atmósfera de N_2 , una solución de acetyl acetato de vanadilo ($\text{VO}(\text{acac})_2$) (1 mmol), también en butanol. Luego de concentrar el líquido por calentamiento, se obtuvo un precipitado que fue filtrado, lavado con butanol caliente y secado al aire (Williams et al 2005).

$\text{Na}_6[\text{VO}(\text{Indo})(\text{BuO})_3]$

Al igual que el complejo con diclofenac, el complejo indometacina -vanadilo posee una estructura piramidal de base cuadrada (Williams et al 2005). La síntesis del complejo vanadilo - indometacina se llevó a cabo por el método indicado para el complejo vanadilo - diclofenac (Williams et al 2005).

b.- Ensayos de solubilidad

Estos ensayos se llevaron a cabo con el fin de determinar el solvente adecuado para

preparar las soluciones stock y de trabajo.

El ensayo se realizó pesando 10 mg de los complejos de vanadio y agregando volúmenes crecientes de los siguientes solventes: agua, DMEM, etanol, etanol / agua (1:1) y dimetilsulfóxido (DMSO). Este ensayo se realizó a temperatura ambiente (T_a). Al elegir los solventes se tuvo en cuenta que los mismos fuesen miscibles con agua y compatibles con los estudios biológicos.

c.- Estudios de estabilidad

c.1.- Estabilidad en fase sólida

Los estudios de estabilidad en fase sólida se realizaron utilizando espectroscopía IR. Los compuestos recién sintetizados fueron identificados por esta técnica y conservados en estufa a 60°C (TreVO y GluVO) ó a temperatura ambiente (VOAspi). El estudio se llevó a cabo analizando los compuestos periódicamente por espectroscopía IR, usando la técnica de la pastilla en KBr. Se compararon las posiciones relativas de las bandas, la relación entre bandas; así como también la existencia de nuevas bandas que sugieran degradación de los complejos.

c.2.- Estabilidad en solución

Con el fin de evaluar la estabilidad de los complejos de vanadilo en solución, se utilizaron diferentes condiciones. Basados en los ensayos de solubilidad, se prepararon soluciones de concentración 20 mM en agua destilada y en medio de cultivo DMEM (pH = 7,4).

El estudio se llevó a cabo registrando el espectro UV - visible de los complejos a distintos tiempos en las condiciones antes mencionadas. Se evaluó la degradación de

los complejos en función del tiempo analizando la desaparición de las bandas de absorción características de cada compuesto.

d.- Cultivos Celulares

MC3T3E1:

La línea celular clonal MC3T3E1 derivada de calvaria de ratón es un modelo bien definido para el estudio *in vitro* del desarrollo normal osteoblástico (Fratzl-Zelman et al 1997; Suzuki et al 2002).

Las células MC3T3E1 fueron cultivadas en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con 10 % de suero fetal bovino (SFB), penicilina (100 UI / ml) y estreptomycin (100 µg / ml) en atmósfera humidificada con 5 % CO₂. Cuando la monocapa celular alcanzó la subconfluencia, se despegaron de la superficie del frasco de cultivo con 0,25 % de tripsina en PBS a pH = 7,4 - 1mM EDTA y se resuspendieron en DMEM - 10 % SFB.

UMR106:

UMR106 es una línea celular clonal osteoblástica derivada de un osteosarcoma de rata (Chak et al 1995). Esta línea celular expresa varios marcadores osteoblásticos, entre ellos FAL y síntesis de colágeno tipo I (Partridge et al 1983).

Las células de osteosarcoma se cultivaron en frascos de 75 cm² en atmósfera humidificada conteniendo 5 % CO₂. El medio de crecimiento para estas células es DMEM suplementado con 10 % de SFB, penicilina (100 UI / ml) y estreptomycin (100 µg / ml). Cuando las células alcanzaron la

subconfluencia, fueron despegadas del frasco de crecimiento usando 0,5 % de tripsina en PBS - 1mM EDTA y se resuspendieron en DMEM - 10 % SFB.

RAW264.7

Las células derivadas de macrófagos de ratón, RAW264.7, fueron establecidas a partir de ascitos de un tumor inducido en ratones machos por la inyección intraperitoneal del virus de leucemia Abselon (A - MuL - V). Estas células expresan distintos tipos de marcadores de activación, tales como síntesis de interleuquinas, formación de vesículas de fagocitosis, expresión de NF-KB, expresión de sintasas de óxido nítrico (NOS), producción de óxido nítrico (NO), etc (Chen et al 1999). Por este motivo, resultan útiles para el estudio de acciones citotóxicas normales de las células de linaje monocito / macrófago.

La línea celular RAW264.7 se cultivó en frascos de 75 cm² en atmósfera humidificada conteniendo 5% de CO₂, utilizando como medio de cultivo RPMI1640 suplementado con 10 % SFB, penicilina (100 UI / ml) y estreptomycin (100 µg / ml). Cuando las células alcanzaron la confluencia, fueron despegadas del frasco de crecimiento usando PBS (pH = 7,4) - 1mM EDTA y se resuspendieron en RPMI - 10 % SFB.

3.2.- Ensayos de citotoxicidad

a.- Estudios morfológicos

La evaluación de la morfología celular se realizó por medio de la observación microscópica de los cultivos celulares control

comparados con cultivos sometidos a los diferentes tratamientos. Las células fueron fijadas con metanol durante 5 min y teñidas 10 min con Giemsa; luego de lavar exhaustivamente la monocapa celular se la montó y observó usando un microscopio óptico. Se evaluaron las características del citoplasma y del núcleo, presencia de contactos celulares, etc. (Sálice et al 1999).

b.- Ensayo mitogénico

Este ensayo tiene como fin evaluar la acción mitogénica de los distintos compuestos. Se estudió el efecto de la concentración de los potenciales agentes terapéuticos sobre la proliferación celular.

La proliferación de los distintos tipos celulares sometidos a las condiciones experimentales descritas mas abajo se determinó por medio del ensayo del cristal violeta (Okajima et al 1992). Con el fin de evaluar el efecto de la dosis de distintos complejos de vanadio sobre la proliferación, las células cultivadas en platos de 48 pocillos hasta 60 % de confluencia, se incubaron con diferentes concentraciones de las drogas en estudio en DMEM sin SFB durante 24 hs. Luego, la monocapa celular se lavó con PBS, se fijó durante 5 min con 5 % glutaraldehído en PBS y se tiñó con 0,5 % cristal violeta en metanol al 30 % . El exceso de colorante se lavó exhaustivamente con agua potable, los platos se secaron al aire y el colorante se extrajo con 0,1 M glicina / HCl (pH = 3) / 30 % metanol. La absorbancia del extracto se midió a 540 nm. Previamente nuestro grupo demostró la correlación entre el recuento de células vivas y este método (Cortizo y

Etcheverry 1995). Los resultados se comparan contra un basal (ausencia de complejo, vanadilo ó ligando). También se realizaron estudios con los ligandos libres y el catión vanadilo.

c.- Estudio de la producción de radicales libres

c.1.- Detección de especies oxidantes: OH^\cdot y ONOO^\cdot / ONOOH

La formación intracelular de especies oxidantes se detectó por medio de la prueba de oxidación de dihidrorrodamina (DHR) a rodamina 123 (RH). La prueba se basa en que las especies altamente oxidantes, OH^\cdot y ONOO^\cdot / ONOOH , son capaces de oxidar la DHR a RH; esta última especie por ser fluorescente puede ser detectada midiendo la fluorescencia emitida a 536 nm cuando se excita con 500 nm (Kooy et al 1994). El experimento se realizó cultivando las células en DMEM / 10 % SFB hasta que alcanzaron la confluencia. A continuación, se las incubó en DMEM a 37° C con concentraciones crecientes de los complejos de vanadio durante 4 hs. Luego, cada pocillo se lavó dos veces con solución salina bufereada de Hank (HBSS) y se incubó 30 min con DHR (1 ug / ml) en HBSS con el fin de permitir el ingreso de la sonda fluorescente al citoplasma y su posterior oxidación. Finalmente, las células fueron lisadas con 1 ml de 0,1 % Tritón - X100 y se midió la intensidad de fluorescencia del extracto celular en un espectrofluorómetro, usando como estándar 0,5 uM de RH (Cortizo et al 2000a). A una alícuota de cada extracto celular se le determinó el contenido total de proteínas por pocillo por el método de

Bradford (Bradford et al 1976).

Los resultados se expresaron usando la siguiente fórmula:

$$\mu\text{mol RH} / \text{mg Proteína} (\% \text{ Basal}) = (\mu\text{mol RH} / \text{mg Proteína})_x / (\mu\text{mol RH} / \text{mg Proteína})_c * 100$$

donde x = condición experimental y c = condición control (sin el agregado de complejos de vanadio).

c.2.- Estudio de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico

Los ácidos grasos poliinsaturados de membranas celulares poseen gran susceptibilidad al ataque oxidativo. El producto final principal de la peroxidación lipídica, malondialdehído (MDA), puede reaccionar con el ácido tiobarbitúrico (TBA) para dar aductos coloreados cuyo máximo de absorción se presenta a 532 nm (Beuge y Aust 1978; Salahudeen et al 1995).

El ensayo se llevó a cabo cultivando las líneas celulares en platos de 6 pocillos hasta confluencia; se incubó luego la monocapa celular con diferentes dosis de los complejos de vanadio durante 4 hs a 37°C en DMEM sin agregado de SFB. A continuación, se lavaron las células con PBS (pH = 7,4) y se lisaron con 200 µl de 0,1 % Tritón X - 100. Se tomaron 10 µl del extracto celular para determinar el contenido de proteínas por el método de Bradford (Bradford et al 1959); los 180 µl restantes se incubaron durante 1h a 80 °C con 500 µl de 20 % ácido acético y 500 µl de 0,5 % TBA; luego de enfriar la solución de reacción, se centrifugó a 5000 rpm

por 5 min y la densidad óptica del sobrenadante se leyó a 532 nm. Se usó un estándar de MDA (1 nmol / µl). Los resultados se expresaron como nmoles de MDA / mg de proteína (% Basal) (Cortizo et al 2000a)

c.3.- Producción de óxido nítrico

La liberación de óxido nítrico (NO) al medio de cultivo se evaluó midiendo el producto final estable del óxido nítrico, el nitrito por medio del ensayo de Griess (Cortizo et al 2000b) utilizando ácido sulfanílico como agente de diazotación y N - 1 - naftilen diamina como agente de acoplamiento. El ensayo se llevó a cabo mezclando 400 µl de muestra (medio condicionado) o estándar de nitrito (0 - 100 nM) con 400 µl del reactivo de Griess (sulfanilamida 1% y naftilendiamina 0,1% en ácido fosfórico 5%). Luego de 10 min se midió la absorbancia a 530 nm, utilizando como blanco medio no condicionado.

c.4.- Western Blot para eNOS e iNOS

La monocapa celular se lisó con buffer de Laemmli (Laemmli 1970) y el contenido de proteínas se determinó por el ensayo de Lowry (Lowry et al 1970). El lisado celular se calentó a 100 °C durante 3 min y se empleó una alícuota conteniendo 40 µg de proteína para realizar una electroforesis en gel de agarosa 8%. Las proteínas separadas se transfirieron a una membrana de PVDF. La membrana se bloqueó con leche descremada 3 % en buffer salino Tris (TBS) durante 2h a temperatura ambiente. Luego la membrana se incubó durante 24 h a 4 °C con anticuerpos policlonales anti - iNOS y anti - eNOS preparados en albúmina sérica bovina 0,5 %

en PBS (1:2000). Luego de cuatro lavados con PBS - Tween 0,1 %, las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente y las bandas se revelaron por medio del reactivo peroxidasa - biotina y diaminobencidina del kit de Vectastain. La intensidad de las bandas específicas de eNOS e iNOS se cuantificó por densitometría luego de escanear las membranas de PVDF utilizando el escaner Hewlett - Packard Scanjet 4C. Luego, las imágenes fueron analizadas con el programa Scion - beta 2 (Cortizo et al 2000b).

d.- Estudios de Apoptosis

d.1.- Evaluación de la morfología apoptótica

En los últimos estadios del proceso apoptótico, las células se ven condensadas o picnóticas, pudiendo presentar burbujas o globos en la membrana plasmática. Se observan pérdidas de los contactos con células vecinas y la matriz extracelular. También puede observarse fragmentación y condensación de la cromatina en el borde del núcleo (van Engeland et al 1997).

En este ensayo las células fueron subcultivadas en discos de 30 mm de diámetro y se incubaron 16 h con distintas dosis de los complejos. Luego se fijaron con metanol durante 5 min y tiñeron con Giemsa por 10 min. Finalmente se observaron al microscopio óptico.

d.2.- Evaluación de la externalización de fosfatidil serina

La fase temprana de la apoptosis celular se caracteriza por la relocalización de

fosfatidil serina (PS) en la superficie celular y puede ser fácilmente detectada por medio de la tinción con anexina V, una proteína que naturalmente tiene alta afinidad por la PS (Varga et al 1999).

Las células cultivadas sobre cubreobjetos e incubadas por 4 h con los diferentes compuestos de vanadio, fueron lavadas e incubadas con anexina V (1 ug / ml) y ioduro de propidio (IP; 2,5 µg / ml) en buffer de unión (10 mM Hepes / 140 mM NaCl / 2,5 mM CaCl₂, pH = 7,4). Luego de lavar exhaustivamente con PBS (pH = 7,4), las células se fijaron con paraformaldehído (4 % en PBS, pH = 7,4) durante 10 min y se montaron con medio de montaje para fluorescencia (Vecta shield). Se determinó el número de células apoptóticas (teñidas sólo con anexina V) y el número de células necróticas (teñidas con anexina V - IP).

e.- Evaluación de la funcionalidad mitocondrial. Estudios del potencial de membrana mitocondrial

e.1.- Ensayo de reducción de azul de nitrotetrazolio

La sal de tetrazolio, nitro azul de tetrazolio (NBT), puede ser reducida por las coenzimas de la mitocondria funcional normal, para dar azul de formazán. Así, este ensayo mide el estado redox de las coenzimas mitocondriales (Powell et al 1995).

Cultivos confluentes de las células fueron tratados con distintas dosis de las drogas en estudio durante 4 h a 37°C en atmósfera humidificada conteniendo 5 % CO₂; luego, la monocapa se lavó con solución

salina bufereada de Hank (HBSS) (pH = 7,4) y se incubó 2 hs más con 0,1 % de NBT en HBSS. Las células fueron fijadas 5 min con etanol absoluto y el producto de la reducción de NBT fué extraído con el agregado de 560 μ l de DMSO y 340 μ l de KOH 2 N. Se leyó la absorbancia a 630 nm y se determinaron los nmoles de formazán presentes en cada pocillo a través de una curva de calibración obtenida por reducción de cantidades conocidas de NBT con hidrosulfito de sodio (Vrablic et al 2001). El contenido total de proteínas por pocillo se determinó por el método de Bradford (Bradford et al 1959). Los resultados se expresaron como nmol de formazán / mg proteína.

e.2.- Ensayo de deslocalización de rodamina 123

La sonda fluorescente rodamina 123 (Rh123) fué usada como un indicador de citotoxicidad, así como también para evaluar los efectos del tratamiento sobre el potencial de membrana mitocondrial (Ψ m). La rodamina es captada selectivamente por la mitocondria, hecho que depende del Ψ m (Johnson et al 1980; Johnson et al 1981). En células funcionales con el Ψ m en reposo, la fluorescencia de la Rh123 es inhibida; sin embargo, cuando ocurre la despolarización de la membrana mitocondrial la fluorescencia aumenta (Krick et al 2001).

El ensayo se llevó a cabo cultivando las células en cubreobjetos e incubándolas con diferentes dosis de los complejos de vanadio(IV) durante 4h a 37 °C en atmósfera conteniendo 5% CO₂. Se las lavó con HBSS (pH = 7,4) y se las incubó con Rh123 (10 μ g /

ml) en HBSS durante 30 min a 37 °C. Finalmente, luego de retirar completamente el exceso de Rh123 por lavados sucesivos con PBS (pH = 7,4) se las observó en un microscopio de fluorescencia.

3.3.- Estudios de potencialidad antitumoral

Existen tres procesos secuenciales en la invasión tisular por células tumorales: invasión - adhesión, degradación de la matriz extracelular, migración y crecimiento de las células a los sitios de metástasis. Los ensayos que se describen a continuación tienen como fin evaluar el efecto de las drogas con potencialidad antitumoral en estos parámetros.

a.- Ensayos de adhesión celular

Se evaluó el efecto de TreVO, GluVO y VOAspi sobre la adhesión celular. Para ello, una suspensión celular de 10⁴ células / ml DMEM / 10% SFB se agregó sobre discos de cultivo de 30 mm de diámetro y se las incubó durante 2 h a 37 °C en atmósfera humidificada conteniendo 5% CO₂; luego se lavó cada disco con PBS (pH = 7,4) para eliminar las células no adheridas. Las células adheridas fueron fijadas con metanol absoluto por 5 min y se las tiñó con la coloración de Giemsa. Se contó el número de células adheridas / campo, usando una magnificación de 100x. En esos mismos experimentos se evaluó el spreading celular contando el número de células / campo visual que poseían 2 o más extensiones citoplasmáticas (McCathy et al 2004).

b.- Inmunofluorescencia para fibras de actina

La organización de las fibras de estrés se evaluó por inmunofluorescencia directa. Luego de incubar las células 4 h en presencia de 100 μ M de los complejos de vanadio, se las fijó, permeabilizó y bloqueó durante 2 h con albúmina sérica bovina 3 % en PBS, luego se las incubó con paloidina - FITC (1:1000) durante 2 h. Finalmente se las montó y observó en un microscopio de fluorescencia (Cortizo y Kreda 2000).

c.- Ensayos de migración

Los estudios de migración se realizaron por medio del ensayo de la herida. Este ensayo consiste en realizar una «herida» a una monocapa de células confluentes; la herida se produce raspando la monocapa celular con la punta de un tip amarillo. Luego, se lava con DMEM / 10% SFB para retirar las células despegadas; las células adheridas son incubadas 18 h con los compuestos y finalmente son teñidas con la coloración de Giemsa y observadas al microscopio óptico (Alonso et al 1998). La distancia de migración desde los bordes de la herida se midió utilizando un ocular graduado micrométricamente.

d- Estudios sobre el desarrollo de unidades formadoras de colonias

Una vez que las células han migrado hacia el sitio de metástasis comienzan a proliferar generando nuevos tumores. En este ensayo se evalúa la capacidad de los complejos de vanadio para evitar la formación de colonias (micrometástasis). Para ello, se agregaron 100 células / pocillo en un plato de

12 pocillos. Se incubaron en DMEM / 5% SFB en presencia 2,5 y 5 mM de los complejos de vanadio durante 10 días, cambiándoles el medio cada dos días. Luego de este período, las células son fijadas, teñidas con Giemsa y se cuenta el número de colonias con mas de 10 células por campo de observación usando un objetivo de cinco veces de magnificación. Los resultados se expresan como % Basal.

4. Resultados

El presente capítulo se halla estructurado en cuatro secciones. El estudio de la estabilidad y solubilidad de los complejos de vanadio constituye por lógica la primera de éstas. A continuación se presentan dos secciones, la primera de las cuales describe ensayos que evalúan el efecto agudo de los complejos sobre los osteoblastos (sección 4.2). La siguiente sección, 4.3, estudia el uso crónico de los compuestos sobre el osteosarcoma UMR106, por ello es que las concentraciones utilizadas de los quimioterápicos son menores que en la sección anterior. Debido a que las células fagocitarias del sistema inmunológico participan en el proceso antitumoral del huésped, estudiamos el efecto de VOAspi sobre la línea celular RAW264.7, derivada de monocitos – macrófagos (sección 4.4).

4.1.- Estudios de solubilidad y estabilidad

4.1.a.- Determinación de la solubilidad

Los complejos de vanadilo(IV) con ligandos orgánicos se sintetizaron de acuerdo

a los procedimientos descritos en el capítulo Materiales y Métodos, y se identificaron por espectroscopía IR. El primer paso en el estudio de estos complejos fue la determinación de la solubilidad con el fin de elegir el solvente mas adecuado para realizar las soluciones de trabajo en los distintos ensayos biológicos. Encontramos que los complejos poseen diferencias de solubilidad dependiendo de las características del ligando. Para aquellos complejos cuyos ligandos son hidrosolubles (TreVO y GluVO) la mayor solubilidad se produce en agua destilada; mientras que el complejo vanadilo - aspirina presenta mayor solubilidad en DMSO, un solvente polar aprótico, mientras que en solventes polares próticos posee menor solubilidad (Tabla 4.1). Los complejos con diclofenac e indometacina son insolubles en agua, y parcialmente solubles en etanol / agua, etanol y DMSO (Tabla 4.1). Por otro lado, se observa que los complejos con azúcares, TreVO y GluVO, presentaron características de solubilidad similares entre sí. Poseen gran solubilidad en agua (675 y 700 g / l respectivamente), siendo insolubles

| Solubilidad (g / l) | | | | | |
|----------------------------------|---------------|--------------|---------------|--------------|--------------|
| | VOAspi | DicVO | IndoVO | GluVO | TreVO |
| Agua | 10 | insoluble | insoluble | 700 | 675 |
| Etanol / Agua (1 : 1) | 66,7 | 1,8 | 6,2 | 25 | 33,3 |
| Etanol | 63,4 | 1,1 | 1,4 | insoluble | insoluble |
| DMSO | 100 | 1,3 | 1 | insoluble | insoluble |

Tabla 4.1.- Solubilidad de los complejos de vanadio en solventes de interés biológico: se determinó la solubilidad de los compuestos en diferentes solventes con el fin de elegir aquél que fuese compatible con los estudios biológicos.

