



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS  
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

---

Trabajo de Tesis Doctoral:

Screening de metalofármacos derivados de N-heterociclos y metales  
de transición en cultivos celulares 2D y 3D según sus efectos  
antitumorales

---

Químico Farmacéutico. Juan Fernando Cadavid Vargas

Directora: Prof. Dra. Susana Beatriz Etcheverry

Codirectora: Dra. Ana Laura Di Virgilio

Año:2019



*Dedicado a Mita.*

*“Lo único que les voy a dejar cuando me muera es la educación”*

*Mita*

*Q.E.P.D*

*1927-2015*





## Agradecimientos

Quiero agradecer a:

- El CONICET, al Ministerio de Ciencia y Tecnología, a la Universidad Nacional de La Plata por financiar este trabajo de tesis doctoral. Al CEQUINOR por permitirme desarrollar las tareas de investigación en sus instalaciones durante estos años.
- A mi familia por el apoyo que siempre me han brindado.
- A mis directoras por estar ahí y no dejarme renunciar en los momentos más oscuros. Al Dr. Ignacio León por sus ideas, colaboración y ayudarme durante el desarrollo de este proyecto.
- A Cristian por estar ahí, incondicional hasta el último segundo dispuesto a ayudarme y hacerme crecer cada vez.
- A Carolina por acompañarme siempre en las locuras de poner a punto cosas nuevas y compartir los buenos y malos momentos de estos años, perdón por ser un abandonico. A Lucia por tolerar mis gritos constantes de loca desahogada.
- A Betty por ser mi hombro de catarsis en cada crisis existencial.
- A la Dra. Luciana G. Naso por siempre tener una palabra de aliento y ser socia en nuestra empresa de mudanzas de gran equipamiento científico.
- Eli, Ede, Yace, María Rosita, Martina, Gabriel, Zuly y Efrén por compartir conmigo actividades extracurriculares que tanto bien me hacían.
- A todos los becarios, investigadores y profesionales de la carrera de personal de apoyo que me regalaron reactivos, prestaron equipos, enseñaron técnicas y me aconsejaron en este trasegar.



## Tabla de contenido

1. INTRODUCCIÓN .....	12
1.1. Cáncer .....	12
1.2. Cáncer de pulmón.....	13
1.3. Cifras de cáncer en la República Argentina.....	14
1.3.1. Incidencia .....	14
1.3.2. Mortalidad .....	15
1.4. Metalofármacos en la química medicinal inorgánica.....	16
1.5. Cisplatino y complejos relacionados .....	17
1.6. Cobre .....	19
1.6.1. Generalidades del cobre. ....	19
1.6.2. Química del cobre .....	19
1.6.3. Homeostasis del cobre.....	20
1.6.4. Regulación intracelular del cobre .....	20
1.6.5. Cobre y enfermedades asociadas .....	23
1.6.6. Complejos de cobre con actividad antitumoral in vitro .....	25
1.6.7. Homeostasis del zinc y complejos relacionados con actividad antitumoral.....	30
1.7. Apoptosis y muerte celular .....	31
1.7.1. Tipos de muerte celular: necrosis y apoptosis .....	31
1.7.2. Características morfológicas de la apoptosis .....	32
1.7.3. Caspasas.....	32
1.7.4. Caspasas y cáncer .....	33
1.8. Ciclo celular.....	33
1.8.1. Control del ciclo celular .....	34
1.8.2. Ciclo celular y cáncer .....	35
1.9. Interacción de los complejos de metales de transición y su potencial mecanismo de acción a través de la alteración del balance redox .....	35
1.10. Inducción de muerte celular a través de especies de oxígeno reactivas (ROS) en células tumorales.....	37
1.11. Modelos tridimensionales de cultivo celular (esferoides multicelulares) en estudios in vitro	40
1.12. Ligandos de interés biológico estudiados en este trabajo .....	43
1.12.1. Quinolinas .....	43
1.12.2. Sulfonamidas.....	45
2. Hipótesis de trabajo .....	49
3. Objetivos .....	49