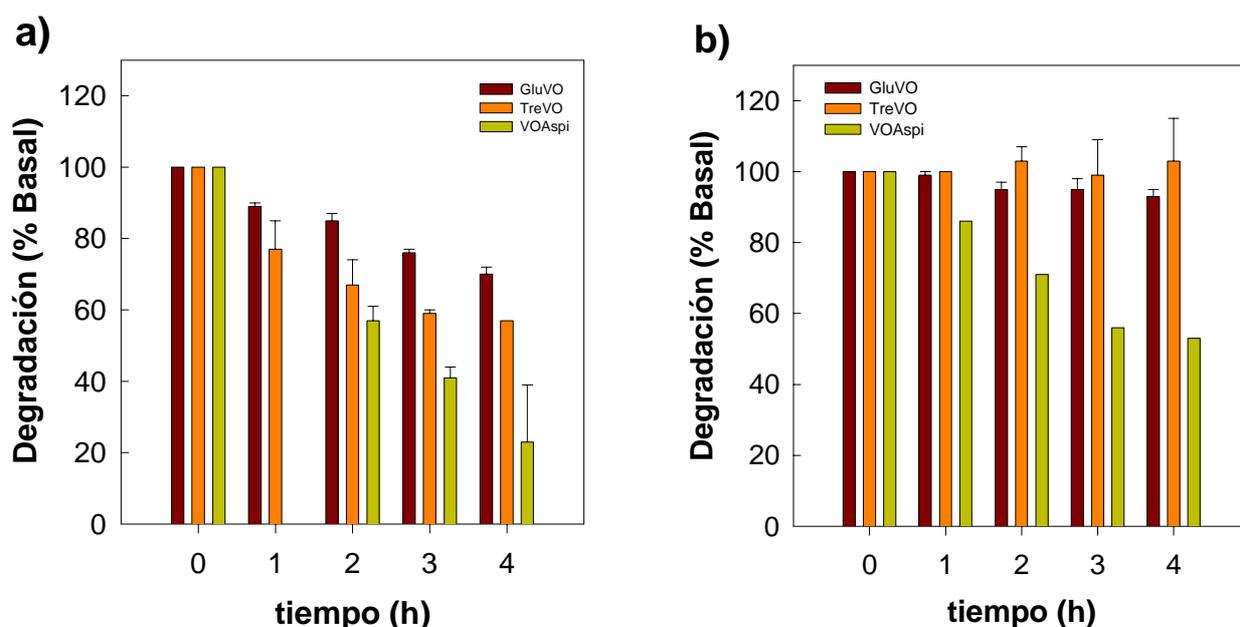


Figura 4.1: Degradación de los complejos de vanadilo(IV) en función del tiempo: se prepararon soluciones de los complejos de vanadio en agua (a) y DMEM (b) y se estudió su degradación en función del tiempo a temperatura ambiente. Los resultados se expresan como % Basal y representan la media \pm SEM de triplicados independientes.

en DMSO y etanol 96°; y poco solubles en mezcla de etanol / agua (1 : 1) (aproximadamente 30 g / l).

4.1.b.- Estabilidad de los complejos de vanadio

Los ensayos de estabilidad en fase sólida se diseñaron con el fin de evaluar el tiempo máximo de almacenamiento que permiten los compuestos sin degradarse a la temperatura de almacenamiento (los complejos con azúcares se conservan a 60 °C, mientras que los derivados con AINES a temperatura ambiente (Etcheverry et al 1997; Etcheverry et al 2002; Barrio et al 2003). La estabilidad en fase sólida se estudió por medio de espectroscopía IR, realizando el ensayo una vez por semana. Los complejos TreVO y VOAspi pueden almacenarse durante 9 semanas sin degradarse, mientras que

GluVO resulta mas inestable, degradándose a las 3 semanas de almacenamiento (Tabla 4.2). Los estudios de estabilidad en solución permiten evaluar la degradación de los complejos en las distintas soluciones de trabajo. La estabilidad de los complejos en solución se analizó por espectroscopía UV - visible. En la figura 4.1 se muestran los porcentajes de degradación de los complejos en agua destilada y en DMEM en función del tiempo. Esta figura muestra que las soluciones acuosas de los complejos son, en general,

| tiempo (semanas) | |
|---------------------|---|
| GluVO | 3 |
| TreVO | 9 |
| VOAspi | 9 |

Tabla 4.2. Estabilidad en fase sólida: los complejos de vanadio almacenados se estudiaron por espectroscopía IR.

mas inestables que las soluciones en medio de cultivo, observándose que en el transcurso de la primer hora de realizada la solución en agua, se pierde un porcentaje importante del complejo (entre el 11 y el 23 %, para los complejos GluVO y TreVO respectivamente) y luego continúan degradándose en forma progresiva a lo largo del tiempo (fig 4.2.a). Sin embargo, en medio de cultivo tanto GluVO como TreVO permanecen estables durante la primer hora; mientras que, en ese período de tiempo, se ha degradado aproximadamente un 14 % de VOAspi (fig 4.2.b). Los tres complejos estudiados presentan una cinética de decaimiento de la concentración o cinética de degradación de tipo exponencial en función del tiempo en DMEM. Por otro lado, en agua GluVO presenta cinética lineal de degradación en función del tiempo, pero TreVO y VOAspi presentan el mismo tipo de comportamiento que en DMEM, aunque la velocidad a la que ocurre el proceso degradativo en agua es mayor. En la tabla 4.3 se muestran los parámetros cinéticos (K_d , constante de degradación y $t_{1/2}$, tiempo de vida medio) que corroboran las observaciones anteriores.

4.2 Ensayos de citotoxicidad

4.2.a.- Evaluación de la morfología celular

Las células UMR106, por provenir de un tumor, muestran gran heterogeneidad morfológica. Poseen mayor tamaño que la línea no transformada y la relación núcleo / citoplasma es mayor. En condiciones basales, la mayoría de las células UMR106 presentan aspecto cuboidal, con el núcleo excéntrico de forma arriñonada, poseyendo dos o mas nucléolos prominentes (fig 4.2.a). Las células presentan conexiones citoplasmáticas entre ellas y puede observarse la presencia de mitosis. Cuando esta línea celular es tratada con 100 μ M de los complejos de vanadilo durante 16 h, se observa que el citoplasma se condensa, los núcleos se ven picnóticos y su morfología normal se encuentra alterada (para TreVO y VOAspi se observan núcleos redondos (fig 4.2.c,d); mientras que con GluVO adquieren forma de herradura (fig 4.2.b)), las conexiones intercelulares se pierden, se observan burbujas en la membrana nuclear (fig 4.2.c – d, flechas blancas) y condensación de

| | H_2O | | | DMEM | | |
|---------------|--------------------|---------------|-------------------------|--------------------|---------------|-------------------------|
| | K_d (h^{-1}) | $t_{1/2}$ (h) | Cinética | K_d (h^{-1}) | $t_{1/2}$ (h) | Cinética |
| GluVO | 0,101 | 6,86 | orden 1 | 0,055 | 12,6 | decaimiento exponencial |
| TreVO | 0,157 | 4,4 | decaimiento exponencial | 0,014 | 50,2 | decaimiento exponencial |
| VOAspi | 0,250 | 2,75 | decaimiento exponencial | 0,108 | 3,4 | decaimiento exponencial |

Tabla 4.3: Parámetros cinéticos de degradación. Se determinaron los parámetros cinéticos de degradación de los complejos en agua y DMEM a temperatura ambiente, a partir de gráficos de absorbancia vs tiempo (ver texto).

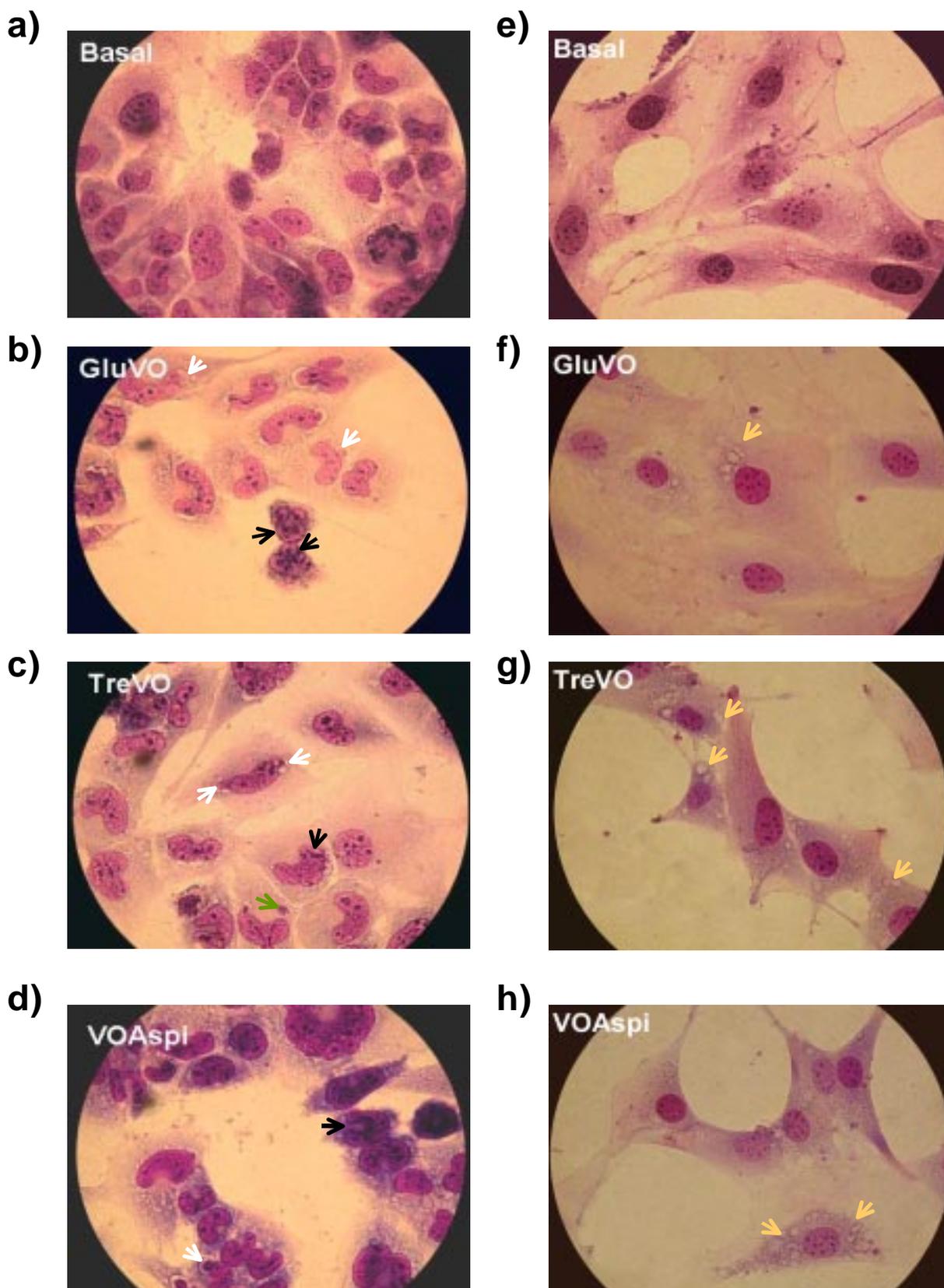


Figura 4.2: Efecto de los complejos de vanadio sobre la morfología celular. Las células UMR106 (a - d) y MC3T3E1 (e - h) fueron incubadas durante 16 h con los compuestos, teñidas con Giemsa y observadas al microscopio óptico (magnificación 40x). Se observan burbujas en la membrana nuclear (b - d, flechas blancas), condensación de la cromatina sobre la membrana nuclear (b - d, flechas negras) y presencia de cuerpos apoptóticos (c, flecha verde). En las figuras f - h se observa la presencia de vacuolas citoplasmáticas (flechas anaranjadas)

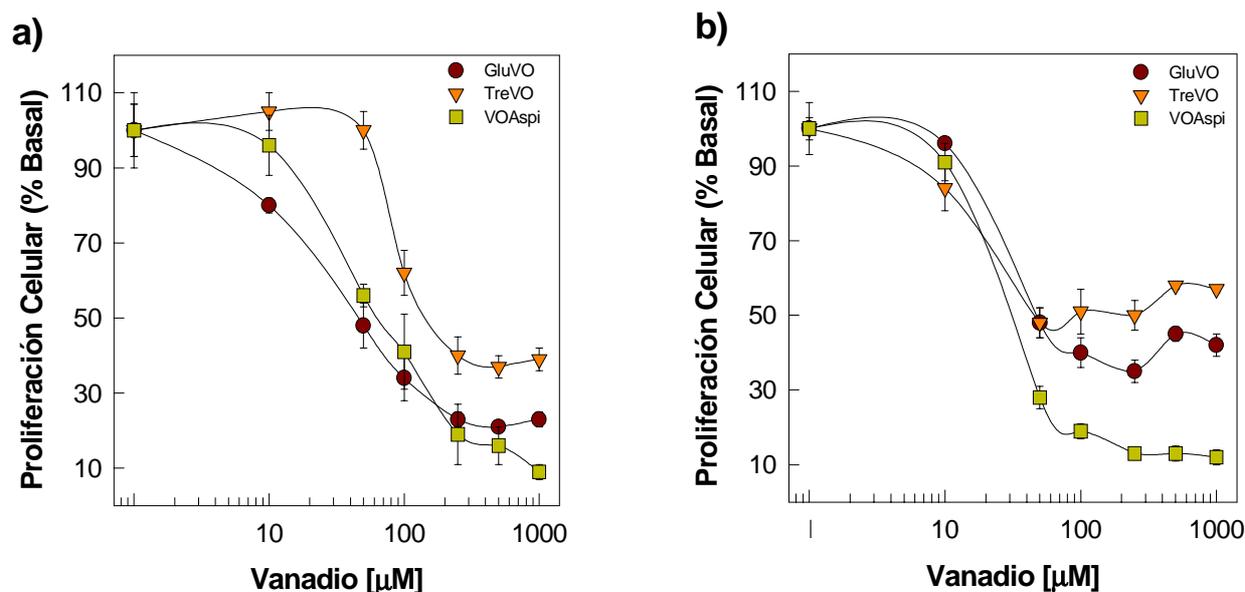


Figura 4.3.- Efecto de GluVO, TreVO y VOAspi sobre la proliferación celular: los osteoblastos UMR106 (a) y MC3T3E1 (b) fueron incubados con dosis crecientes de los complejos de vanadio durante 24 h. Los resultados se expresan como % Basal y representan la media \pm SEM (n = 3). Diferencias significativas respecto del basal $p < 0,01$.

la cromatina sobre los bordes de la membrana nuclear (fig 4.2. c – d, flechas negras). También hay presencia de cuerpos apoptóticos (fig 4.2.c,d, flecha verde) correspondientes a células que han sufrido apoptosis y han sido fagocitadas por células vecinas.

Los osteoblastos normales MC3T3E1 en condiciones basales, sin ser sometidos a tratamiento alguno, muestran un aspecto fibroblástico; presentan un núcleo redondo,

con 3 a 5 nucléolos dispuestos en forma de rueda de carro; poseen citoplasma alargado, con 2 a 3 extensiones citoplasmáticas y conexiones intercelulares (fig 4.2.e). Cuando estas células son tratadas con 100 μ M de TreVO, GluVO y VOAspi durante 16 h, se observa que aumenta el número de vacuolas citoplasmáticas y el núcleo pierde su redondez (fig 4.2.e - h). Luego del tratamiento con GluVO se observa además que el tamaño del

| | UMR 106 | | MC 3T3E 1 | |
|---------------|-----------------------------|------------------------------------|-----------------------------|------------------------------------|
| | DE ₅₀ (μ M) | Inhibición Proliferación (% Basal) | DE ₅₀ (μ M) | Inhibición Proliferación (% Basal) |
| GluVO | 30 | 80 | 25 | 60 |
| TreVO | 90 | 60 | 16 | 50 |
| VOAspi | 50 | 90 | 33 | 90 |

Tabla 4.4.- Parámetros de acción farmacológica de los complejos de vanadio: a partir de los gráficos de proliferación (fig 4.4) se obtuvieron los parámetros farmacológicos: potencia (evaluada a través de la DE₅₀) y Eficacia (% Inhibición de la proliferación a la máxima dosis empleada).

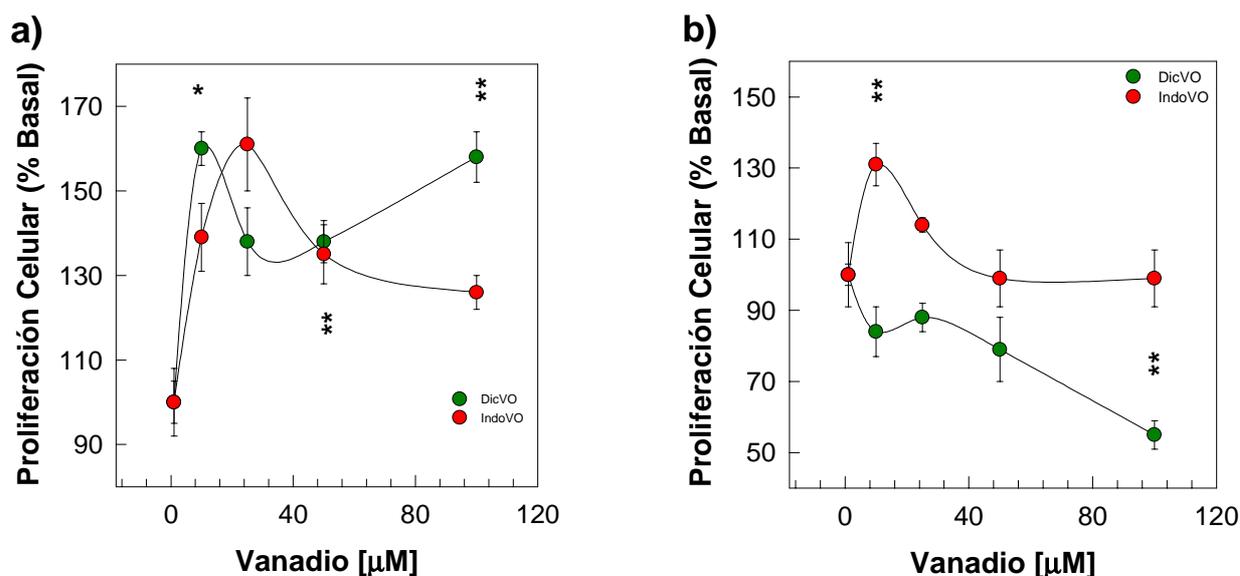


Figura 4.4.- Efecto de IndoVO y DicVO sobre la proliferación de células osteoblásticas: las células UMR106 (a) y MC3T3E1 (b) se incubaron con dosis crecientes de los complejos de vandilo(IV) durante 24 h. Luego de este tiempo se realizó el ensayo del cristal violeta. Los datos se expresan como % Basal y representan la media \pm SEM, n = 3, * p < 0,01; ** p < 0,02.

citoplasma aumenta, mientras que para TreVO y VOAspi, parecería mas bien condensarse, desplazando al núcleo hacia alguno de los bordes de la membrana plasmática (núcleo excéntrico) (fig 4.2.f - h).

4.2.b.- Efectos sobre el crecimiento celular

En estos estudios se analizó el efecto de distintas concentraciones de los complejos de vanadio sobre el crecimiento de las dos líneas osteoblásticas en cultivo.

Con el fin de determinar parámetros farmacológicos de utilidad para comparar los diferentes complejos, definimos la *eficacia* de un complejo como el % de inhibición de la proliferación a la dosis máxima empleada (% de inhibición máxima); mientras que la *potencia* de un complejo para producir el efecto deseado se define como la dosis necesaria para causar el 50 % del máximo efecto evaluado (DE_{50}).