3.1.	Objetivo General.....	49
3.2.	Objetivos específicos .....	49
4.	MATERIALES Y MÉTODOS APLICADOS .....	50
4.1.	Síntesis química de los diferentes complejos estudiados .....	50
4.1.1.	Síntesis de glutamatos y sacarinos de cobre .....	50
4.1.2.	Síntesis de complejos con 6-metoxiquinolina .....	50
4.1.3.	Síntesis de complejos ternarios de 2,2' biquinolina con sulfonamidas .....	51
4.2.	Evaluación in vitro del carácter lipofílico de los complejos.....	52
4.3.	Ensayos de Estabilidad .....	53
4.4.	Descripción de las líneas celulares empleadas en este trabajo.....	54
4.4.1.	A549 (CCL-185) .....	54
4.4.2.	MRC-5 (CCL-175).....	54
4.4.3.	MG-63 (CCL-1427) .....	54
4.4.4.	L929 (CCL-1).....	55
4.5.	Condiciones de cultivo .....	55
4.6.	Cultivo de tridimensional de esferoides multicelulares (MCS) .....	55
4.7.	Ensayos de viabilidad celular .....	56
4.7.1.	Estudios de morfología celular.....	56
4.7.2.	Ensayo de cristal violeta.....	56
4.7.3.	Ensayo de MTT.....	57
4.7.4.	Ensayo Alamarblue™ o resazurina .....	58
4.7.5.	Evaluación de la proliferación celular a través del ensayo clonogénico.....	60
4.7.6.	Tinción con fluoresceína diacetato y yoduro de propidio en esferoides multicelulares (MCS) – Live Dead staining.....	61
4.8.	Determinación de estrés oxidativo .....	61
4.8.1.	Determinación de especies reactivas de oxígeno usando citometría de flujo .....	61
4.8.2.	Determinación de la relación GSH/GSSG. ....	63
4.8.3.	Efecto de scavengers de especies de reactivas de oxígeno en la viabilidad celular	65
4.9.	Determinación de apoptosis .....	66
4.9.1.	Tinción con Anexina V-FITC y yoduro de propidio .....	66
4.9.2.	Determinación de caspasa 3 activa.....	67
4.10.	Evaluación del ciclo celular .....	68
4.11.	Ensayos de genotoxicidad.....	69
4.11.1.	Electroforesis en gel de una única célula (Ensayo cometa) .....	69
4.11.2.	Ensayo micronúcleo.....	70
4.12.	Invasión de esferoides en geles de colágeno .....	70

4.13.	Ensayo de proliferación o spreading celular desde esferoides .....	71
4.14.	Procedimiento de irradiación de células.....	72
4.15.	Cuantificación de la cantidad de cobre en el interior de las células .....	72
4.16.	Análisis digital de imágenes .....	73
4.17.	Evaluación de sinergia entre diferentes compuestos. ....	74
4.18.	Métodos estadísticos empleados. ....	75
5.	Resultados y discusión .....	77
5.1.	Estandarización cultivo de esferoides multicelulares .....	77
5.1.1.	Selección del tamaño de esferoide.....	77
5.1.2.	Homogenización de la forma de los esferoides (descriptores de forma).....	80
5.1.3.	Análisis de componentes principales .....	81
5.1.4.	Análisis de clúster de variables por el método de vecino más cercano .....	82
5.1.5.	Parámetros finales seleccionados.....	83
5.1.6.	Resumen sección 5.1 Estandarización cultivo de esferoides multicelulares.....	84
5.2.	Complejos ternarios de cobre con sacarina y glutamina .....	86
5.2.1.	Introducción.....	86
5.2.2.	Efectos de los complejos de cobre (II), sacarina y glutamina en la viabilidad celular 88	
5.2.3.	Inducción de estrés oxidativo en células MG-63 y su rol en la viabilidad celular....	90
5.2.4.	Efectos sobre el ADN celular de los complejos Cu-sac, Cu-gln y Cu-sac-gln.....	93
5.2.5.	Resumen sección 4.2 Complejos ternarios de cobre con sacarina y glutamina.....	96
5.3.	Complejos de 6-metoxiquinolina con cobre, zinc, cobalto y plata.....	97
5.3.1.	Introducción.....	97
5.3.2.	Estabilidad en solución de los complejos derivados de 6-metoxiquinolina .....	98
5.3.3.	Alteraciones en la proliferación y en la viabilidad celular inducidas por los complejos de 6-metoxiquinolina .....	99
5.3.4.	Alteraciones en la morfología celular en presencia de Cu6MQ y Zn6MQ.....	105
5.3.5.	Determinación de las especies de oxígeno reactivas y su efecto en la viabilidad de las células A549.....	108
5.3.6.	Inducción de apoptosis y alteraciones en el ciclo celular.....	111
5.3.7.	Daños a nivel genético inducidos por Cu6MQ y Zn6MQ.....	114
5.3.8.	Efecto de los complejos Cu6MQ y Zn6MQ en la viabilidad y proliferación de esferoides multicelulares derivados de la línea celular A549 .....	116
5.3.9.	Evaluación de sinergismo entre los complejos Cu6MQ y Zn6MQ.....	120
5.3.10.	Resumen sección 5.3 Complejos de 6-metoxiquinolina con cobre, zinc, cobalto y plata	121

5.4.	Estudios realizados con complejos ternarios de 2,2'-biquinolina con sulfametazina y sulfaquinoxalina .....	123
5.4.1.	Introducción.....	123
5.4.2.	Síntesis de los complejos ternarios SDQCu y SMTCu .....	125
5.4.3.	Efectos en la viabilidad celular .....	125
5.4.4.	Determinación de la producción de ROS a nivel intracelular .....	127
5.4.5.	Estudios de la relación GSH/GSSG en células A549.....	135
5.4.6.	Determinación del potencial estándar (Ehc) de reducción de la dupla glutatión oxidado y reducido .....	135
5.4.7.	Efectos genotóxicos de los complejos SMTCu y SDQCu.....	138
5.4.8.	Determinación de caspasa 3 activa.....	139
5.4.9.	Inducción de apoptosis y alteraciones en el ciclo celular.....	140
5.4.10.	Efecto de la combinación de la radiación y los complejos SMTCu y SDQCu5 en la proliferación celular .....	145
5.4.11.	Experimentos en esferoides multicelulares .....	148
5.4.12.	Efecto de los complejos en la invasión de esferoides multicelulares en geles de colágeno. 154	
5.4.13.	Efectos de los complejos SMTCu y SDQCu en la viabilidad otras líneas celulares. 155	
5.4.14.	Otros complejos ternarios de sulfonamidas y N, N heterociclos estudiados .....	157
5.4.15.	Resumen 5.4 Estudios realizados con complejos ternarios de 2,2'-biquinolina con sulfametazina y sulfaquinoxalina .....	158
5.5.	Determinación de algunas propiedades fisicoquímicas de los complejos y su relación con los efectos citotóxicos observados .....	160
5.5.1.	Estudio de la lipofilicidad de los complejos binarios y ternarios de cobre (II).....	160
5.6.	Conclusiones generales.....	167
6.	ANEXO 1. OTROS COMPLEJOS DE COORDINACIÓN DE CU(II) Y PT(II) .....	169
6.1.	Introducción.....	169
6.1.1.	Pt(6MQ) <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> .....	169
6.1.2.	Pt(DMSO)(NQ)Cl .....	170
6.1.3.	Cu(Lami) <sub>4</sub> (ClO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> · 3H <sub>2</sub> O.....	172
7.	Publicaciones científicas y comunicaciones a congresos .....	175
7.1.	Artículos científicos.....	175
7.2.	Comunicaciones a congresos y otras reuniones científicas. ....	175
8.	Referencias bibliográficas. ....	177

**Notas aclaratorias.**

1. En aras de seguir las recomendaciones de armonización relativa a la nomenclatura numérica avalada por la Real Academia de la Lengua Española (RAE), en este manuscrito se ha emplea como separador decimal el símbolo punto (.).
2. En los gráficos presentados a lo largo de este manuscrito en ocasiones se agruparán los símbolos para destacar significancia estadística entre los distintos tratamientos o concentraciones con el fin de reducir la saturación de la figura.

### **Abreviaturas empleadas**

DMEM: Dulbecco's modified Eagles minimal essential medium

PBS: Phosphate-Buffered Saline. pH 7.4

SFB: Suero Feta Bovino.

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

MCS: Esferoides multicelulares

FDA: Fluoresceína diacetato

IP: Yoduro de propidio

DMSO: dimetilsulfóxido

OPT: o-ftalaldehído

NEM: N-etilmaleimida

GSH: Glutatión

GSSG: Glutatión disulfuro

ROS: Especies de oxígeno reactivas (reactive oxygen species).