La figura 4.3.a muestra el efecto de TreVO, GluVO y VOAspi sobre la proliferación de las células del osteosarcoma UMR106. El complejo vandilo(IV) - aspirina resulta ser el mas eficaz de los tres complejos para inhibir la proliferación celular (90 % Inhibición respecto al basal, p < 0,0001); mientras que TreVO posee la menor eficacia (60 % Inhibición, p < 0,001) (fig 4.3.a; Tabla 4.4). Cuando se determina la dosis efectiva cincuenta (DE_{50}) como una medida de la potencia de las drogas para inhibir el crecimiento de las células UMR106, se halla que GluVO es el complejo mas potente (DE_{50} = 30 µM) y TreVO presenta la menor potencia (DE_{50} = 90 µM) en esta línea celular (Tabla 4.4). En los osteoblastos no transformados, MC3T3E1, TreVO y GluVO no inhiben tan eficazmente la proliferación celular. Aún a altas dosis de los complejos (> 500 µM) la

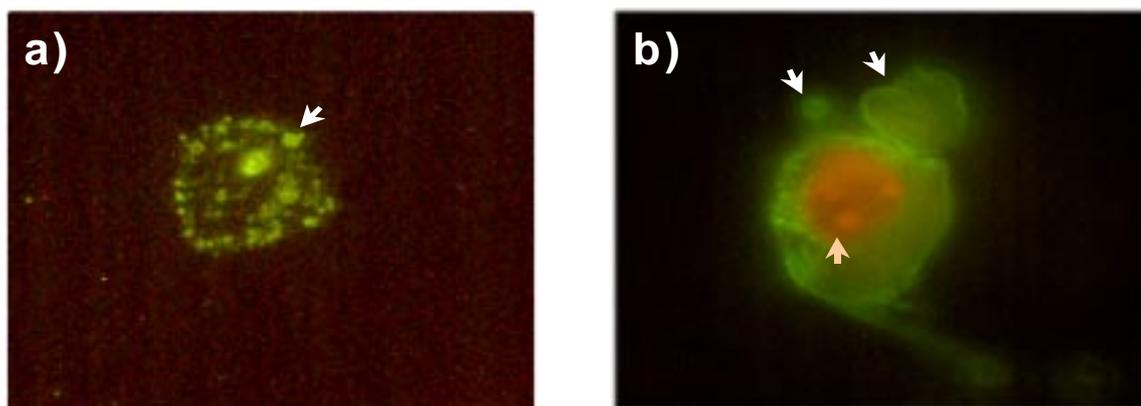


Figura 4.5.- Morfología apoptótica: los primeros estadios de la apoptosis se caracterizan por la externalización de fosfatidilserina evidenciándose como fluorescencia verde luego del tratamiento con anexina V - FITC (a). Posteriormente, se producen poros en la membrana plasmática que permiten el ingreso de moléculas de mayor tamaño, tales como el IP (b). Las flechas blancas indican burbujas en la membrana citoplasmática, mientras que la anaranjada indica el núcleo celular teñido con IP.

inhibición de la proliferación celular no es mayor del 50 % (fig 4.3.b). En cambio, VOAspi presenta una toxicidad similar en esta línea celular que la observada en las células de osteosarcoma. Sin embargo, en la tabla 4.4 puede observarse que a pesar de la menor eficacia para inhibir la proliferación de osteoblastos normales, la potencia con la cual se observa este efecto se encuentra a dosis menores que para la línea tumoral, sugiriendo que los osteoblastos normales son más sensibles a los efectos de los complejos de vanadio que las células tumorales UMR106.

Cuando se realiza el ensayo mitogénico con IndoVO y DicVO, se observa que ambos complejos estimulan la proliferación celular del osteosarcoma en todas las dosis estudiadas (10 - 100 μ M) (fig 4.4.a). En los osteoblastos no transformados, MC3T3E1, IndoVO estimula la proliferación celular a 10 μ M (31 % respecto al basal, $p <$

0,02) y no ejerce efecto sobre este parámetro a dosis mayores (fig 4.4.b), mientras que DicVO inhibe significativamente la proliferación de esta línea celular a partir de 100 μ M ($p <$ 0.02) (fig 4.4.b).

En base a este ensayo seleccionamos, para continuar los estudios, los complejos con efecto antiproliferativo sobre la línea tumoral UMR106. Así, no se incluirán en los estudios que se describen a continuación los complejos con indometacina y diclofenac.

4.2.c.- Evaluación de la apoptosis celular

Se evaluó la externalización de fosfatidil serina como una medida de la apoptosis celular. Las células fueron tratadas con dosis crecientes de los complejos de vanadio durante 4 h y luego fueron teñidas con anexina V / yoduro de propidio por 10 min, como se describe en Materiales y Métodos. Aquellas células que se encuentren en los primeros estadios de apoptosis, presentarán

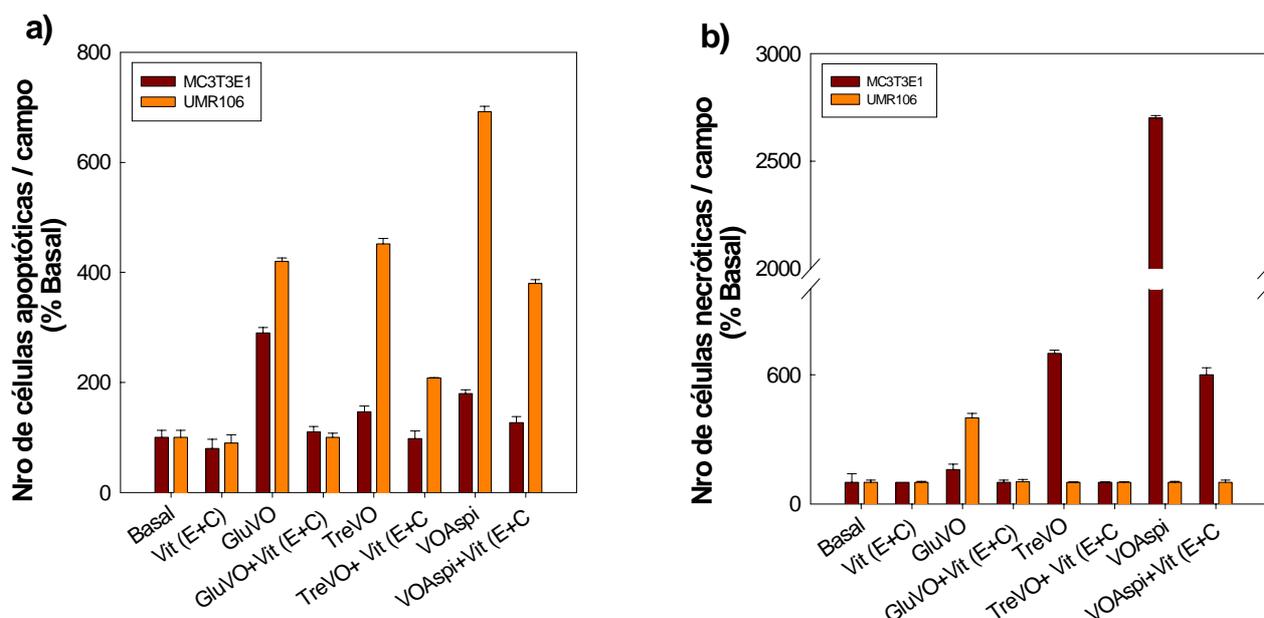


Figura 4.6.- Estudios de apoptosis y necrosis: las células UMR106 ó MC3T3E1 fueron expuestas a los complejos de vanadio durante 4h, con o sin la presencia de vitamina (E+C) 50 μ M. Luego de la tinción con anexina V / ioduro de propidio, se determinó el número de células apoptóticas (a) ó necróticas (b) por campo de observación. Los resultados representan la media \pm SEM y se expresan como % Basal (n = 3).

una tinción verde puntiforme correspondiente a regiones donde la fosfatidilserina se halla expuesta (fig 4.5.a), también pueden observarse burbujas en la membrana

plasmática (fig 4.5.a, flecha blanca). A medida que el proceso apoptótico avanza, se generan poros en la membrana plasmática que permiten el pasaje de diferentes sustancias,

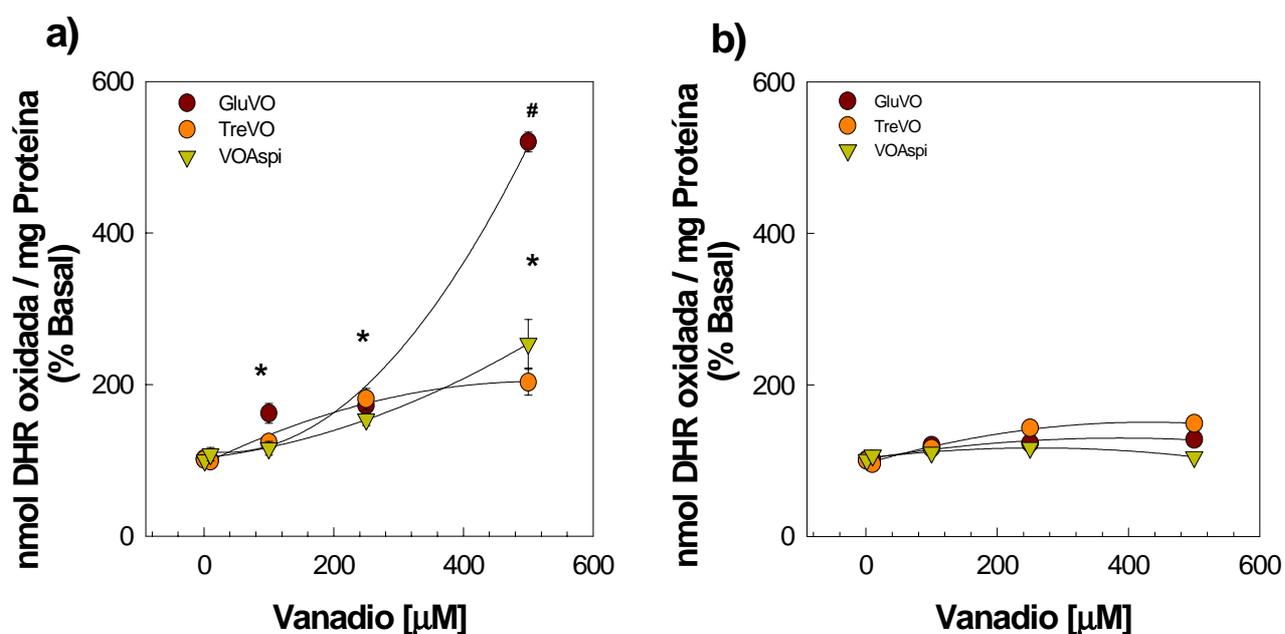


Figura 4.7.- Producción intracelular de ROS: la) Estudio del efecto de la dosis de los complejos de vanadio en la producción de ROS en las células UMR106 (a) y MC3T3E1 (b). Los resultados se expresan como la media \pm SEM, # p < 0,001; * p < 0,01, ** p < 0,02 (n = 4).

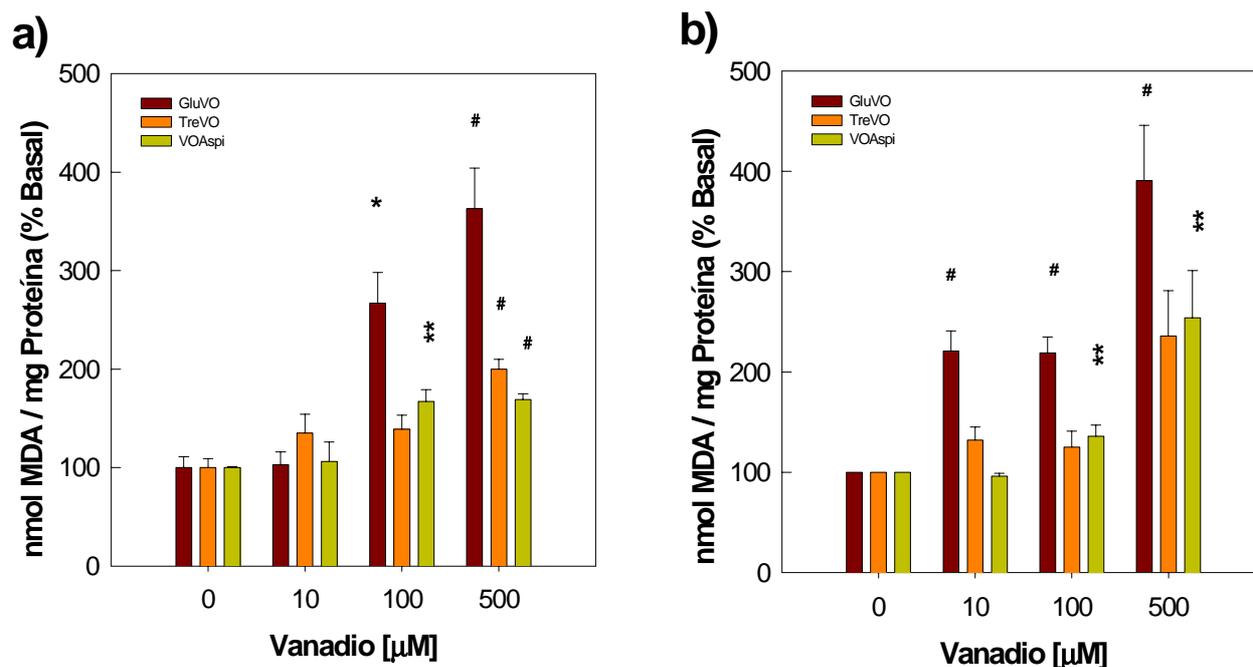


Figura 4.8.- Producción de TBARS: se evaluó la producción de TBARS en las células UMR106 (a) ó MC3T3E1 (b) por medio de la determinación de MDA, luego de la incubación durante 4 h con los compuestos de vanadio. Los resultados representan la media \pm SEM, n = 6, # p < 0,001; * p < 0,01; ** p < 0,02.

entre ellas el colorante nuclear IP. Estos estadios presentan una tinción mas uniforme con anexina V y además el núcleo rojo, debido al ingreso de IP (fig 4.5.b, flecha amarilla).

Luego del tratamiento de las células UMR106 y MC3T3E1 con los complejos de vanadio, se observa un incremento en la apoptosis y necrosis celulares. Los tres complejos estudiado inducen un incremento significativo en los niveles de apoptosis en las células UMR106 (p < 0,001). Este efecto estaría al menos parcialmente mediado por la generación de ROS, ya que la mezcla de vitaminas E y C es capaz de revertirlo parcialmente (fig 4.6.a). En la línea MC3T3E1 los complejos de vanadilo incrementaron los niveles de apoptosis con menor eficacia que en las células UMR106 (fig 4.6.a). Por otro lado, luego del tratamiento con TreVO y VOAspi la necrosis de los

osteoblastos MC3T3E1 se incrementó significativamente (p < 0,001), mientras en las células UMR106 sólo el complejo glucosa - vanadilo incrementó la necrosis (fig 4.6.b). La mezcla de vitaminas revirtió nuevamente la inducción de necrosis celular causada por los complejos de vanadilo (fig 4.6.b).

4.2.d.- Estudios de producción de especies de oxígeno reactivas

4.2.d.i.- Producción intracelular de ROS. Ensayo con dihidrorrodamina

A través del ensayo de oxidación de dihidrorrodamina se evaluó la producción intracelular de especies reactivas de oxígeno (ROS) cuando las células fueron expuestas a los complejos de vanadio. En la células UMR106, GluVO fue el complejo mas efectivo para inducir la producción de radicales libres

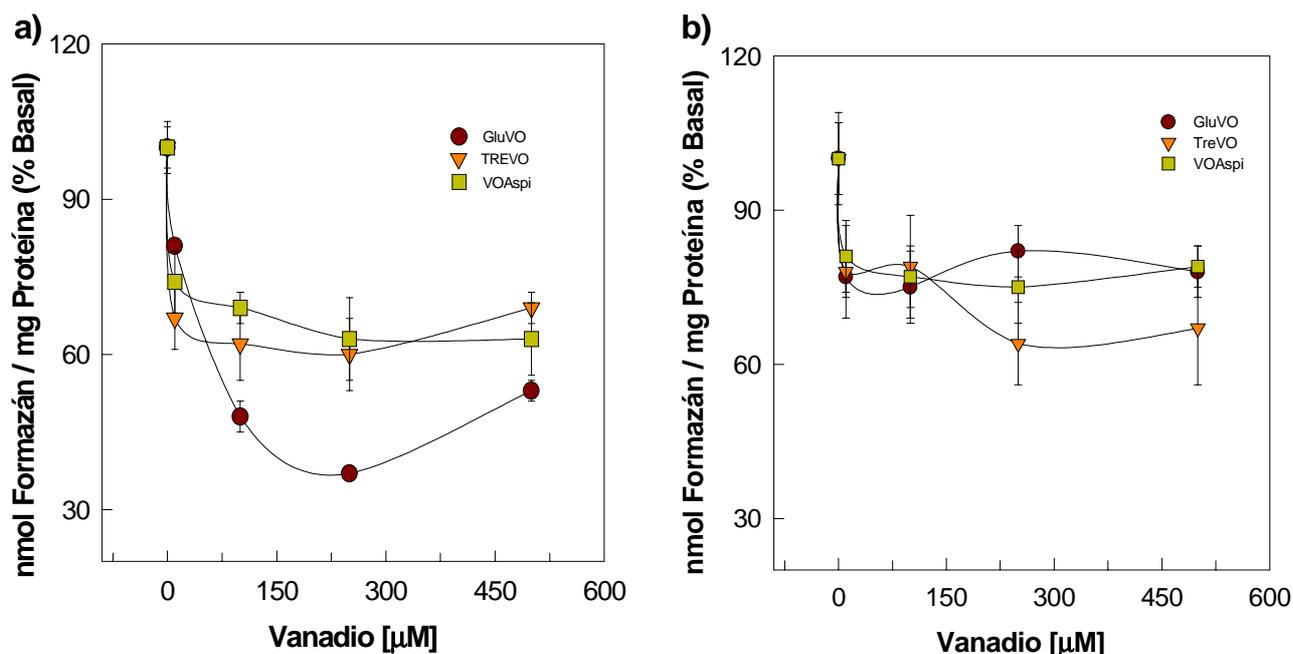


Figura 4.9.- Producción de azul de formazán: las células UMR106 (a) ó MC3T3E1 (b) tratadas durante 4 h con los complejos de vanadio, se incubaron durante 1 h con NBT y luego se midió la cantidad de azul de formazán producida. Los resultados representan la media \pm SEM de seis experimentos independientes, $p < 0,001$.

intracelulares (520 ± 13 % basal, $p < 0,001$), mientras que VOAspi y TreVO resultaron menos efectivos para estimular este parámetro (254 ± 32 y 203 ± 17 % basal respectivamente, $p < 0,01$) (fig 4.7.a).

En cambio, en células MC3T3E1, GluVO y TreVO estimulan la producción de ROS con menor potencia que en la línea tumoral (128 ± 6 y 149 ± 9 respectivamente); mientras que VOAspi no causa incremento en los niveles de ROS en esta línea celular (Fig4.7.b)

4.2.d.ii.- Evaluación de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico

Los niveles del producto final de la peroxidación lipídica, malondialdehído (MDA), dan idea del daño producido por lipoperoxidación en las membranas celulares. El ensayo se llevó a cabo incubando la

monocapa celular con dosis crecientes de los complejos de vanadio, como se describe en Materiales y Métodos. En la figura 4.8 se observa que los complejos de vanadio estimulan la producción de TBARS en forma dosis dependiente. En las células UMR106 (fig 4.8.a) GluVO y TreVO fueron los complejos que indujeron con mayor potencia la producción de TBARS (363 ± 41 y 200 ± 10 , $p < 0,001$); mientras que los niveles de TBARS se incrementaron en menor medida por el tratamiento con VOAspi (169 ± 6 , $p < 0,001$).

En las células MC3T3E1, GluVO y VOAspi incrementan significativamente la producción de TBARS (391 ± 55 , $p < 0,001$ y 254 ± 47 , $p < 0,02$, respectivamente). Sin embargo, el complejo TreVO no estimula significativamente este parámetro en esta línea celular (fig 4.8.b).

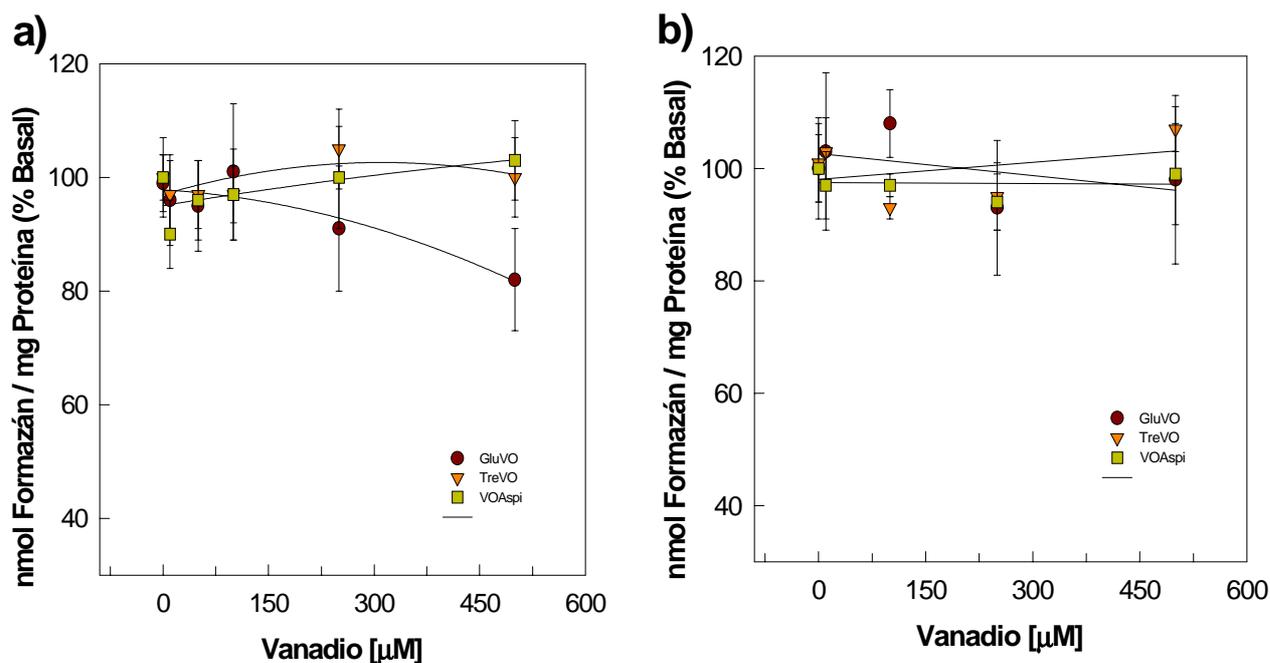


Figura 4.10.- Efecto de la mezcla de vitamina E y C sobre la producción de azul de formazán: a)UMR106 y b) MC3T3E1 luego del tratamiento con los complejos de vanadio, se realizó el ensayo de NBT. Los resultados representan la media \pm SEM de tres experimentos independientes.