CCCP: carbonilcianuro-m-clorofenilhidrazona (CCCP)

$\Delta\Psi_m$ : Potencial de membrana mitocondrial

AC: Anhidrasa carbónica

FITC: fluoresceína-5-isotiocianato

6MQ: 6-metoxiquinolina

BQ: 2,2' biquinolina

Sac: sacarina

Gln: glutamina

SMT: sulfametazina

SDQ: sulfaquinoxalina

NAC: N-Acetilcisteína

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. Cáncer

El cáncer es una condición que engloba a más de 150 tipos de enfermedades diferentes. Las células originalmente normales, pierden el control en los procesos de reproducción y crecimiento, por lo que se reproducen de forma anormal e incontrolada [1]. Cuando la enfermedad progresa, las células cancerosas se extienden progresivamente por el órgano al cual pertenecen, y luego, se propagan a órganos próximos o a través de la vía linfática o hematológica, también pueden invadir órganos más distantes. Como esas células crecen y se reproducen de forma incontrolada, su propagación se da de forma desorganizada, lo que da lugar a la formación de una masa tumoral que rompe las membranas límites de las diferentes estructuras e invade los tejidos circundantes [2,3]. Estas células, además, se reproducen mucho más rápido que las normales, por lo que colonizan a los órganos afectados, impidiendo que funcionen de forma apropiada, lo que a su vez origina un fallo multiorgánico y la posterior muerte del paciente afectado. Entre todos los tipos de cáncer, dependiendo de su origen orgánico tienen diferentes características. Así pues, cuando la enfermedad afecta epitelios y/o mucosas se habla de carcinomas, cuando afecta al tejido conjuntivo son sarcomas, las relacionadas con la médula ósea se conocen como leucemias, el sistema inmunitario se ve afectado por linfomas, los huesos por osteomas y los que comprometen al sistema nervioso central se conocen como astrocitomas.

Aunque se sabe que los tumores poseen una gran variabilidad, como consecuencia de la transformación genotípica y fenotípica de la célula, también es conocido que todos los tumores poseen características comunes. A principios del siglo XXI, Hanahan y Weinberg resumieron esas propiedades comunes a seis [4], aunque posteriormente ampliaron la lista basándose en nuevos datos del metabolismo de las células cancerosas [5–7]:

- Las células tumorales tienen la capacidad y el microambiente adecuado para emitir señales de proliferación de forma ininterrumpida.
- Son capaces de evitar el mecanismo de apoptosis celular.
- Las señales crecimiento aumentan.
- Se da una inducción de angiogénesis.
- Las células tumorales invaden tejidos y generan metástasis.
- Tienen potencial ilimitado de crecimiento.
- Se desregulan los mecanismos energéticos de la célula.
- El genoma celular se vuelve inestable, generándose mutaciones
- Las células tumorales evaden los mecanismos del sistema inmune, evitando así su destrucción.
- El tumor promueve una respuesta inflamatoria.



Estas características permiten comprender la diversidad de neoplasias.

## 1.2. Cáncer de pulmón

El cáncer de pulmón es altamente agresivo. Es el tipo de cáncer que provoca la mayor mortalidad en hombres y el cuarto en mujeres a nivel mundial [8,9]. El 90 % de las personas que desarrollan cáncer pulmonar son fumadores o exfumadores activos [10], mientras que el otro 10 % se puede atribuir a causas genéticas, factores externos o incluso a ser fumadores pasivos. Tras el diagnóstico de la enfermedad, el 50 % de los enfermos mueren en el primer año, y sólo el 15 % sobreviven más de cinco años.

A este tipo de cáncer se lo suele clasificar en dos grupos, cáncer pulmonar de células pequeñas (SCLC) y de células no pequeñas (NS-CLC). El NS-CLC, a su vez subdividido en tres grupos (adenocarcinoma, carcinoma pulmonar de células escamosas y carcinoma pulmonar de células grandes), engloba el 85 % de los casos diagnosticados. El carcinoma pulmonar de células grandes es el que tiene mayor velocidad de propagación y el adenocarcinoma se presenta tanto en fumadores como en no fumadores.

El método TNM (Tumor, Node, Metastasis) [11] clasifica el grado de avance de cualquier tumor sólido en función de su tamaño, la afectación linfática y de la aparición o no de metástasis. Este método está unificado a nivel internacional.

### Categoría T: Tumor primario

---

Tx: No es posible valorar el tumor primario. Se observan células malignas en el esputo o lavados bronquiales, pero no se puede confirmar por técnicas de imagen o broncoscopia.

---

T0: No se evidencia tumor primario.

---

T1: Tiene un tamaño menor a 3 cm. No ha alcanzado la pleura visceral y no afecta los bronquios principales. (T1a: Menor a 2 cm y T1b: entre 2 y 3 cm).

---

T2: Si el tumor tiene, al menos, una de las siguientes características:

- Mide entre 3 y 7 cm.
- Involucra un bronquio principal, se sitúa a más de 2 cm de la carina traqueal.
- Ha crecido hacia el interior de la pleura visceral.
- Obstruye parcialmente las vías respiratorias, sin colapso ni neumonía

T2a: menor a 5 cm y T2b: > 5 cm.

---

T3: Si el tumor presenta una o más de las siguientes características:

- Su tamaño es mayor a 7 cm.
  - Ha crecido hacia la pared torácica interior (diafragma), hacia la pleura mediastínica o el pericardio parietal.
  - Invade un bronquio principal y está a menos de 2 cm de la carina traqueal, pero esta no se ve afectada.
  - Ha crecido lo suficiente para crear un colapso total del pulmón y provocar una neumonía en la totalidad del pulmón.
  - Existen dos o más nódulos en el mismo lóbulo del pulmón.
- 

T4: Cuando presenta una o más de las siguientes características:

- El tumor ha crecido hacia el espacio entre los pulmones, corazón o vasos sanguíneos grandes cercanos al corazón tales como la aorta, tráquea, estómago, columna vertebral o carina traqueal.
-

- Dos o más nódulos tumorales separados se encuentran en lóbulos diferentes del pulmón.
- 

#### Categoría N: Nódulos

---

N0: Cuando no hay propagación en los nódulos linfáticos.

---

N1: Cuando el tumor se propaga a nódulos linfáticos dentro del pulmón y alrededor del área de los bronquios (ganglios linfáticos hilares). Los ganglios linfáticos se encuentran en el mismo lado del tumor primario.

---

N2: Cuando los ganglios linfáticos afectados son los de alrededor de la carina o el mediastino. Los ganglios linfáticos se encuentran en el mismo lado del tumor primario.

---

N3: Cuando se ha propagado a los ganglios cercanos a la clavícula en cualquiera de sus lados y a los hilares o ganglios mediastínicos en el lado opuesto al tumor primario.

---

#### Categoría M: Metástasis.

---

M0: No hay metástasis.

---

M1a: Cuando se producen algunos de estos casos:

- Propagación al otro pulmón.
  - Se encuentran células malignas en el líquido que rodea al pulmón (derrame pleural maligno).
  - Hay células malignas en el líquido que rodea al corazón (derrame pericárdico maligno).
- 

M1b: Cuando el cáncer se propaga a ganglios linfáticos distantes u órganos tales como hígado, huesos o cerebro.

---

### 1.3. Cifras de cáncer en la República Argentina

#### 1.3.1. Incidencia

De acuerdo con el Instituto Nacional del Cáncer (INC), Argentina presenta una tasa de incidencia de 212 casos por 100000 habitantes (considerando ambos sexos y todos los tumores a excepción de piel no melanoma), cifra que la posiciona dentro de los países del mundo con incidencia de cáncer media-alta (rango 177 a 245.6 por 100000 habitantes), ubicándola a su vez en el séptimo lugar en Latinoamérica. Esta estimación corresponde a más de 125000 casos nuevos de cáncer en ambos sexos por año, con porcentajes similares tanto en hombres como en mujeres.

Según las estimaciones de incidencia del Observatorio Global de Cáncer de la OMS, el cáncer de mama es el de mayor magnitud en cuanto a ocurrencia para 2018: con más de 21000 casos al año, representó el 17% de todos los tumores malignos detectados y representando un 32.6% de los cánceres femeninos. Para cáncer colorrectal en ambos sexos se estimaron 15692 casos nuevos para el año 2018, concentrando el 13% del total de tumores (Tabla 1.3-1).