4.2.e.- Efecto de los complejos de vanadilo sobre la funcionalidad mitocondrial

La función mitocondrial se estudió por medio de dos ensayos destinados a evaluar la funcionalidad de las enzimas mitocondriales (ensayo de reducción de NBT) y el potencial de transmembrana (tinción con rodamina 123).

4.2.e.i.- Ensayo de reducción de NBT: el colorante azídico, nitro azul de tetrazolio, es capaz de ser reducido por las enzimas mitocondriales a sales azules de formazán, cuando la función mitocondrial se encuentra intacta. Al realizar este ensayo sobre células incubadas durante 4 h con diferentes dosis de los complejos de vanadio, se encuentra una disminución en la producción de azul de formazán (fig 4.9.a). TreVO y VOAspi inhiben la producción de sales de formazán en las

células UMR106 en forma independiente de la dosis, alcanzando una inhibición de 69 ± 3 y 63 ± 7 % basal respectivamente, $p < 0,001$. Por el contrario, GluVO produce inhibición de la función mitocondrial que depende de la dosis en concentraciones menores a $500 \mu\text{M}$, lográndose el efecto máximo a $250 \mu\text{M}$ (fig 4.9.a).

En las células MC3T3E1 también se produce un efecto inhibitorio significativo de las oxidetas mitocondriales por tratamiento con los tres complejos de vanadio estudiados (fig 4.9.b). De los tres complejos, sólo GluVO es mas eficaz para inhibir las enzimas mitocondriales de las células UMR106 que de las MC3T3E1 ($p < 0,01$) (fig 4.9).

El efecto inhibitorio de los complejos de vanadilo sobre la función mitocondrial es bloqueado por el cotratamiento con una mezcla de vitaminas E y C $50 \mu\text{M}$ (fig 4.10).

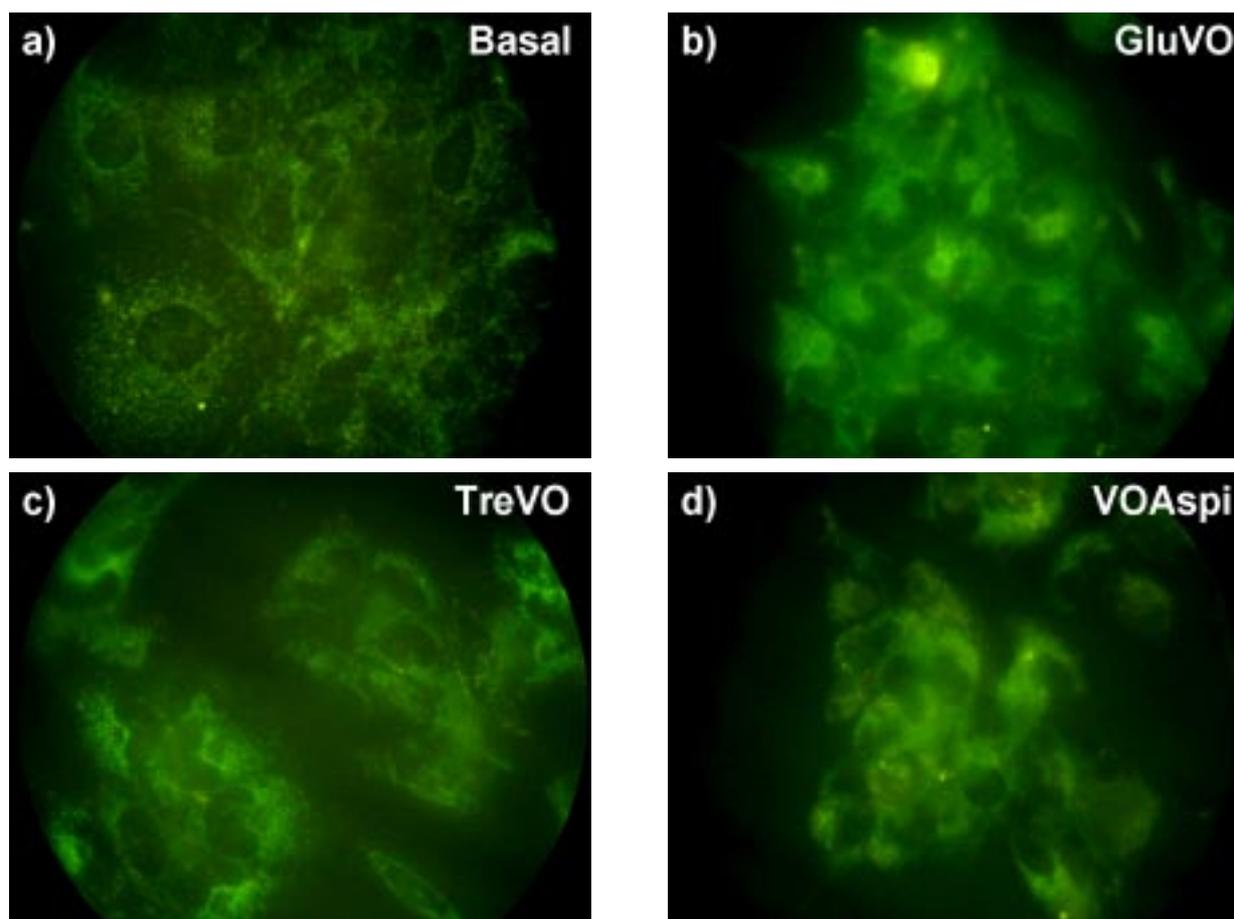


Figura 4.11.- Disipación del potencial de membrana mitocondrial: luego de tratar las células UMR106 durante 4h con 100 μM de los complejos de vanadio, se incubaron con rodamina 123 durante 15 min y se observaron al microscopio de fluorescencia. Obj 40x.

4.2.e.ii.- Tinción mitocondrial con rodamina 123: este compuesto es un fluoróforo catiónico lipófilo, que se almacena preferencialmente en la mitocondria debido a la carga negativa que ésta posee. Cuando el potencial de transmembrana ($\Delta\Psi\text{m}$) se altera, la rodamina es liberada al citoplasma. En condiciones basales, las células UMR106 muestran una tinción puntiforme fluorescente verde intensa en todo el citoplasma, sin embargo es bien definida (fig 4.11.a). Luego de 4h de tratamiento con 100 μM de GluVO y VOAspi se observa que la fluorescencia es mas intensa y difusa, evidenciándose en todo

el citoplasma celular (fig 4.11.b, d). Por otro lado, el tratamiento con TreVO, parece afectar en menor medida la tinción mitocondrial, aunque se observa una redistribución de la fluorescencia, que se localiza principalmente en la hendidura producida por el núcleo, así como también un incremento de la intensidad de la fluorescencia.

4.3.- Evaluación de la capacidad antitumoral de los complejos de vanadilo(IV)

Los resultados presentados hasta aquí sugieren que a ciertas dosis, los complejos

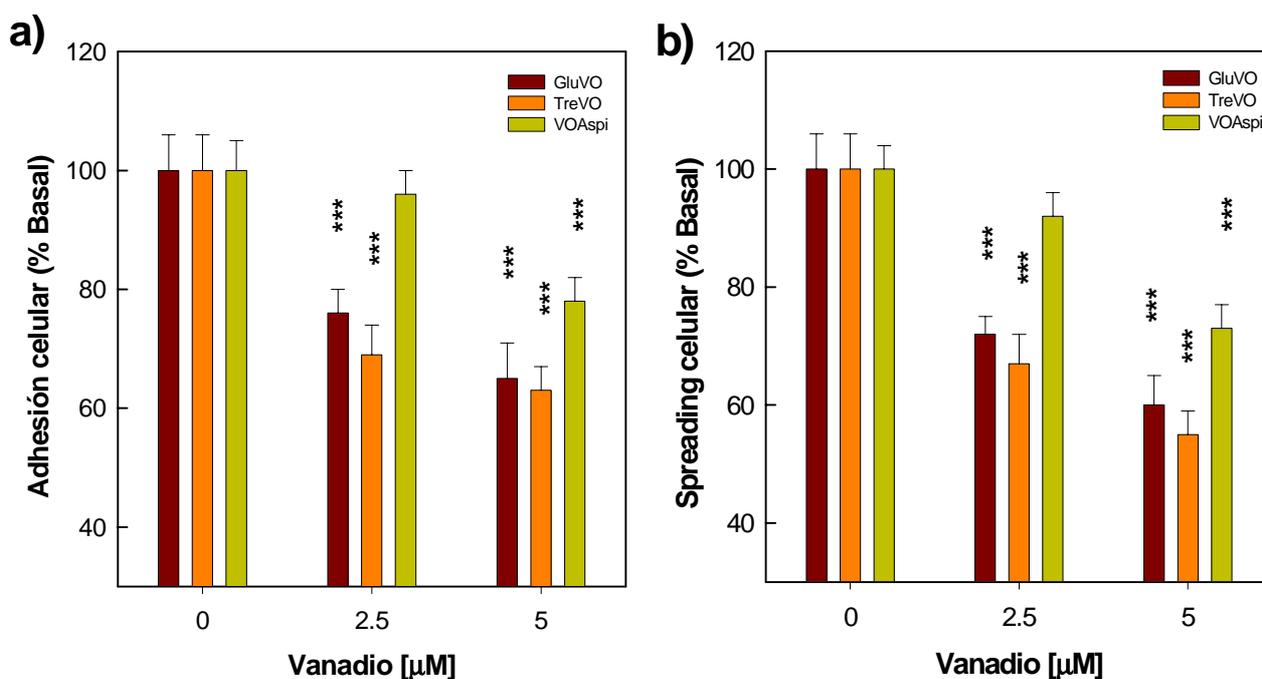


Figura 4.12.- Efecto de los complejos de vanadio sobre la adhesión y el spreading celular: se contó el número de células adheridas (a) y el número de células con spreading (b) por campo de observación, luego de 1 h de incubación con los complejos de vanadio. Los resultados se expresan como porcentaje respecto del basal y representan la media \pm SEM de tres experimentos, *** $p < 0,05$.

GluVO, TreVO y VOAspi, tendrían un efecto citotóxico más marcado en la línea tumoral UMR106, que en los osteoblastos normales MC3T3E1. Por este motivo, decidimos estudiar más específicamente el potencial antitumoral de estos complejos sobre el osteosarcoma UMR106. Para ello, utilizamos diferentes técnicas experimentales que permiten evaluar los procesos de adhesión, migración y capacidad antimetastásica en células en cultivo.

4.3.1.- Ensayos de adhesión celular

Cuando se evaluó el efecto de los complejos de vanadilo sobre la adhesión de células de osteosarcoma a la matriz extracelular, se encontró que estos complejos inhiben la adhesión y el spreading celular en forma dependiente de la dosis (fig 4.12.a y b, respectivamente). El tratamiento de las células

UMR106 con TreVO y GluVO durante 1 h, inhibe aproximadamente un 40 % la adhesión y el spreading celular ($p < 0,05$). En tanto que VOAspi inhibe la adhesión y el spreading alrededor del 25 % respecto del basal ($p < 0,05$).

4.3.2.- Inmunofluorescencia para fibras de estrés

En los procesos de adhesión, es necesario que las fibras de actina se reordenen y polimericen formando las llamadas fibras de estrés. Estas fibras están asociadas a quinasas intracelulares que disparan señales en respuesta al contacto de zonas de adhesión entre la membrana plasmática y la matriz extracelular. La adhesión celular, así como también la proliferación dependen fuertemente de la correcta polimerización de la actina. En este estudio encontramos que en condiciones

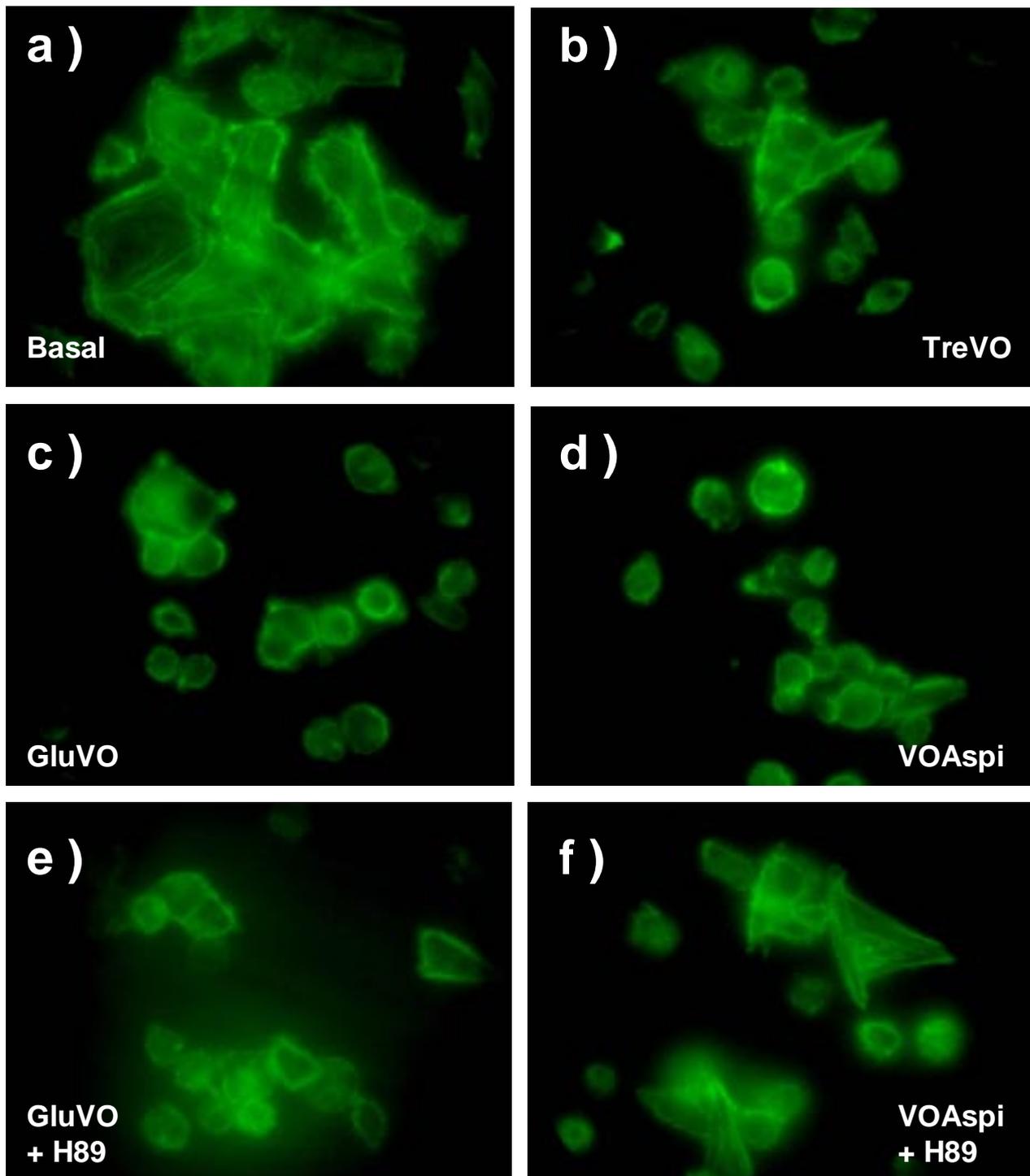


Figura 4.13. Inmunofluorescencia para fibras de estrés: las células UMR106 en condiciones basales (a), tratadas durante 4h con los complejos de vanadio (b - d), GluVO y el inhibidor de PKA (e) ó con VOAspi y H89 (f), fueron teñidas con paloidina - FITC y se observaron por microscopía de fluorescencia. Obj 100x.

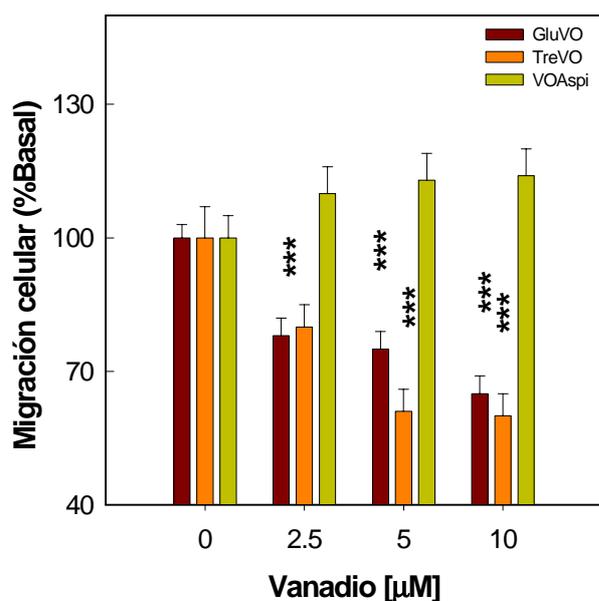


Figura 4.14.- Efecto de los complejos de vanadio sobre la migración celular: se midió la distancia de migración de las células, desde el borde de la herida, luego de 24 h de incubación con los complejos de vanadio en medio completo. Los resultados se expresan como porcentaje respecto del basal y representan la media \pm SEM de dos experimentos, *** p < 0,05.

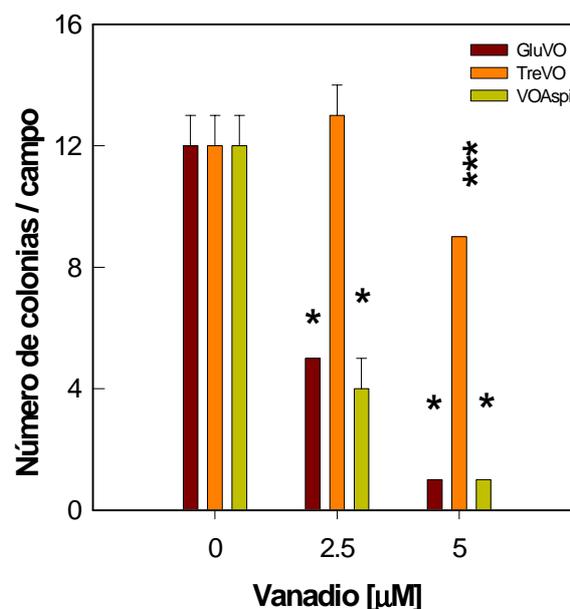


Figura 4.15.- Evaluación de los complejos de vanadio sobre la capacidad metastásica de células UMR106: luego de 10 días de incubación con los complejos de vanadio se contó el número de colonias formadas. Los resultados representan la media \pm SEM de dos experimentos, * p < 0,01, *** p < 0,05.

basales, sin tratamiento con los complejos de vanadio, las fibras de estrés del osteosarcoma UMR106 se forman durante la primer hora de adhesión celular (fig 4.13.a). En esta misma figura puede observarse que en las células que poseen spreading, las fibras de actina atraviesan el citoplasma longitudinalmente, mientras que en aquellas que aún no poseen spreading las fibras se disponen circularmente en el borde de la membrana plasmática. Cuando las células son tratadas con 5 μ M de TreVO (fig 4.13.b) observamos que no existe organización de la actina; en las células que se han adherido pero no han generado extensiones citoplasmáticas, la tinción es difusa a lo largo del citoplasma. Aún en aquellas células que poseen spreading no se

observa la presencia de fibras de estrés. Por otro lado, el tratamiento con 5 μ M de GluVO y VOAspi, inhibe completamente la formación de las fibras de estrés (fig 4.13.c y d). Aún mas, con estos complejos se observa una fluorescencia difusa en los bordes de la membrana plasmática, pero también existen pequeñas zonas donde la fluorescencia es mas intensa. El cotratamiento de las células con los complejos de vanadio y el inhibidor de PKA, H89, genera una reversión parcial del efecto inhibitorio sobre la formación de las fibras de actina (fig 4.13.e,f); sugiriendo que el mecanismo por el cual los complejos de vanadio ejercen este efecto estaría mediado, al menos parcialmente, por PKA.

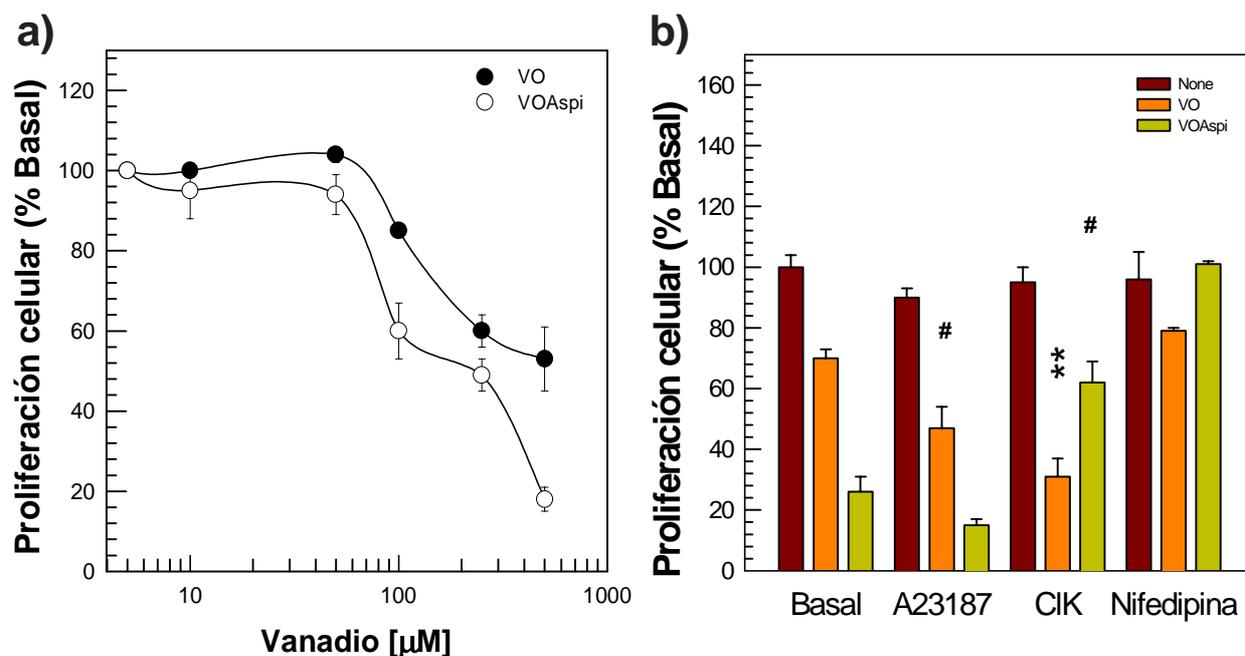


Figura 4.16: Efecto de VOAspi sobre la proliferación de macrófagos RAW264.7: los macrófagos se incubaron 24 h con vanadio (a) ó con vanadio y los inhibidores (b) . Luego la proliferación celular se evaluó por medio del ensayo del cristal violeta. Los resultados representan la media \pm SEM de tres experimentos independientes.