En los varones, la mayor incidencia está dada por el cáncer de próstata, con una ocurrencia de más de 11000 casos anuales, que representan el 20% de todos los tumores malignos en hombres y 9% de la totalidad de cánceres del país.

Tabla 1.3-1 Distribución absoluta y relativa de casos incidentes de cáncer estimados por la IARC para Argentina en 2018 según localizaciones tumorales más frecuentes y sexo, tomado de: <https://www.argentina.gob.ar/salud/instituto-nacional-del-cancer/estadisticas/incidencia> (accesado: 25/02/2019)

Sitio tumoral	Ambos sexos		Hombres		Mujeres	
	Casos	%	Casos	%	Casos	%
Mama	21558	17.2			21538	32.6
Colon-recto	15692	12.6	8527	14.5	7165	10.8
Próstata	11600	9.3	11600	19.7		
Pulmón	11595	9.3	7111	12.1	4484	6.8
Riñón	4889	3.9	3165	5.4	1724	2.6
Páncreas	4878	3.9	2302	3.9	2576	3.9
Cérvix	4484	3.6			4484	6.8
Estómago	3980	3.2	2536	4.3	1444	2.2
Vejiga	3631	2.9	2789	4.7	842	1.3
Tiroides	3482	2.8	467	0.8	3015	4.6
Linfoma No-Hodkin	3405	2.7	1938	3.3	1467	2.2
Encéfalo y SNC	3001	2.4	1587	2.7	1414	2.1
Leucemias	2934	2.3	1569	2.7	1365	2.1
Cuerpo del útero	2412	1.9		0.0	2412	3.6
Hígado	2343	1.9	1364	2.3	979	1.5
Ovario	2330	1.9			2330	3.5
Esófago	2299	1.8	1505	2.6	794	1.2
Otros	12224	9.8	8103	13.8	4121	6.2
Total	125014	100.0	58883.0	100.0	66131	100.0

### 1.3.2. Mortalidad

Los datos de mortalidad aportados por la IARC para Argentina en 2018 se resumen en la Tabla 1.3-2.

El cáncer de pulmón representa el mayor número de defunciones por tumores malignos en el año 2018 (10662), concentrando el 16% del total de las defunciones por cáncer y el 19.2% de las muertes por esta causa en hombres. El cáncer colorrectal se ubicó en el segundo lugar de frecuencia, con el 12.8% del total de defunciones (8721).

En mujeres, el cáncer de mama (6380 defunciones), representa el 9.3% del total de las defunciones por cáncer – ubicándose, por su frecuencia, en tercer lugar, de importancia en ambos sexos, y 19.2% de las muertes por tumores en mujeres. Le siguen el cáncer de páncreas (4683) y próstata (3974), los que representan el 6.9% y 5.8% de las muertes respectivamente.

Tabla 1.3-2 Distribución absoluta y relativa de la mortalidad por cáncer en hombres y mujeres según localizaciones tumorales más frecuentes y sexo, estimados por la IARC para Argentina en 2018 tomado de: <https://www.argentina.gob.ar/salud/instituto-nacional-del-cancer/estadisticas/mortalidad> (accesado: 25/02/2019)

Sitio tumoral	Ambos sexos		Hombres		Mujeres	
	Casos	%	Casos	%	Casos	%
Pulmón	10662	15.6	6736	19.2	3926	11.8
Colon - recto	8721	12.8	4751	13.6	3970	11.9
Mama	6380	9.3			6380	
Páncreas	4683	6.9	2196	6.3	2487	7.5
Próstata	3974	5.8	3974	11.3		
Estomago	3202	4.7	2060	5.9	1142	3.4
Riñón	2314	3.4	1566	4.5	748	2.2
Cérvix	2231	3.3			2231	6.7
Hígado	2113	3.1	1206	3.4	907	2.7
Leucemia	2098	3.1	1133	3.2	965	2.9
Esófago	1891	2.8	1257	3.6	634	1.9
Otros	12893	18.9				
<b>Total</b>	<b>68340</b>	<b>100.0</b>	<b>35056.0</b>	<b>100.0</b>	<b>33284</b>	<b>100.0</b>

#### 1.4. Metalofármacos en la química medicinal inorgánica

Los complejos de metales de transición han sido reconocidos por sus aplicaciones en la química medicinal. Los complejos están formados por un metal, el cual es el centro y forma enlaces covalentes de coordinación con los electrones libres de átomos como nitrógeno, oxígeno, fósforo, azufre, entre otros.