4.3.3.- Efecto de los complejos de vanadio sobre la migración celular

Para evaluar el efecto de los complejos de vanadio sobre la migración celular, se realizó el ensayo de la herida en cultivos confluentes de células UMR106. Cuando se mide la distancia de migración de las células desde el borde de la herida luego de 24 h de incubación, se observa que GluVO y TreVO inhiben la migración celular en forma dosis dependiente (35 ± 4 y 40 ± 5 % respecto del basal, respectivamente), mientras que VOAspi no afecta la capacidad de migración de estas células (fig 4.14).

4.3.4.- Evaluación de la capacidad antimetastásica

La capacidad antimetastásica de los complejos de vanadio(IV) se evaluó por medio del ensayo de unidades formadoras de colonias

(UFC). Este ensayo permite evaluar la capacidad de una célula de reproducirse para formar colonias de crecimiento, eventuales tumores, cuando se somete al tratamiento antineoplásico. Luego de 10 días de tratamiento con $5\mu\text{M}$ de GluVO o VOAspi la formación de colonias se inhibió 92 % respecto del basal ($p < 0,001$, fig 4.15). En las mismas condiciones de ensayo, TreVO sólo fue capaz de inhibir la formación de colonias un 25 % respecto del basal ($p < 0,05$, fig 4.15).

4.4.- Determinación de la acción de VOAspi sobre células relacionadas al tejido óseo

Una de las principales barreras de defensa del hùésped para eliminar células malignas está constituida por fagocitos, tales como los macrófagos. La función de estas

células es la eliminación de células transformadas por mecanismos que involucran la producción de radicales libres con el fin de causar la lisis celular, así como también la fagocitosis de los fragmentos celulares generados o incluso de células apoptóticas. Por este motivo, estudiamos el efecto de VOAspi sobre la viabilidad y activación de células del linaje monocito / macrófago RAW264.7. Se sabe que los AINES modifican la función fisiológica de estas células en procesos patológicos (Goodman y Gilman, 1996), por este motivo, estudiamos el efecto producido por el complejo vanadilo - aspirina.

4.4.1- Ensayo mitogénico

En una primer etapa se estudió el efecto de VOAspi y su compuesto parental vanadilo (VO) sobre la proliferación de células RAW264.7 por medio del ensayo del cristal violeta. Luego de 24 h de cultivo, ambos compuestos inhiben significativamente la proliferación celular en función de la dosis utilizada (fig 4.16.a). Sin embargo, VOAspi resulta mas efectivo para inhibir la proliferación celular ($DE_{50} = 200 \mu\text{M}$) que VO ($DE_{50} = 500 \mu\text{M}$).

Con el fin de evaluar el posible mecanismo de acción de VO y VOAspi sobre los macrófagos RAW264.7, se realizó el ensayo mitogénico en presencia de un ionóforo de calcio ($0,5 \mu\text{M}$ A23187), un despolarizante de la membrana plasmática (40 mM KCl) y un bloqueante de los canales de calcio ($10 \mu\text{M}$ nifedipina). El efecto inhibitorio de $100 \mu\text{M}$ de VO sobre la proliferación celular es potenciado por A23187 ($p < 0,02$) y KCl ($p < 0,01$) (fig 4.16.b). La inhibición de la

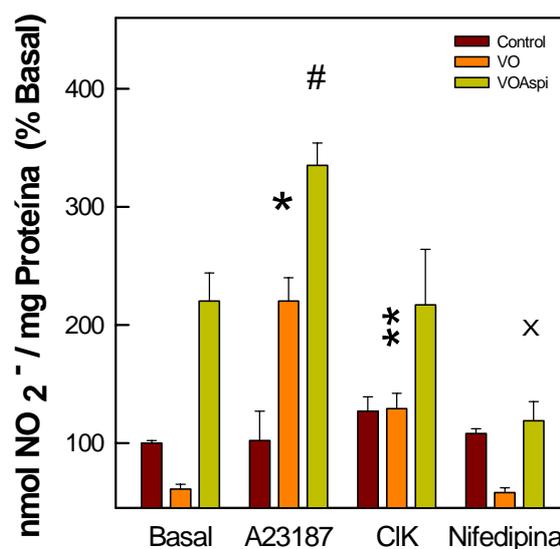


Figura 4.17.- Efecto de VO y VOAspi sobre la producción de óxido nítrico: la producción extracelular de NO se evaluó por medio del ensayo de Griess. Los resultados representan la media \pm SEM, $n = 3$. * $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; x $p < 0,02$; # $p < 0,05$.

proliferación inducida por VOAspi, no es afectada por la adición de $0,5 \mu\text{M}$ de A23187 (fig 4.16.b), pero es parcialmente revertida por el tratamiento con 40 mM de KCl (fig 4.16.b). El bloqueante de los canales de tipo L de calcio, nifedipina, es capaz de revertir completamente el efecto inhibitorio sobre la proliferación causado por $100 \mu\text{M}$ de VOAspi ($p < 0,001$) mientras que no ejerce efecto sobre la inhibición en la proliferación causada por VO (fig 4.16.b).

4.4.2.- Efectos sobre la producción de óxido nítrico

Cuando investigamos la liberación de óxido nítrico (NO) al medio extracelular por los macrófagos, encontramos que VOAspi causa un incremento en la producción de NO de 2,2 veces respecto al basal ($p < 0,001$, fig 4.17), mientras que VO disminuye los niveles de NO (40% respecto del basal, $p < 0,001$, fig 4.17).

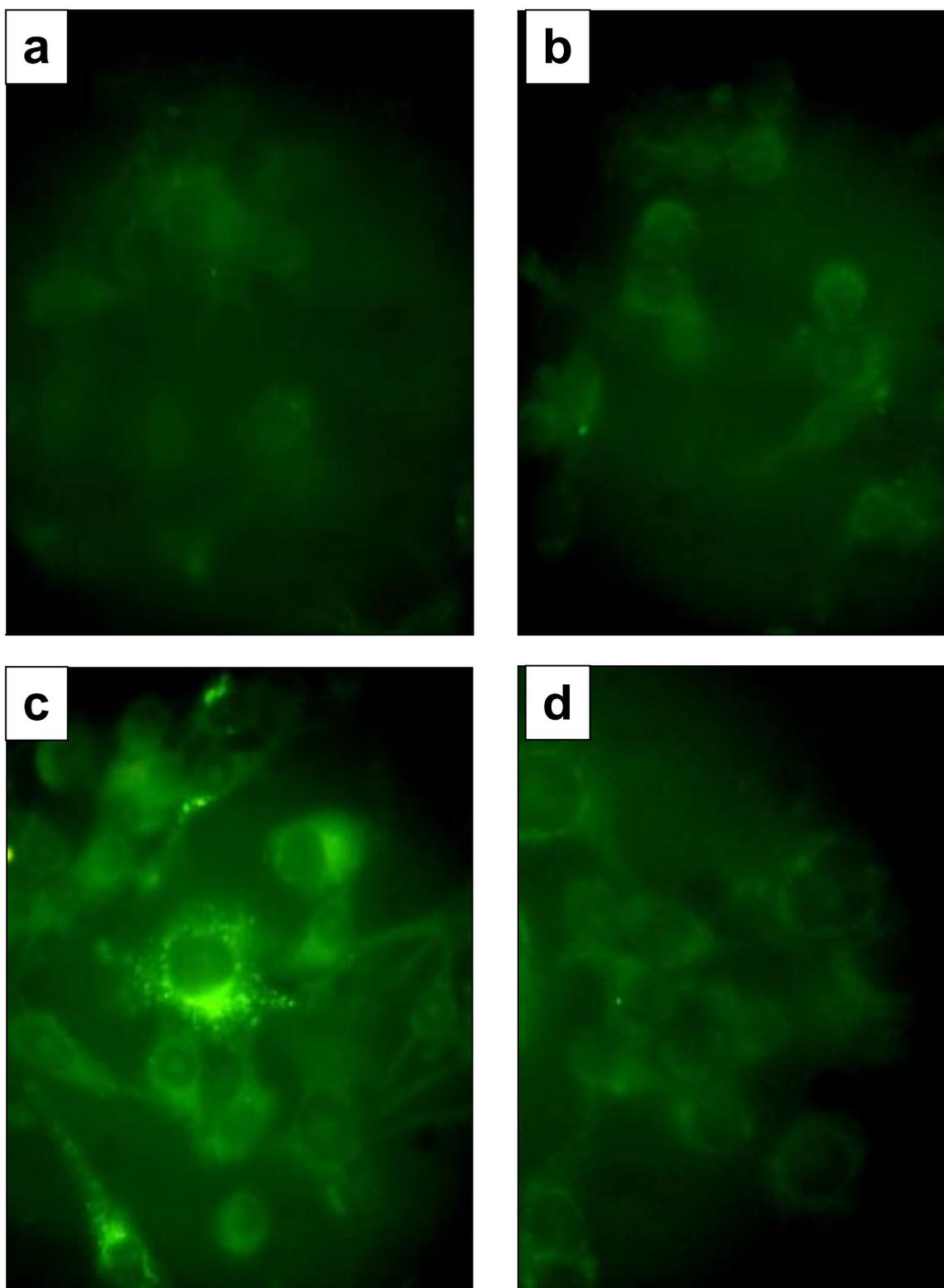


Figura 4.18. Microscopía de fluorescencia de ROS inducidos por VOAspi. Los macrófagos RAW264.7 fueron incubados durante 24 h a 37°C en DMEM (a, condición basal) ó en presencia de VO 100 mM (b), VOAspi 100 mM (c) ó VOAspi + nifedipina (d). Las figuras son representativas de tres experimentos independientes. Obj. 40x

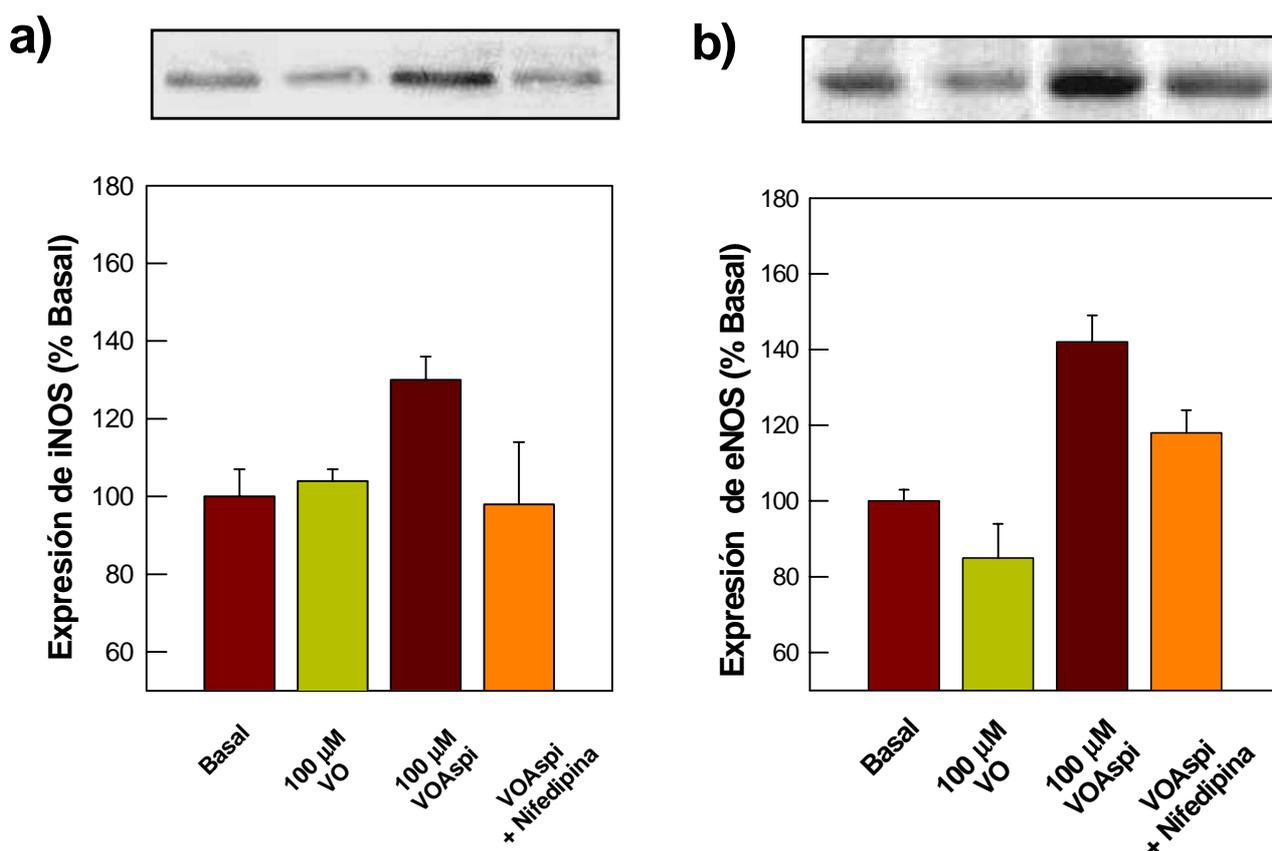


Figura 4.19.- Evaluación de la expresión de sintasas de óxido nítrico por Western blot: se evaluó la expresión intracelular de iNOS (a) y eNOS (b) en lisados celulares, luego de incubar 16 h con los compuestos que se indican en las leyendas de las figuras. Las bandas se cuantificaron y analizaron usando el programa Scion Image. Los resultados representan la media \pm SEM, n = 3.

El incremento en los niveles de NO causado por VOAspi, es potenciado por 0,5 μ M de A23187 ($p < 0,02$), mientras que 40 mM de KCl no causa efecto sobre este parámetro y 10 μ M de nifedipina bloquea completamente la estimulación de la producción de NO ($p < 0,05$, fig 4.17). Por otro lado, la inhibición en la liberación de NO causada por VO, es revertida por el agregado de A23187 ($p < 0,001$) o de KCl ($p < 0,01$) (fig 4.17).

4.4.3.- Oxidación intracelular de dihidrorrodamina

La dihidrorrodamina puede ser oxidada intracelularmente por especies de nitrógeno reactivas (ONOO \cdot), generándose un

producto que presenta fluorescencia verde. Así, en condiciones basales o en cultivos tratados con 100 μ M de VO se observa una débil fluorescencia verde, de aspecto puntilloso en el citoplasma celular (fig 4.18.a y b, respectivamente). Cuando las células RAW264.7 se incuban con 100 μ M de VOAspi durante 24 h, se observa un incremento en la fluorescencia citoplasmática (fig 4.18.c) que es bloqueado por la coincubación con 10 μ M de nifedipina (fig 4.18.d).

4.4.4.- Efecto de los compuestos de vanadio sobre la expresión de NOS endotelial e inducible

El estudio del efecto de los compuestos

de vanadio sobre la expresión de las isoformas de sintasas de NO (NOS) presentes en macrófagos, se realizó por medio del ensayo de Western blot. La incubación con anticuerpos anti – iNOS, revela la expresión de una banda de peso molecular relativo de 130 kDa, cuya expresión se incrementa por la incubación con 100 μ M VOAspi (134 ± 8 % basal, $p < 0,05$) pero no por 100 μ M de VO. El incremento en la expresión de la iNOS resulta bloqueado por 10 μ M de nifedipina (fig 4.19.a). Por otro lado, utilizando un anticuerpo anti – eNOS se detecta la presencia de una proteína de masa relativa 130 kDa. VOAspi causa un incremento en la expresión de la eNOS (142 ± 7 % del basal, $p < 0,001$); efecto que es parcialmente revertido por el tratamiento con 10 μ M de nifedipina (118 ± 6 % basal, $p < 0,05$) (fig 4.19.b). Por otro lado, 100 μ M de VO causa una pequeña inhibición en la expresión de la eNOS, tal como se detecta en el ensayo de Western blot (fig 4.19).

5. Discusión

Estudios llevados a cabo desde finales de 1980 sugieren que el micronutriente vanadio podría considerarse el representante de un nuevo grupo de agentes antitumorales no derivados del platino (Chatterjee y Bisayee 1998). Otros estudios muestran que algunos compuestos de vanadio poseen actividad antitumoral contra diversos tumores murinos, así como también en varias líneas celulares tumorales (Liasko et al 1998; ; El Naggar et al 1998; Narla et al 2001a, 2001b, 2001c; Mukerjee et al 2004). Aún más, algunos de ellos han mostrado que el vanadio podría inhibir la acción cancerígena de diversos agentes químicos (Thompson et al 1984; Chatterjee y Bisayee 1998). En este trabajo de tesis se estudian los posibles efectos antitumorales de dos grupos de complejos de vanadio(IV). Por un lado una serie de complejos cuyos ligandos son antiinflamatorios no esteroideos (AINES) y por el otro, complejos con azúcares simples. Existen dos cuestiones importantes que deben ser analizadas antes de evaluar los efectos de las drogas en modelos biológicos, una de ellas es referente a la disolución del complejo y la otra cuestión se refiere a la estabilidad del complejo, tanto en estado sólido como en las soluciones de trabajo.

El ligando que compleja el centro catiónico de vanadilo va a modificar las propiedades del catión, confiriéndole otras nuevas. Estas propiedades adquiridas dependen fuertemente de las características del ligando (Morinville et al 1998; Narla et al

2000). Nosotros hemos encontrado importantes diferencias en cuanto a la solubilidad de los complejos de vanadilo(IV). En base a estos estudios podemos agrupar los complejos estudiados en: complejos hidrosolubles y complejos solubles en solventes apróticos polares (tabla 4.1). A la primera categoría pertenecen los complejos cuyos ligandos son azúcares simples (glucosa y trehalosa) y el complejo aspirina - vanadilo, mientras que a la segunda pertenecen los complejos con indometacina y diclofenac. GluVO y TreVO son altamente solubles en agua, parcialmente solubles en mezclas hidroalcohólicas e insolubles en solventes de mayor polaridad (etanol y DMSO) (tabla 4.1). Las diferencias de solubilidad en agua y etanol / agua que presentan los complejos GluVO y TreVO entre sí, pueden ser atribuidas a las características de los ligandos. La glucosa es mas soluble en agua que la trehalosa (900 g / l y 687 g / l, respectivamente). Esa pequeña diferencia de polaridad entre los ligandos influencia los complejos. VOAspi es poco soluble en agua, aumentando su solubilidad en la mezcla de etanol / agua y etanol. Sin embargo, este complejo presenta la mayor solubilidad en DMSO. El comportamiento del complejo vanadilo - aspirina podría ser explicado por las características del ligando. La solubilidad de la aspirina en agua es de 10 g / l, así vemos que la complejación con vanadilo no afecta su solubilidad acuosa (Tabla 4.1). Sin embargo, la solubilidad mayor en DMSO podría ser explicada por las

características del complejo. La aspirina compromete su grupo carboxilo en la complejación con el vanadilo, de esta manera puede interactuar más fácilmente con un solvente polar aprótico tal como el DMSO aumentando su solubilidad en este solvente (Tabla 4.1). Por otro lado, los complejos de vanadilo con indometacina y diclofenac son insolubles en agua. Una posible explicación para este hecho es que en ambos complejos, en la esfera de coordinación del vanadilo, se observa la presencia de cadenas carbonadas pertenecientes al butóxido (Williams et al 2005) que conjuntamente con la menor polaridad propia de los ligandos indometacina y diclofenac generarían complejos insolubles en agua. Además, ambos complejos poseen escasa solubilidad en etanol, etanol / agua y DMSO, que una vez más podría asociarse a la estructura poco polar del complejo.

El siguiente paso en el estudio de las propiedades fisicoquímicas de los complejos de vanadilo fue el estudio de la estabilidad de los mismos. Los derivados de vanadio(IV) con azúcares son altamente higroscópicos (Etcheverry et al 1997; Barrio et al 2003); por tal motivo se conservan en estufa a 60 °C; contrariamente los derivados con AINES pueden ser conservados en frascos cerrados y protegidos de la luz, a temperatura ambiente. El estudio de estabilidad de los complejos por espectroscopía IR muestra que los complejos más estables son TreVO y VOAspi (9 semanas) (Tabla 4.2). Mientras que GluVO resulta estable dentro de las 3 semanas de

sintetizado, esta menor estabilidad en estado sólido podría deberse a las propiedades higroscópicas del ligando, glucosa, que se hidrata fácilmente, aún en presencia de la humedad atmosférica. En paralelo se realizaron los estudios de estabilidad en solución. Las soluciones acuosas de los complejos de vanadio son menos estables que las soluciones en DMEM (tabla 4.2 y fig 4.1). Puede establecerse un orden de estabilidad entre los diferentes compuestos, donde los complejos con azúcares presentan menor degradación que aquellos cuyos ligandos son AINES (tabla 4.2). Ordenados en base a sus estabilidades relativas TreVO presenta mayor estabilidad que GluVO y éste mayor que VOAspi (tabla 4.3). Observamos en la tabla que el orden relativo no depende del solvente en el que se realizó el ensayo, sino más bien depende del complejo. GluVO posee una cinética de degradación de orden 1 en agua y de decaimiento exponencial en DMEM, presentando en este medio la mayor estabilidad ($t_{1/2} = 6,86$ h en agua y 12,6 h en DMEM) (tabla 4.2). Para este complejo, este hecho puede explicarse mediante la ley de acción de masas. Éste es un principio químico establecido por Le Chatelier, que predice que el equilibrio de disociación de un complejo se desplazará hacia el lado del complejo (habrá menor disociación) por el agregado de ligando (Vogel 1960). La glucosa, que se halla en alta concentración en el medio de cultivo, impedirá o retrasará la disociación del complejo. Por otro lado, si recordamos que el medio de cultivo es

una mezcla compleja de sustancias, podemos hipotetizar que la diferencia de fuerza iónica respecto a la solución acuosa de complejo influencia su disociación resultando en un incremento en la estabilidad del mismo. Existen estudios que indican que los complejos de vanadio con diversos ligandos tienen una estabilidad relativamente baja en soluciones acuosas, sin embargo, las propiedades biológicas de los complejos dependen del ligando empleado y son diferentes a la del metal, el ligando libre e incluso difieren de la acción de los productos de descomposición (Narla et al 2000; Gosh et al 2000). Muchas veces las acciones biológicas están determinadas por interacciones con proteínas o lípidos de los sistemas biológicos que estabilizan los complejos e incluso facilitan su transporte dentro de las células. Más aún, en algunos casos se ha establecido incluso que la aparente labilidad de los complejos y su capacidad de hidrolizarse son requisitos indispensables para retener los efectos farmacológicos (Morinville et al 1998). Kanamori y su grupo han realizado estudios de estabilidad de diferentes complejos de vanadio(V). Paradójicamente, cuando analizaron las acciones farmacológicas de los complejos, aquellos cuya estabilidad era menor en soluciones acuosas de pH fisiológico, poseían mayor acción farmacológica (Kanamori et al 2001). Por otro lado, no siempre es fácil extrapolar los ensayos in vitro a los ensayos in vivo. Si bien los ensayos in vitro tienen utilidad para estimar

las propiedades del complejo, cuando esos complejos son puestos en contacto con sistemas vivos, existen interacciones que determinan las acciones farmacológicas de las drogas, cuyos mecanismos no han podido ser claramente identificados (Gosh et al 2000; Narla et al 2000; Harding y Modski 2000). Por otro lado, es claro que el ligando es capaz de modificar las propiedades del vanadilo. En este sentido, estudios previos realizados por nuestro grupo han demostrado efectos directos del vanadilo(IV) sobre la proliferación de osteoblastos en cultivo. El vanadilo inhibe la proliferación e induce transformaciones morfológicas de las células MC3T3E1 en todo el rango de concentraciones estudiado (5 - 100 μM) (Sállice et al 1999); mientras que en las células UMR106 el vanadilo estimula la proliferación celular en el mismo rango de concentraciones (Cortizo y Etcheverry 1995). Estos resultados son diferentes a los obtenidos para algunos de los complejos estudiados en este trabajo de tesis, dado que GluVO, TreVO y VOAspi, producen citotoxicidad en células óseas en cultivo. Para los complejos con glucosa (GluVO) y trehalosa (TreVO), estos efectos son mas marcados en las células tumorales UMR106 que en los osteoblastos normales MC3T3E1 ($p < 0,01$) (fig 4.3). Sin embargo, la eficacia para inhibir la proliferación del complejo vanadilo - aspirina, no presenta diferencias entre ambas líneas celulares (fig 4.3). Además, en base a estos resultados hemos podido establecer un orden de potencia y eficacia respecto a la acción inhibitoria de la

proliferación ejercida por estos compuestos. Como medida de la potencia de las drogas para ejercer el efecto inhibitorio de la proliferación empleamos la DE_{50} ; mientras que la eficacia está dada por el % máximo de inhibición de la proliferación. Así, establecimos el siguiente orden de potencias relativas para las células tumorales UMR106: GluVO > VOAspi > TreVO, y para los osteoblastos normales: TreVO > GluVO > VOAspi (tabla 4.3). Como vemos, este orden depende de la línea celular. Sin embargo, la eficacia relativa (% máximo de inhibición de la proliferación) es independiente de la línea celular y resulta ser: VOAspi > GluVO > TreVO (tabla 4.3).

Por otro lado, los complejos de vanadio(IV) con diclofenac e indometacina, DicVO e IndoVO respectivamente, causaron un incremento en la proliferación de las células UMR106. En cambio en los osteoblastos no transformados MC3T3E1, IndoVO estimula la proliferación, mientras que DicVO inhibe la proliferación de este tipo celular (fig 4.4). Si bien estas concentraciones son relativamente mas altas que las concentraciones séricas que se alcanzan cuando se tratan ratas con 50 mg / día de sulfato de vanadilo (10 - 15 μ M) (Shechter 1995; Thompson et al 1998), debido a que el vanadio se acumula en el hueso, puede alcanzar allí concentraciones relativamente mas altas (26,4 μ g / g de peso seco) (Yuen et al 1993). Así, las dosis encontradas en el presente estudio (> 16 μ M) son consistentes con las concentraciones alcanzables in vivo en el

microambiente óseo. Por otro lado, la diferencia encontrada en los efectos proliferativos de los complejos sobre las células UMR106 es lo que nos condujo a profundizar los estudios para GluVO, TreVO y VOAspi, con el fin de determinar su potencial acción antitumoral.

Cuando evaluamos la morfología celular luego de incubar las células de osteosarcoma durante 16 h con 100 μ M de estos complejos de vanadio(IV), encontramos que los tres compuestos inducen transformaciones morfológicas marcadas, que podrían involucrar mecanismos proapoptóticos. Esta observación se basa en la aparición de características morfológicas clásicas de este proceso, tales como condensación nuclear y citoplasmática, condensación de la cromatina sobre los bordes de la membrana nuclear, presencia de burbujas en la membrana plasmática, así como también la existencia de cuerpos apoptóticos. Además se observa la pérdida de los contactos intercelulares (fig 4.2.a - d). En los osteoblastos no transformados MC3T3E1, las alteraciones morfológicas son menos marcadas, observándose aumento en la vacuolización del citoplasma luego del tratamiento con los complejos de vanadio, el núcleo pierde su redondez característica; y luego del tratamiento con TreVO y VOAspi su disposición es excéntrica (fig 4.2.e - h). Se sabe que en condiciones fisiológicas y en presencia de superóxido, el vanadio(IV) se oxida a vanadio(V) en un ciclo de reacciones

del tipo Fenton - Haber Weiss, y se ha propuesto que sería el vanadio(V) el promotor e inductor de las transformaciones biológicas observadas en cultivos de células de mamíferos (Ding et al 1999). Otras hipótesis sugieren que estas transformaciones son causadas por la producción de ROS generadas por dos posibles mecanismos: el primero de ellos involucra el estrés oxidativo generado directamente en el proceso de reducción del metal, y el segundo mecanismo estaría mediado por p53, una proteína implicada en la regulación del ciclo celular (Ye et al 1999a). Por otro lado, existen estudios que muestran que diversos complejos de vanadio causan apoptosis. La apoptosis es un proceso de muerte celular programada, que está involucrada en muchos procesos fisiológicos. En este evento la muerte celular es iniciada y completada de manera ordenada, a través de la síntesis y / o activación de productos génicos necesarios para la destrucción celular. Sin embargo, la regulación inapropiada de este proceso podría jugar un rol importante en muchos procesos patológicos, entre ellos el cáncer. Los radicales libres directamente o indirectamente, a través del daño mitocondrial, están involucrados en el proceso apoptótico. Así, los agentes antioxidantes pueden retardar o impedir la apoptosis inducida por estrés oxidativo (Evangelou 2002; Ye et al 1999 a y b). Para confirmar los indicios de apoptosis antes descritos, utilizamos el ensayo específico con anexina V / yoduro de propidio (Varga et al

1998). Este estudio permite detectar células en diferentes estadios del proceso apoptótico. Cambios tempranos en la estructura de la membrana plasmática, tales como la exposición de fosfatidilserina, son detectados a través de la tinción con anexina V, mientras que cambios estructurales tardíos, como por ejemplo apertura de poros en la membrana plasmática, son detectados con el colorante fluorescente yoduro de propidio, ya que este colorante no difunde a través de la membrana plasmática intacta pero sí lo hace cuando la membrana está dañada. El estudio de apoptosis celular muestra que los complejos de vanadio GluVO, TreVO y VOAspi estimulan la apoptosis celular en porcentajes que dependen de la dosis utilizada así como también de la línea celular (fig 4.6)

Numerosos estudios indican que el vanadio y sus derivados incrementan la producción de radicales libres, generando estrés oxidativo (Byczowski y Kulkarni 1998; El - Naggat et al 1998; Ye et al 1999 (a y b); Shi et al 1999; Ding et al 1999; Evangelou 2000). Se denomina estrés oxidativo al proceso fisiopatológico donde el balance intracelular entre oxidantes y antioxidantes exógenos así como también endógenos, se halla desplazado hacia los oxidantes dejando a las células desprotegidas frente al ataque de radicales libres (Byczowski y Kulkarni 1998). Estos radicales libres son átomos o moléculas que derivan de químicos prooxidantes, o indirectamente del estímulo de las funciones naturales en células aeróbicas

y tienen la característica de poseer uno o más electrones desapareados, hecho que les confiere alta reactividad química. El estrés oxidativo inducido químicamente puede causar alteraciones de los mecanismos antioxidantes en las estructuras celulares diana que conducirían a la peroxidación lipídica dando como resultado injuria celular (Byczowski y Kulkarni 1998). En este trabajo se estudiaron la producción intracelular de ROS y la peroxidación lipídica (TBARS). Encontramos que los tres complejos son capaces de incrementar tanto los niveles de ROS como los de TBARS en ambas líneas celulares. Sin embargo, la eficacia con que fueron estimulados estos parámetros depende tanto de la línea celular como del complejo estudiado. Los niveles de ROS se incrementaron con mayor eficiencia en las células UMR106 luego del tratamiento con los complejos de vanadio ($p < 0,01$) (fig 4.7.a), mientras que en las células MC3T3E1 el incremento de ROS fué débilmente estimulado por los tres complejos estudiados (fig 4.7.b). Además, si se compara la producción de ROS entre líneas celulares, en la línea osteoblástica normal el incremento es menor que en la línea tumoral. En la figura 4.8 puede observarse que los tres complejos estimulan la peroxidación lipídica, siendo GluVO el complejo que incrementa los valores de TBARS en forma más eficiente en ambas líneas celulares (fig 4.8), mientras que TreVO y VOAspi causan un incremento mayor en la producción de TBARS en los osteoblastos normales

MC3T3E1 (fig 4.8). En las dos líneas celulares se observa un comportamiento dosis - dependiente en la producción de radicales libres, así como también en el incremento de TBARS (fig 4.7 y 4.8, respectivamente). Si bien TBARS mide la peroxidación lipídica, este método carece de selectividad para determinar si la lipoperoxidación ocurrió en las membranas de las organelas o en la membrana plasmática. Sobre estos dos puntos se pueden realizar distintas especulaciones, ya que puede suponerse que el incremento en la producción de ROS intracelular causó el daño a las estructuras lipídicas, pero no puede descartarse una interacción local directa de los compuestos con la membrana plasmática cuando las células son expuestas a los complejos de vanadio (Upreti 1995; Morinville 1998; Ye et al 1999; Narla et al 2001c). Esta interacción directa con las membranas celulares podría alterar substancialmente la estructura y función de esta estructura, causando daños que podrían conducir a la muerte celular (Upreti 1995). La primer hipótesis se halla parcialmente avalada por el aumento en los niveles de DHR y la producción de TBARS en las células de osteosarcoma para los tres complejos estudiados. Sin embargo, la interacción directa de los complejos de vanadio con la membrana plasmática no puede ser totalmente descartada ya que estudios previos han mostrado que el vanadio es capaz de interaccionar con membranas lipídicas artificiales (liposomas) (Bakas et al 2001). Los

radicales libres generados también pueden causar alteraciones en la función mitocondrial como por ejemplo disminuir la función de algunos sistemas enzimáticos o disminuir el potencial de transmembrana (Huang et al 2000). Existen observaciones previas que indican que el vanadio se acumula en la mitocondria intacta, específicamente en el espacio intermembrana, bloqueando la transferencia de electrones entre el citocromo c_1 y el citocromo c , sin afectar significativamente la fosforilación oxidativa. Por otro lado, cuando la mitocondria está dañada, el vanadio puede entrar en un ciclo redox que puede generar radicales libres (Byzckowski y Kulkarni 1998). En nuestro estudio encontramos que se hallan alteradas tanto la función de las oxidasas mitocondriales como también el potencial de transmembrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) (fig 4.9 y 4.11, respectivamente). La funcionalidad de la mitocondria se halla significativamente alterada en ambas líneas celulares, luego del tratamiento con los compuestos de vanadio. Para TreVO y VOAspi este efecto es independiente de la dosis, la línea celular o el complejo (fig 4.9); mientras que para GluVO se encuentra mayor inhibición de la función mitocondrial en las células de osteosarcoma que en los osteoblastos normales, aunque en esta última línea celular, el efecto es independiente de la dosis (fig 4.9). Debido a la pérdida de la funcionalidad de la mitocondria, se observa la disipación del $\Delta\Psi_m$. El fuloróforo rodamina 123 es un catión lipófilo,

que se acumula en la mitocondria funcional normal (Johnson et al 1981; Cho et al 2000). Cuando la mitocondria está intacta, la rodamina se acumula en ella, observándose una fluorescencia puntiforme de baja intensidad. Esto se debe al “quenching” existente por la alta concentración de rodamina en la organela. Sin embargo, cuando existe algún tipo de daño que altera el $\Delta\Psi_m$, este catión puede difundir hacia el citoplasma aumentando la intensidad de la fluorescencia observada, que por otro lado posee ahora una distribución mas difusa (Kindmark et al 2001). Este efecto se pone en evidencia al observarse un incremento en la fluorescencia citoplasmática luego del tratamiento con los compuestos de vanadio. Esta fluorescencia es además mas difusa luego del tratamiento con los complejos de vanadio que en la condición basal (fig 4.11). Se ha encontrado que los radicales libres pueden causar daño oxidativo en lípidos mitocondriales, en particular en la cardiolipina, causando así daños irreparables en la función mitocondrial (Zhang et al 2002). Por otro lado, existen antioxidantes endógenos, tales como el glutatión y enzimas encargadas de la detoxificación de radicales libres (catalasa, superóxido dismutasa, tiorredoxina, etc). Cuando los radicales libres producidos han sobrepasado la capacidad de neutralización de estos antioxidantes, se produce estrés oxidativo (Shi et al 1999). Sin embargo, también existen antioxidantes exógenos que agregados al sistema experimental pueden prevenir o revertir el estrés oxidativo inducido por metales (Valko

et al 2005). Nosotros utilizamos como antioxidantes exógenos una mezcla de vitaminas C y E. La vitamina E constituye el antioxidante liposoluble mas importante en sistemas biológicos; posee la capacidad de inhibir la peroxidación lipídica al interactuar con los radicales peroxilo mas rápidamente que éstos con los lípidos y proteínas de las membranas plasmáticas (Valko et al 2005; Matés et al 2000) . Se sabe que el glutatión y la vitamina C son antioxidantes hidrosolubles de alta eficiencia en sistemas vivos (Valko et al 2000). La vitamina C puede oxidarse por donación de un electrón al radical ascorbilo. Este radical posee muy baja reactividad química, y es ésta la esencia de su acción antioxidante (Valko et al 2005). El uso combinado de vitaminas E y C como antioxidantes se fundamenta en que esta última contribuye al reciclado de la vitamina E, incrementando así la acción antioxidante de cada una (Matés et al 2000; Valko et al 2005). Existen estudios que indican que el incremento de los radicales libres causa daño mitocondrial y que éste es revertido por el tratamiento con vitaminas (Morinville et al 1998). En este trabajo encontramos que el daño mitocondrial parecería estar directamente asociado a la producción de radicales libres, ya que el tratamiento con una mezcla de vitaminas E y C logró revertir el efecto inhibitorio de la función mitocondrial en ambas líneas celulares (fig 4.10). Como ya hemos mencionado, la producción de radicales libres tanto en el citosol como en la mitocondria

resulta en daño de ésta última; esto puede conducir a la liberación del citocromo c que es capaz de activar caspasas, causando mayor daño mitocondrial y la activación de sustancias celulares que conducen a la apoptosis (Byzckowski y Kulkarni 1998; Huang et al 2000; Evangelou 2002).

Los resultados anteriores, tomados en conjunto, nos permiten suponer que los complejos GluVO, TreVO y VOAspi ejercen acciones antitumorales sobre las células de osteosarcoma. La invasión celular y la metástasis es una secuencia de múltiples eventos que requieren la integración de factores específicos del huésped y factores dependientes del tumor (Alonso et al 1996). Es deseable que los agentes antineoplásicos no solamente disminuyan la masa tumoral, sino que también inhiban las propiedades metastásicas de las células tumorales. Por lo tanto, el paso siguiente en el estudio de estos compuestos fué evaluar el efecto de los mismos sobre tres eventos característicos de las células tumorales: adhesión, capacidad de migración y habilidad para formar colonias aisladas de crecimiento celular. Estos eventos confieren a las células tumorales la capacidad de generar metástasis en sitios distantes al lugar primario de generación del neoplasma. Nuestros resultados indican que los tres complejos inhiben significativamente la adhesión y el spreading celular (fig 4.12). Además, los estudios de inmunofluorescencia para actina mostraron que existe alteración del citoesqueleto de actina (fig 4.13). En esta

figura se evidencia que no se han formado las fibras de estrés necesarias para la interacción entre la matriz extracelular (MEC) y las células. La matriz extracelular contiene información que regula la morfología celular, la organización citoesquelética, la motilidad celular, la expresión génica, la proliferación y la supervivencia celular (Damsky 1999). Además de las interacciones entre la MEC y las células, las interacciones intercelulares son necesarias para bloquear el proceso apoptótico (Bissel y Nelson 1999). Estas interacciones se llevan a cabo a través de proteínas transmembrana conocidas como integrinas. La familia de las integrinas se halla directamente relacionada con la interacción entre las células y la matriz extracelular. La habilidad de las integrinas para actuar como receptores de adhesión se halla en parte gobernada por la interacción de los dominios citoplasmáticos de estas proteínas transmembrana con el citoesqueleto de actina (Barry y Critchley 1994). La interacción de la caderina con el citoesqueleto de actina es esencial para su función en la adhesión celular. Sin embargo, la fosforilación tanto de β -catenina como de la caderina reduce la interacción de ésta con el citoesqueleto (Kusumi et al 1999). Estudios previos indican que tanto el vanadilo como el vanadato y pervanadato, alteran la polimerización de la actina; sin embargo, estos estudios muestran que existe un incremento en la formación de fibras de estrés (Cortizo y Kreda 1996; Nobes et al 1996; Ozawa y Kemler 1998;

Schoenwalelder y Burridge 1999). Estos autores sugieren que la inhibición de las fosfatasas y el consecuente incremento en la fosforilación, necesaria para la polimerización de la actina, son los mecanismos por los cuales ocurre el incremento en la formación de fibras de estrés. Los compuestos empleados en estos estudios, vanadato, vanadilo y sus derivados, son por un lado, inhibidores más potentes de las fosfatasas que los complejos estudiados en este trabajo de tesis, y por el otro las concentraciones empleadas en estos estudios son mayores que las utilizadas aquí (50 μ M y 5 μ M respectivamente) (Cortizo y Kreda 1996; Nobes et al 1996; Ozawa y Kemler 1998; Schoenwalelder y Burridge 1999). Por otro lado, estos autores han trabajado con células luego de 24 h de plaqueadas. Estos hechos podrían tal vez explicar la aparente discrepancia que existe entre los resultados presentados en este trabajo de tesis y los obtenidos previamente por nosotros y otros grupos. Tampoco pueden descartarse que existan otros mecanismos implicados en la disminución de la polimerización de la actina inducida por GluVO, TreVO y VOAspi. Entre estos mecanismos cabe destacar el rol de la proteína quinasa A (PKA) en la disolución de las fibras de estrés (Howe 2004). En nuestro estudio encontramos que el efecto inhibitorio de la formación de las fibras de estrés inducido por los complejos de vanadio, fué parcialmente revertido por H89, un inhibidor de la PKA (fig 4.13), sugiriendo de este modo que esta enzima jugaría algún

papel en la organización de la arquitectura celular y por lo tanto en la adhesión celular.

La migración celular juega un importante rol en procesos fisiológicos, así como también en fenómenos patológicos tales como la invasión celular al tejido circundante y la formación de metástasis (Hauck et al 2002). El estudio de la migración celular se realizó por medio del ensayo de la herida. Encontramos que la movilidad celular se halla significativamente disminuída luego del tratamiento con GluVO y TreVO ($p < 0,05$); sin embargo, VOAspi no afecta este parámetro (fig 4.14). Durante la migración celular *in vitro*, los receptores de membrana plasmática para la MEC se agrupan en estructuras especializadas denominadas adhesiones focales. Este agrupamiento está relacionado con la fosforilación de un amplio espectro de proteínas citosólicas, entre las cuales predomina la quinasa de adhesión focal (FAK). La FAK regula el ciclo de ensamblaje y desensamblaje de los contactos focales durante la migración celular por medio de la regulación del citoesqueleto de actina. Sin embargo, la autofosforilación de las FAK depende de la integridad del citoesqueleto de actina (Wasseler y Shur 2000). Además, se sabe que si bien la fosforilación de las FAK es un evento temprano en la adhesión celular que es importante para la formación y ensamblaje de las estructuras de adhesión focal, se halla invariablemente precedida por la reorganización de la actina (Vepa et al 1999). Tanto la autofosforilación de las FAK como su

localización intracelular es crucial para muchos de sus roles fisiológicos, entre los cuales se incluyen el spreading celular, la migración celular, la proliferación celular y la inhibición de la apoptosis (Ben Mahdi et al 2000). En la motilidad celular se halla implicada también la PKA. Esta quinasa tiene un rol dual en la migración celular. Cuando los niveles de PKA son bajos, la migración celular se halla estimulada, mientras que la sobreactivación de esta enzima está ligada a una inhibición de la migración celular (Howe 2004). Chintala et al han demostrado que en células tratadas con vanadato y óxido de fenil arsina, dos inhibidores de fosfatasas de fosfotirosinas, el incremento en los niveles de proteínas fosforiladas en tirosina correlacionaban inversamente con los niveles de expresión de la quinasa de adhesión focal (Chintala et al 1999). Por otro lado, estos mismos autores encontraron que el tratamiento con vanadato inhibía la polimerización de la actina, así como también disminuía el spreading, la migración y la invasión celular (Chintala et al 1999). Estos resultados sugieren, al igual que los presentados en este trabajo de tesis, que la alteración del citoesqueleto inducida por el vanadio inhibiría la adhesión y el spreading celular, así como también la capacidad de migración celular.

Anteriormente hemos mencionado que del correcto ensamblaje de las fibras de actina depende la supervivencia y proliferación celular. En este trabajo estudiamos la supervivencia celular por medio del ensayo de

formación de colonias. Hemos encontrado que los tres complejos de vanadilo(IV) inhiben la formación de colonias (fig 4.15). Este ensayo es un ensayo sencillo in vitro que permite también evaluar la capacidad metastásica de las células tumorales, ya que en todo proceso metastásico, unas pocas células colonizarán sitios distantes para proliferar y generar en consecuencia nuevos tumores que son llamados metastásis. Los resultados obtenidos en esta parte del trabajo nos permiten decir que los tres complejos estudiados son buenos candidatos para inhibir los procesos metastásicos de células tumorales.

En determinadas situaciones patológicas, tales como las metástasis óseas de ciertos cánceres, las células fagocitarias del sistema inmune, en particular los macrófagos, juegan un papel importante ya que pueden asociarse con los osteoblastos para generar osteoclastos que finalmente conducen a la resorción ósea (Yoneda 2003; Yin et al 2005). En este contexto, en el tejido esquelético, donde el vanadio se acumula in vivo, se pueden ejercer efectos adicionales sobre diferentes células relacionadas al hueso, tales como los macrófagos y / u osteoclastos. Por tal motivo, en la última parte de este trabajo de tesis, investigamos el efecto de VOAspi sobre una línea celular derivada de monocitos / macrófagos, RAW264.7. Encontramos que tanto el VOAspi, como su compuesto progenitor vanadilo(IV) causan efectos citotóxicos en esta línea celular, en concentraciones similares a las dosis tóxicas encontradas para las líneas

osteoblásticas (fig 4.16.a).

Desde el comienzo del estudio del vanadio se demostró que tanto el vanadilo como el vanadato podían interactuar e inhibir ATPasas tales como la Na^+ / K^+ y $\text{Ca}^{++} / \text{Mg}^{++}$ ATPasas. Además se sabe que estos compuestos son potentes inhibidores de fosfatasa de tirosina (Nechay 1984). Subsecuentemente, distintos segundos mensajeros podrían alterarse debido a la presencia de vanadio, modulando eventos clave. Así, investigamos el posible compromiso del calcio en la toxicidad inducida en los macrófagos por medio del uso de diferentes agentes. Se observó que el efecto inhibitorio del VO en el crecimiento de los macrófagos fue incrementado por el aumento del flujo de calcio tanto con el ionóforo A23187 como con el depolarizante de la membrana KCl que estimula la entrada de calcio y no fue inhibido por el bloqueante de canales tipo L de calcio, nifedipina (fig 4.17.b). Estas observaciones sugieren que la entrada de calcio puede ser un mecanismo indirecto a través del cual el VO puede ejercer su acción citotóxica sobre las células RAW264.7. Contrariamente, VOAspi afectó el crecimiento celular en forma dependiente de los canales tipo L de calcio, esta conclusión se alcanza por el hecho de que la nifedipina o la despolarización de la membrana pudieron revertir la toxicidad inducida por VOAspi. Estos datos sugieren que el flujo de calcio mediado por un canal de calcio tipo L podría estar involucrado en la toxicidad inducida por VOAspi en este tipo celular.

Se sabe que el óxido nítrico afecta marcadamente la homeostasis del calcio influenciando la liberación de calcio desde lugares de almacenamiento intracelular y por su influjo a través de canales de la membrana plasmática (Clementi 1998). Se ha reportado que el NO influencia varios canales iónicos, incluido el Cav1 (tipo L) (Grassi et al 2004). Con el fin de investigar el rol de la producción de NO en los efectos inducidos por vanadio en los macrófagos, evaluamos los niveles de de NO en el medio de cultivo en condiciones basales y luego del tratamiento con vanadio. Encontramos que VOAspi induce un incremento significativo en los niveles de NO , un efecto que fué suprimido por el tratamiento con nifedipina y potenciado por el ionóforo de calcio A23187 (fig 4.17). Este efecto fué en paralelo con la prueba de oxidación de DHR por peroxinitritos, indicando el potencial para el incremento local de peroxinitritos en células tratadas con VOAspi. De acuerdo con la producción de NO dependiente de VOAspi, la incubación de los macrófagos con este derivado del vanadilo y con nifecipina suprimió la fluorescencia intracelular del producto de oxidación de la DHR. Sin embargo, un mecanismo de acción diferente fué observado para el vanadilo. Este catión inhibió significativamente la producción de NO. Este efecto ha sido previamente descrito por otros autores, aunque sus experimentos se llevaron a cabo en macrófagos estimulados con INF- γ / LPS (Tsuji y Sakurai 1996). En este trabajo, los autores sugieren que la inhibición de la

producción de NO fué probablemente ejercida por la NOS inducible. Se ha mostrado recientemente que la inhibición de la producción de NO inducida por VO en anillos de arteria pulmonar está mediada por la fosforilación dependiente de PKC en residuos de treonina de la eNOS (Li et al 2004). Sin embargo, los mecanismos moleculares por los cuales el VO ejerce estos efectos permanecen poco claros. En nuestros estudios, mostramos que la inhibición en la producción de NO fué revertida por el ionóforo A23187 y por la despolarización de la membrana plasmática, pero no por nifedipina. Además, no se detectó incremento en los niveles de oxidación de DHR en células tratadas con VO, sugiriendo que este metal no induce la producción de peroxinitritos.

La producción de NO es dependiente de dos enzimas presentes en los macrófagos, la isoforma endotelial y la inducible de NOS. Con el fin de investigar la expresión de ambas enzimas en los macrófagos tratados con VO o VOAspi, realizamos el ensayo de Western blot. Observamos que aunque VO no altera la expresión de ninguna de las isoformas (eNOS e iNOS), los macrófagos tratados con VOAspi incrementaban de manera significativa los niveles de ambas enzimas (fig 4.19). Este efecto fué inhibido por la coincubación de VOAspi y nifedipina, sugiriendo el rol de los canales de calcio tipo L en el mecanismo por el cual este derivado de vanadio induce la expresión de eNOS y de iNOS.

En conclusión, hemos encontrado que

los complejos de vanadio causan acciones citotóxicas que conducen a la inhibición de la proliferación celular; este efecto podría estar mediado por incremento en los niveles de ROS y de peroxidación lipídica (TBARS), que conducirían a una disminución de la función mitocondrial con la subsecuente inducción de apoptosis en las células tratadas con estos complejos. Además, los complejos estudiados ejercerían acciones antimetastásicas al inhibir la adhesión / spreading celular, la migración y clonogenicidad de las células en cultivo. Por otro lado, el estudio de VOAspi sobre macrófagos en cultivo reveló que este compuesto es capaz de activar este tipo celular, estimulando la producción de NO por un mecanismo aparentemente mediado por NOS y calcio. Si bien estos estudios muestran una posible aplicación de GluVO, TreVO y VOAspi como agentes útiles para el tratamiento antineoplásico, aún faltan estudios *in vivo* que corroboren las observaciones presentadas en este trabajo de tesis.

6. Conclusiones

- ✎ Se sintetizaron e identificaron cinco complejos de vanadilo(IV) con los ligandos glucosa (GluVO), trehalosa (TreVO), aspirina (VOAspi), indometacina (IndoVO) y diclofenac (DicVO).
- ✎ Los estudios de solubilidad muestran que la naturaleza del ligando influencia las propiedades de solubilidad del complejo, ya que los complejos cuyos ligandos son hidrosolubles (GluVO y TreVO) presentan mayor solubilidad en agua, mientras que aquellos cuyos ligandos son polares, pero que al complejarse comprometen los grupos con posibilidad de formar enlaces de hidrógeno (VOAspi, IndoVO y DicVO), poseen menor solubilidad en solventes próticos tales como agua, etanol ó sus mezclas.
- ✎ Los estudios de estabilidad en fase sólida muestran que TreVO y VOAspi presentan una estabilidad de aproximadamente dos meses, mientras que GluVO permanece sin alteraciones durante 3 semanas.
- ✎ El ensayo de estabilidad en solución muestra que GluVO, TreVO y VOAspi poseen menor estabilidad en agua que en medio de cultivo.
- ✎ Los ensayos mitogénicos indican que los complejos con glucosa, trehalosa y aspirina resultan citotóxicos para las tres líneas celulares. Sin embargo, existen diferencias en los parámetros farmacológicos (potencia y eficacia) dependiendo del complejo estudiado y la línea celular empleada.
- ✎ Luego de 16 h de tratamiento con los complejos de vanadilo(IV), la morfología de las células UMR106 se altera, observándose características propias de la apoptosis tales como condensación nuclear y citoplasmática, y cromatina condensada sobre los bordes de la membrana nuclear.
- ✎ Nuestros estudios sugieren que los procesos citotóxicos de los complejos de vanadio estudiados estarían mediados por la generación de ROS y RNS, dado que la mezcla de vitaminas E y C logró revertir parcialmente estos efectos.
- ✎ GluVO, TreVO y VOAspi inhiben procesos implicados en la carcinogénesis, tales como la adhesión y el spreading celular, así como también la migración y la

clonogénesis (capacidad de formar colonias de crecimiento celular).

-  Por otro lado, los mecanismos citotóxicos de VOAspi en los macrófagos RAW264.7 parecerían involucrar además variaciones en la homeostasis del calcio, que inducirían un aumento en la producción de NO e incrementos en los niveles de iNOS.

-  En resumen, los resultados presentados en esta tesis indican que los complejos de vanadio(IV), GluVO, TreVO y VOAspi ejercen efectos citotóxicos en células de osteosarcoma en cultivo e inhiben procesos clave en el desarrollo y progresión tumoral, ya sea por afectación directa de las células tumorales o por regulación de mecanismos de defensa del huésped (activación de células fagocitarias tales como los macrófagos). Sin embargo, aún hacen falta estudios in vivo que permitan aseverar la potencial utilidad de este grupo de agentes antineoplásicos no derivados del platino en el tratamiento oncológico.



7. Bibliografía

- Alonso DF, Farias EF, Ladeda V, Davel L, Puricelli L, Bal de Kier Joffe E. Effects of synthetic urokinase inhibitors on local invasion and metastasis in a murine mammary tumor model. *Breast Cancer Res Treat.* 1996;40(3):209-23.
- Alonso DF, Tejera AM, Farias EF, Bal de Kier Joffe E, Gomez DE. Inhibition of mammary tumor cell adhesion, migration, and invasion by the selective synthetic urokinase inhibitor B428. *Anticancer Res.* 1998;18(6A):4499-504.
- Aubrecht J, Narla RK, Ghosh P, Stanek J, Uckun FM. Molecular genotoxicity profiles of apoptosis-inducing vanadocene complexes. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1999;154(3):228-35.
- Bakas L, Verza G, Cortizo A. Effect of vanadium compounds on the lipid organization of liposomes and cell membranes. *Biol Trace Elem Res.* 2001; 80(3):269-79.
- Barrio DA, Braziunas MD, Etcheverry SB, Cortizo AM. Maltol complexes of vanadium (IV) and (V) regulate in vitro alkaline phosphatase activity and osteoblast-like cell growth. *J Trace Elem Med Biol.* 1997;11(2):110-5.
- Barrio DA, Williams PA, Cortizo AM, Etcheverry SB. Synthesis of a new vanadyl(IV) complex with trehalose (TreVO): insulin-mimetic activities in osteoblast-like cells in culture. *J Biol Inorg Chem.* 2003;8(4):459-68.
- Barry ST, Critchley DR. The RhoA-dependent assembly of focal adhesions in Swiss 3T3 cells is associated with increased tyrosine phosphorylation and the recruitment of both pp125FAK and protein kinase C-d to focal adhesions. *J Cell Sci.* 1994;107:2033-2045.
- Bay BH, Sit KH, Paramanantham R, Chan YG. Hydroxyl free radicals generated by vanadyl[IV] induce cell blebbing in mitotic human Chang liver cells. *Biometals.* 1997; 10(2):119-22.
- Ben Mahdi MN, Andrieu V, Paquier C. Focal adhesion kinase regulation by oxidative stress in different cell types. *IUBMB Life.* 2000; 50:291-299.
- Beuge, J. A., and S. D. Aust. Microsomal lipid peroxidation. In: L. Fleisher and L. Packer (ed.) *Methods in Enzymology.* Academic Press, New York. 1978; 52:302–310.
- Bishayee A, Chatterjee M. Time course effects of vanadium supplement on cytosolic reduced glutathione level and glutathione S-transferase activity. *Biol Trace Elem Res.* 1995;48(3):275-85.
- Bissell MJ, Nelson WJ. Cell-to-cell contact and extracellular matrix integration of form and function: the central role of adhesion molecules. *Curr Opin Cell Biol.* 1999; 11:537-539.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72:248-54.
- Byczkowski JZ y Kulkarni AP. Oxidative stress and pro-oxidant biological effects of vanadium. In *Vanadium in the environment Part 2.* Edited by JO Nriagu, 1998; 235-264.
- Byczkowski JZ, Kulkarni AP. Vanadium redox cycling, lipid peroxidation and co-oxygenation of

- benzo(a)pyrene-7,8-dihydrodiol. *Biochim Biophys Acta*. 1992;1125(2):134-41.
- Chak CW, Lee KM, Leung KS, Fung KP. No change in bone - specific alkaline phosphatase activities in cultured rat osteoblastic cells under L - ascorbate and B - glicerophosphate - induced mineralization. *Cell Biol Internat* 1995; 19:979 - 985.
- Chatterjee M y Bishayee A. Vanadium – a new tool for cancer prevention. In *Vanadium in the environment Part 2*. Edited by JO Nriagu, 1998; 347-390.
- Chen F, Demers LM, Vallyathan V, Ding M, Lu Y, Castranova V, Shi X. Vanadate induction of NF-kappaB involves IkappaB kinase beta and SAPK/ERK kinase 1 in macrophages. *J Biol Chem*. 1999;274(29):20307-12.
- Chen F, Shi X. Intracellular signal transduction of cells in response to carcinogenic metals. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2002;42(1):105-21.
- Chintala SK, Kyristis AP, Mohan PM, Mohanam S, Sawaya R, Gokslan Z, Yung WK, Steck P, Uhm JH, Aggarwal BB, Rao JS. Altered actin cytoskeleton and inhibition of matrix metalloproteinase expression by vanadate and phenilarsine oxide, inhibitors of phosphotyrosine phosphatases: modulation of migration and invasion of human malignant glioma cells. *Mol Carcinog*. 1999; 26(4):274-285.
- Cho CW, Liu Y, Yan X, Henthorn T, Ng KY. Carrier mediated uptake of rhodamine 123: implication on its use for MDR research. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000; 279:124-130.
- Clementi E. Role of nitric oxide and its intracellular signalling pathways in the control of Ca²⁺ homeostasis. *Biochem Pharmacol*. 1998;55(6):713-8.
- Cortizo AM, Etcheverry SB. Vanadium derivatives act as growth factor—mimetic compounds upon differentiation and proliferation of osteoblast-like UMR106 cells. *Mol Cell Biochem*. 1995;145(2):97-102.
- Cortizo AM y Kreda S. Vanadium induced alterations in cytoskeleton and protein tyrosine-phosphorylation in osteoblast cell lines. *Metal Ions in Biology and Medicine*. Eds JA Centeno; Ph Collery, G Vernet, RB Finkelman, H Gibb, JC Etienne. John Libbey Eurotext, Paris. 2000; 6:714-716.
- Cortizo AM, Bruzzone L, Molinuevo S, Etcheverry SB. A possible role of oxidative stress in the vanadium-induced cytotoxicity in the MC3T3E1 osteoblast and UMR106 osteosarcoma cell lines. *Toxicology*. 2000a; 147(2):89-99.
- Cortizo AM, Caporossi M, Lettieri G, Etcheverry SB. Vanadate-induced nitric oxide production: role in osteoblast growth and differentiation. *Eur J Pharmacol*. 2000b; 400(2-3):279-85.
- Cortizo MS, Alessandrini JL, Etcheverry SB, Cortizo AM. A vanadium/aspirin complex controlled release using a poly(beta-propiolactone) film. Effects on osteosarcoma cells. *J Biomater Sci Polym Ed*. 2001;12(9):945-59.
- Coudray C, Richard MJ, Favier AE. Determination of primary and secondary lipid peroxidation

- products: plasma lipid hydroperoxides and thiobarbituric acid reactive substances. In *Analysis of Free Radicals in Biological Systems*. Ed by: Favier AE, Cadet J, Kalyanaraman B, Fontecave, Pierre JL. Ed Birkhäuser Verlag, 1995, pag 185-200.
- Crans DC y Tracey AS. The chemistry of vanadium in aqueous and non-aqueous solution. In *Vanadium Compounds: chemistry, biochemistry and therapeutic applications*. Edited by AS Tracey y DC Crans. 1998; 1: 2-29.
- Damsky CH. Extracellular matrix-integrin interactions in osteoblasts function and tissue remodeling. *Bone*. 1999; 25(1):95-96.
- Denlinger LC, Fisetta PL, Garis KA, Kwon G, Vazquez-Torres A, Simon AD, Nguyen B, Proctor RA, Bertics PJ, Corbett JA. Regulation of inducible nitric oxide synthase expression by macrophage purinoreceptors and calcium. *J Biol Chem*. 1996;271(1):337-42.
- Ding M, Li JJ, Leonard SS, Ye JP, Shi X, Colburn NH, Castranova V, Vallyathan V. Vanadate-induced activation of activator protein-1: role of reactive oxygen species. *Carcinogenesis*. 1999; 20(4):663-8.
- Djordjevic C. Antitumor activity of vanadium compounds. *Met Ions Biol Syst*. 1995;31:595-616.
- El-Naggar MM, El-Waseef AM, El-Halafawy KM, El-Sayed IH. Antitumor activities of vanadium(IV), manganese(IV), iron(III), cobalt(II) and copper(II) complexes of 2-methylaminopyridine. *Cancer Lett*. 1998;133(1):71-6.
- Etcheverry SB, Crans DC, Keramidias AD, Cortizo AM. Insulin-mimetic action of vanadium compounds on osteoblast-like cells in culture. *Arch Biochem Biophys*. 1997a;338(1):7-14.
- Etcheverry SB, Williams PAM, Baran EJ. Synthesis and characterization of oxovanadium(IV) complexes with saccharides. *Carbohydrate Res*. 1997b; 302: 131 - 138.
- Etcheverry SB y Cortizo AM. Vanadium bioactivity on cells in culture. In *Vanadium Compounds: chemistry, biochemistry and therapeutic applications*. Edited by AS Tracey y DC Crans. 1998; 21: 270-277.
- Etcheverry SB, Williams PAM, Barrio DA, Sállice VC, Ferrer EG, Cortizo AM. Synthesis, characterization and bioactivity of a new VO₂ / Aspirin complex. *J Inorg Chem*. 2000; 80: 169 - 171.
- Etcheverry SB, Williams PA, Salice VC, Barrio DA, Ferrer EG, Cortizo AM. Biochemical properties and mechanism of action of a vanadyl(IV)-aspirin complex on bone cell lines in culture. *Biometals*. 2002;15(1):37-49.
- Evangelou A, Karkabounas S, Kalpouzou G, Malamas M, Liasko R, Stefanou D, Vlahos AT, Kabanos TA. Comparison of the therapeutic effects of two vanadium complexes administered at low dose on benzo[a]pyrene-induced malignant tumors in rats. *Cancer Lett*. 1997;119(2):221-5.
- Evangelou AM. Vanadium in cancer treatment. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2002 42(3):249-65.

- Evans CE. Biphosphonates modulate the effect of macrophage - like cells on osteoblasts. *Int J Biochem Cell Biol.* 2002; 34:554-563
- Fantus IG, Tsiani E. Multifunctional actions of vanadium compounds on insulin signaling pathways:evidence for preferential enhancement of metabolic versus mitogenic effects.*Mol Cell Biochem.* 1998 182(1-2):109-19.
- Fratz - Zelman N, Hörandner H, Luegmayr E, Varga F, Ellinger A, Erlee MPM, Klaushofer K. Effects of triiodothyronine on the morphology of cells and matrix, the localization of alkaline phosphatase, and the frequency of apoptosis in long - term cultures of MC3T3E1 cells. *Bone.* 1997; 20:225 - 236.
- Ghosh P, D'Cruz OJ, Narla RK, Uckun FM. Apoptosis-inducing vanadocene compounds against human testicular cancer. *Clin Cancer Res.* 2000;6(4):1536-45.
- Grassi C, D'Ascenzo M, Azzena GB. Modulation of Ca(v)1 and Ca(v)2.2 channels induced by nitric oxide via cGMP-dependent protein kinase. *Neurochem Int.* 2004;45(6):885-93.
- Goodman y Gilman. Quimioterapia de las enfermedades neoplásicas. En *Las bases farmacológicas de la terapéutica*. Novena Edición. Editores JG Hardman y LE Limbird. Ed. McGraw-Hill Interamericana. 1996; 2(Sección X):1301-1368.
- Hamdy NA. Role of biphosphonates in metabolic bone diseases. *Trends Endocrinol Metab* 1993; 4:19-25.
- Harada S, Rodan GA. Control of osteoblast function and regulation of bone mass. *Nature.* 2003; 423(6937):349-55.
- Harding MM, Mokdsi G. Antitumour metallocenes: structure-activity studies and interactions with biomolecules. *Curr Med Chem.* 2000;7(12):1289-303.
- Hauck CR, Hsia DA, Schlaepfer DD. The focal adhesion kinase- A regulator of cell migration and invasion. *IUBMB Life.* 2002; 53:115-119.
- Howe AK. Regulation of actin-based cell migration by cAMP/PKA. *Biochim Biophys Acta.* 2004; 1692:159-174.
- <http://depts.washington.edu/bonebio/ASBMRed>
- <http://www.deis.gov.ar/publicaciones/archivos/Boletines.pdf>
- Huang C, Zhang Z, Ding M, Li J, Ye J, Leonard SS, Shen HM, Butterworth L, Lu Y, Costa M, Rojanasakul Y, Castranova V, Vallyathan V, Shi X. Vanadate induces p53 transactivation through hydrogen peroxide and causes apoptosis. *J Biol Chem.* 2000;275(42):32516-22.
- Jackson JK, Min W, Cruz TF, Cindric S, Arsenault L, Von Hoff DD, Degan D, Hunter WL, Burt HM. A polymer-based drug delivery system for the antineoplastic agent bis(maltolato)oxovanadium in mice. *Br J Cancer.* 1997;75(7):1014-20.
- Johnson LV, Walsh ML, Bockus BJ, Chen LB. Monitoring of relative mitochondrial membrane potential in living cells by fluorescence microscopy. *J Cell Biol.* 1981; 88:526-535.

- Kanamori K, Nishida K, Miyata N, Okamoto K, Miyoshi Y, Tamura A, Sakurai H. Synthesis, structures, and insulin-like activities of peroxovanadium(V) complexes with heteroligand. *J Inorg Biochem* 2001; 86:649-656.
- Kindmark H, Köhler M, Brown G, Bränström R, Larsson O, Berggren PO. Glucose-induced oscillations in cytoplasmic free Ca²⁺ concentration precede oscillations in mitochondrial membrane potential in the pancreatic b-cells. *J Biol Chem*. 2001; 276:34530-34536.
- Kooy NW, Royall JA, Ischiropoulos H, Beckman JS. Peroxynitrite-mediated oxidation of dihydrorhodamine 123. *Free Radic Biol Med*. 1994; 16(2):149-56.
- Kramer HJ, Krampitz G, Backer A, Krampitz G Jr, Meyer-Lehnert H. Vanadium-diascorbates are strong candidates for endogenous ouabain-like factors in human urine: effects on Na-K-ATPase enzyme kinetics. *Biochem Biophys Res Commun*. 1995; 213(1):289-94.
- Krick S, Platoshyn O, McDaniel SS, Rubin LJ, Yuan JX. Augmented K(+) currents and mitochondrial membrane depolarization in pulmonary artery myocyte apoptosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2001; 281(4):L887-94.
- Kufe, Donald W.; Pollock, Raphael E.; Weichselbaum, Ralph R.; Bast, Robert C., Jr.; Gansler, Ted S.; Holland, James F.; Frei III, Emil, editors. **Cancer Medicine**. 6th ed. Hamilton (Canada): Bcdecker 2003.
- Kusumi A, Suzuki K, Koyasako K. Mobility and cytoskeletal interactions of cell adhesion receptors. *Curr Opin Cell Biol*. 1999; 11:582-590.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970; 227:680-5.
- Li Z, Carter JD, Dailey LA, Huang YC. Vanadyl sulfate inhibits NO production via threonine phosphorylation of eNOS. *Environ Health Perspect*. 2004;112(2):201-6.
- Liasko R, Kabanos TA, Karkabounas S, Malamas M, Tasiopoulos AJ, Stefanou D, Collery P, Evangelou A. Beneficial effects of a vanadium complex with cysteine, administered at low doses on benzo(alpha)pyrene-induced leiomyosarcomas in Wistar rats. *Anticancer Res*. 1998;18(5A):3609-13.
- Lin WW, Chen BC. Distinct PKC isoforms mediate the activation of cPLA2 and adenylyl cyclase by phorbol ester in RAW264.7 macrophages. *Br J Pharmacol*. 1998;125(7):1601-9.
- Litter M. La Farmacología. Fases de estudio de las drogas. En *Farmacología Experimental y Clínica*. Séptima Edición. Editorial El Ateneo. 1986a.
- Litter M. Quimioterapia del cáncer. Agentes alquilantes. Antimetabolitos. Antibióticos antineoplásicos. Alcaloides vegetales. En *Farmacología Experimental y Clínica*. Séptima Edición. Editorial El Ateneo. 1986b.
- Lyonnet BM y Martin E. L'emploi therapeutique des derives du vanadium. *Presse Med*. 1899; 1:191-192.

- Mackie EJ. Osteoblasts: novel roles in orchestration of skeletal architecture. *Int J Biochem Cell Biol.* 2003;35(9):1301-5.
- Manolagas SC, Jilka RL. Bone marrow, cytokines, and bone remodeling. Emerging insights into the pathophysiology of osteoporosis. *N Engl J Med.* 1995; 332(5):305-11.
- Manolagas SC. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr Rev.* 2000;21(2):115-37.
- Mates JM, Sanchez-Jimenez FM. Role of reactive oxygen species in apoptosis: implications for cancer therapy. *Int J Biochem Cell Biol.* 2000; 32(2):157-70.
- Matsuyoshi N, Hamaguchi M, Taniguchi S, Nagafuchi A, Tsukita S, Takeichi M. Cadherin-mediated cell-cell adhesion is perturbed by v-src tyrosine phosphorylation in metastatic fibroblasts. *J Cell Biol.* 1992; 118(3):703-14.
- McCarthy AD, Uemura T, Etcheverry SB, Cortizo AM. Advanced glycation endproducts interfere with integrin-mediated osteoblastic attachment to a type-I collagen matrix. *Int J Biochem Cell Biol.* 2004; 36(5):840-8.
- Morinville A, Maysinger D, Shaver A. From Vanadis to Atropos: vanadium compounds as pharmacological tools in cell death signalling. *Trends Pharmacol Sci.* 1998; 19(11):452-60.
- Mukherjee B, Patra B, Mahapatra S, Banerjee P, Tiwari A, Chatterjee M. Vanadium—an element of atypical biological significance. *Toxicol Lett.* 2004;150(2):135-43.
- Narla RK, Dong Y, D'Cruz OJ, Navara C, Uckun FM. Bis(4,7-dimethyl-1,10-phenanthroline) sulfatoxovanadium(IV) as a novel apoptosis-inducing anticancer agent. *Clin Cancer Res.* 2000; 6(4):1546-56.
- Narla RK, Dong Y, Klis D, Uckun FM. Bis(4,7-dimethyl-1,10-phenanthroline) sulfatoxovanadium(I.V.) as a novel antileukemic agent with matrix metalloproteinase inhibitory activity. *Clin Cancer Res.* 2001a; 7(4):1094-101.
- Narla RK, Chen CL, Dong Y, Uckun FM. In vivo antitumor activity of bis(4,7-dimethyl-1,10-phenanthroline) sulfatoxovanadium(IV) (METVAN [VO(SO₄)(Me₂-Phen)₂]). *Clin Cancer Res.* 2001b; 7(7):2124-33.
- Narla RK, Dong Y, Uckun FM. Apoptosis inducing novel anti-leukemic agent, bis(4,7-dimethyl-1,10 phenanthroline) sulfatoxovanadium(IV) [VO(SO₄)(Me₂-Phen)₂] depolarizes mitochondrial membranes. *Leuk Lymphoma.* 2001c; 41(5-6):625-34.
- Nechay BR. Mechanisms of action of vanadium. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1984; 24:501-24.
- Ng KW, Romas E, Donnan L, Findlay DM. Bone biology. *Baillieres Clin Endocrinol Metab.* 1997; 11(1):1-22.
- Nielsen FH. Vanadium in mammalian physiology and nutrition. *Met Ions Biol Syst.* 1995; 31:543-73.
- Nielsen HF. The nutritional essentiality and physiological metabolism of vanadium in higher animals. In *Vanadium Compounds: chemistry, biochemistry and therapeutic applications.* Edited

- by AS Tracey y DC Crans. 1998; 23: 297-307.
- Nobes CD, Hawkins P, Stephens L, Hall A. Activation of the small GTP-binding proteins rho and rac by growth factor receptors. *J Cell Sciences*. 1995; 108:225-233.
- Okajima T, Nakamura K, Zhang H, Ling N, Tanabe T, Yasuda T, Rosenfeld RG. Sensitive colorimetric bioassays for insulin-like growth factor (IGF) stimulation of cell proliferation and glucose consumption: use in studies of IGF analogs. *Endocrinology*. 1992; 130(4):2201-212.
- Ozawa M, Kemeler R. Altered cell adhesion activity by pervanadate due to the dissociation of a-catenin from the E-cadherin.Catenin complex. *J Biol Chem*. 1998; 273:6166-6170.
- Partridge NC, Alcorn D, Michelangeli VP, Ryan G, Martin TJ. Morphological and biochemical characterization of four clonal osteogenic sarcoma cell lines of rat origin. *Cancer Res*. 1983; 43(9):4308-14.
- Powell RJ, Cronenwett JL, Gauthier AJ, Wagner RJ. Quantitating intestinal ischemia with nitroblue tetrazolium salts. *J Surg Res*. 1995;58(4):359-66.
- Quarles LD, Yohay DA, Lever LW, Caton R, Wenstrup RJ. Distinct proliferative and differentiated stages of murine MC3T3-E1 cells in culture: an in vitro model of osteoblast development. *J Bone Miner Res*. 1992; 7(6):683-92.
- Raschke WC, Baird S, Ralph P, Nakoinz I. Functional macrophage cell lines transformed by Abelson leukemia virus. *Cell*. 1978;15(1):261-7.
- Rodan GA, Martin TJ. Therapeutic approaches to bone diseases. *Science*. 2000; 289(5484):1508-14.
- Roodman GD. Mechanisms of bone metastasis. *N Engl J Med*. 2004; 350(16):1655-64.
- Sakurai H, Shimomura S, Fukuzawa K, Ishizu K. Detection of oxovanadium (IV) and characterization of its ligand environment in subcellular fractions of the liver of rats treated with pentavalent vanadium(V). *Biochem Biophys Res Commun*. 1980; 96(1):293-8.
- Sakurai H. Vanadium distribution in rats and DNA cleavage by vanadyl complex: implication for vanadium toxicity and biological effects. *Environ Health Perspect*. 1994; 102:35-6.
- Salahudeen AK. Role of lipid peroxidation in H₂O₂-induced renal epithelial (LLC-PK1) cell injury. *Am J Physiol*. 1995; 268(1 Pt 2):F30-8.
- Salice VC, Cortizo AM, Gomez Dumm CL, Etcheverry SB. Tyrosine phosphorylation and morphological transformation induced by four vanadium compounds on MC3T3E1 cells. *Mol Cell Biochem*. 1999; 198(1-2):119-28.
- Salmon SE, Sartorelli MD y AC. Quimioterapia del cáncer. En *Farmacología Básica y Clínica*. Cuarta Edición. Katzung BG. Ed. El Manual Moderno SA de CV. México. 1991; 56:685-715.
- Schoenwaelder SM, Burrige K. Evidence for a calpeptin-sensitive protein tyrosine phosphatase upstream of the small GTPase Rho. *J Biol Chem*. 1999; 274:14359-14367.
- Shechter Y, Shisheva A. Vanadium salts and the future treatment of diabetes. *Endeavour*. 1993 17(1):27-31.

- Shechter Y, Li J, Meyerovitch J, Gefel D, Bruck R, Elberg G, Miller DS, Shisheva A. Insulin-like actions of vanadate are mediated in an insulin-receptor-independent manner via non-receptor protein tyrosine kinases and protein phosphotyrosine phosphatases. *Mol Cell Biochem.* 1995;153(1-2):39-47.
- Shi X, Dong Z, Huang C, Ma W, Liu K, Ye J, Chen F, Leonard SS, Ding M, Castranova V, Vallyathan V. The role of hydroxyl radical as a messenger in the activation of nuclear transcription factor NF- κ B. *Mol Cell Biochem.* 1999; 194: 63-70.
- Soler y Batlle E. *Medicamenta. Formulario teórico práctico de farmacia, medicina y veterinaria.* Edición americana revisada, modificada y ampliada por el Dr. FJ Cortada. Primera Edición. Editorial Labor SA. Buenos Aires - Montevideo. 1947; 2: 1014.
- Sudo H, Kodama HA, Amagai Y, Yamamoto S, Kasai S. In vitro differentiation and calcification in a new clonal osteogenic cell line derived from newborn mouse calvaria. *J Cell Biol.* 1983;96(1):191-8.
- Suzuki A, Guicheux J, Palmer G, Miura Y, Oiso Y, Bonjour JP, Caverzasio J. Evidence for a role of p38 MAP kinase in expression of alkaline phosphatase during osteoblastic cell differentiation. *Bone.* 2002;30(1):91-8.
- Takenaga K. Suppression of metastatic potential of high-metastatic Lewis lung carcinoma cells by vanadate, an inhibitor of tyrosine phosphatase, through inhibiting cell-substrate adhesion. *Invasion Metastasis.* 1996;16(2):97-106.
- Teitelbaum SL. Bone resorption by osteoclasts. *Science.* 2000; 289(5484):1504-8.
- Thompson HJ, Chasteen ND, Meeker LD. Dietary vanadyl(IV) sulfate inhibits chemically-induced mammary carcinogenesis. *Carcinogenesis.* 1984; 5(6):849-51.
- Thompson KH, Battell M, McNeill JH. Toxicology of vanadium in mammals. In *Vanadium in the environment Part 2.* Edited by JO Nriagu, 1998; 21-38.
- Thompson KH, McNeill JH, Orvig C. Vanadium compounds as insulin mimics. *Chem Rev.* 1999; 99(9):2561-72.
- Tsiani E, Fantus IG. Vanadium compounds. Biological actions and potential as pharmacological agents. *Trends Endocrinol Metab.* 1997; 8:51-58.
- Tsuji A, Sakurai H. Vanadyl ion suppresses nitric oxide production from peritoneal macrophages of streptozotocin-induced diabetic mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 1996;226(2):506-11.
- Upreti RK. Membrane—vanadium interaction: a toxicokinetic evaluation. *Mol Cell Biochem.* 1995;153(1-2):167-71.
- Valko M, Morris H, Cronin MT. Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr Med Chem.* 2005;12(10):1161-208.
- van Engeland M, Kuijpers HJ, Ramaekers FC, Reutelingsperger CP, Schutte B. Plasma membrane alterations and cytoskeletal changes in apoptosis. *Exp Cell Res.* 1997;235(2):421-30.

- Varga F, Luegmayer E, Fratzi-Zelman N, Glantschnig H, Ellinger A, Prinz D, Rumpler M, Klaushofer K. Tri-iodothyronine inhibits multilayer formation of the osteoblastic cell line, MC3T3-E1, by promoting apoptosis. *J Endocrinol.* 1999;160(1):57-65.
- Vepa S, Scribner WM, Parinandi NL, English D, Garcia JGN, Natarajan V. Hydrogen peroxide stimulates tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase in vascular endothelial cells. *Am J Physiol.* 1999; 277:L150-L158.
- Vrablic AS, Albright CD, Craciunescu CN, Salganik RI, Zeisel SH. Altered mitochondrial function and overgeneration of reactive oxygen species precede the induction of apoptosis by 1-O-octadecyl-2-methyl-rac-glycero-3-phosphocholine in p53-defective hepatocytes. *FASEB J.* 2001;15(10):1739-44.
- Vogel AI. Bases teóricas de la química analítica cuantitativa. En: *Química Analítica Cuantitativa. Teórica y Práctica.* Ed Kapelusz. 1960; 1:1-60.
- Wassler MJ, Shur BD. Clustering of cell surface b1,4-galactosyltransferase I induces transient tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase and loss of stress fibers. *J Cell Science.* 2000; 113:237-245.
- Williams PAM, Molinuevo MS, Okulik N, Jubert AH, Etcheverry SB. Synthesis, characterization and biological properties of vanadyl(IV) complex of diclofenac and indomethacin: an experimental and theoretical study. *Appl Organometal Chem* 2005; 19:711 - 718.
- Ye J, Ding M, Leonard SS, Robinson VA, Millecchia L, Zhang X, Castranova V, Vallyathan V, Shi X. Vanadate induces apoptosis in epidermal JB6 P+ cells via hydrogen peroxide-mediated reactions. *Mol Cell Biochem.* 1999a; 202(1-2):9-17.
- Ye J, Ding M, Zhang X, Rojanasakul Y, Nedospasov S, Vallyathan V, Castranova V, Shi X. Induction of TNF α in macrophages by vanadate is dependent on activation of transcription factor NF-kappaB and free radical reactions. *Mol Cell Biochem.* 1999a; 198(1-2):193-200.
- Yin JJ, Pollock CB, Kelly K. Mechanisms of cancer metastasis to the bone. *Cell Res.* 2005;15(1):57-62.
- Yoneda T, Hiraga T. Crosstalk between cancer cells and bone microenvironment in bone metastasis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005; 328(3):679-87.
- Yuen VG, Orvig C, Thompson KH, McNeill JH. Improvement in cardiac dysfunction in streptozotocin-induced diabetic rats following chronic oral administration of bis(maltolato)oxovanadium(IV). *Can J Physiol Pharmacol.* 1993; 71(3-4):270-6.
- Zhang DX, Chen YF, Campbell WB, Zou AP, Gross GJ, Li PL. Characteristics and superoxide-induced activation of reconstituted myocardial mitochondrial ATP-sensitive potassium channels. *Circ Res.* 2001; 89(12):1177-83.

8. Publicaciones

Los resultados incluídos en el presente trabajo de tesis han dado origen a las siguientes publicaciones:

1. **A posible role of oxidative stress in the vanadium-induced cytotoxicity in the MC3T3E1 osteoblast and UMR106 osteosarcoma cell lines.** Cortizo AM, Bruzzone L, Molinuevo S, Etcheverry SB. *Toxicology* 147, 89-99, 2000.
2. **Mechanisms of action and cytotoxicity of a new vanadyl(IV)/Aspirin complex in osteoblast-like cell** S.B. Etcheverry, D. A. Barrio, M.S.Molinuevo, A.M.Cortizo. En: "Metal Ions in Biology and Medicine", J.A.Centeno, P.Collery, G.Vernet, R.B.Finkellman, H.Gibb, J-C Etienne (Eds.). John Libbey Eurotext, Paris. Vol. 6, pp.495-497, 2000.
3. **Two new vanadyl(IV) complexes with potential antineoplastic effect on osteoblasts in culture.** S.B. Etcheverry, D. A. Barrio, M.S.Molinuevo, A.M.Cortizo. En: "Metal Ions in Biology and Medicine", L. Khassanova, Ph. Collery, I. Maynard, Z. Khassanova, JC Etienne (Eds.). John Libbey Eurotext, Paris. Vol. 7, pp.629-632, 2002.
4. **Antitumoral properties of two new vanadyl(IV) complexes on osteoblasts in culture. Role of apoptosis and oxidative stress.** María S. Molinuevo. Daniel A. Barrio. Ana M. Cortizo. Susana B. Etcheverry. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*. 53(2):163-72, 2004.
5. **Macrophage activation by a vanadyl - aspirin complex is dependent on L-type calcium channel and the generation of nitric oxide** María S. Molinuevo, Susana B. Etcheverry, Ana M. Cortizo. *Toxicology* 210: 205-212, 2005.
6. **Synthesis, characterization and biological properties of vanadyl(IV) complexes of diclofenac and indomethacin: an experimental and theoretical study.** Patricia AM Williams. María S. Molinuevo. Nora Okulik. Alicia H Jubert. Susana B. Etcheverry. *Appl Organometal Chem* 19:711 - 718, 2005.