La formación de este tipo de compuestos modificará las propiedades físicas y químicas de cada una de sus partes, e impactará en factores como la estabilidad, solubilidad y propiedades biológicas de las partes que lo componen. En la Figura 1.4-1 se muestra una representación esquemática de un complejo de coordinación conformado por un ligando y un átomo metálico.



Figura 1.4-1 Representación esquemática de un complejo de coordinación (círculo amarillo), la mano representa el ligando, quien forma uno o varios enlaces covalentes con el ion metálico (representado por la esfera violeta), a través de átomos con electrones libres (N, O, S, P).

Los complejos de transición pueden ser catiónicos, aniónicos o neutros y dependiendo del tipo del metal incluido se podrán afectar procesos celulares como la división celular, expresión genética, citotoxicidad, muerte celular, entre otros [12,13]. Por su parte, los ligandos pueden modificar el transporte del metal, inhibición de metaloenzimas y cambios en la reactividad general del complejo como estabilización del metal, lipofilidad y estabilidad [14].

### 1.5. Cisplatino y complejos relacionados

El cisplatino fue descrito por primera vez en 1845 por Michèle Peyrone [15], la estructura química fue dilucidada en 1893 por Alfred Werner, sin embargo, solo fue de interés en la clínica a partir de 1970, ganando la aprobación para uso en humanos en 1978 por la FDA (US Food and Drug Administration) como el primer quimioterapéutico basado en un complejo de metales de transición [16].

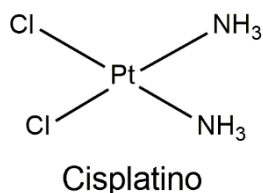


Figura 1.5-1 Estructura química del cisplatino.

El cisplatino demostró eficacia clínica para el tratamiento de diferentes tipos de cáncer incluyendo sarcomas, cáncer de tejidos blandos, óseos, musculares, vasos sanguíneos, cáncer de ovario, testículos, cérvix, mama, cabeza, vejiga, cabeza, cuello, esófago, cáncer de pulmón de células no pequeñas, mesotelioma, cáncer cerebral y neuroblastoma [17].

Sin embargo, los efectos adversos asociados al cisplatino, debido a su acumulación renal y nefrotoxicidad condujeron a la búsqueda de compuestos con similar espectro de acción y eficacia clínica, pero con mejor perfil de farmacoseguridad, lo que dio origen a la segunda generación de complejos de platino, en los cuales se hipotetizó que la conservación de la parte diamina del complejo y la sustitución de los átomos de cloro por grupos más estables, reduciría la toxicidad y haría más predecible el perfil farmacocinético del medicamento [18]. El carboplatino (Figura 1.5-2), el cual fue aprobado por la FDA en 1989 para el tratamiento de cáncer de ovario, pulmones, cuello y cerebro, ofrece ventajas sobre el cisplatino, ya que mostró menos nefrotoxicidad, neurotoxicidad y una severidad reducida de las náuseas y el vómito tras su administración [19].

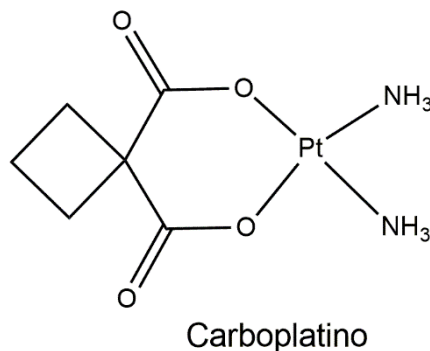


Figura 1.5-2 Estructura química del carboplatino.

Finalmente, en 2002 la FDA dio aprobación para uso del oxaliplatino (Figura 1.5-3), el cual pertenece a la tercera generación de complejos basados en platino para el tratamiento del cáncer, cuya principal característica es su efectividad ante el cáncer de colon, que hasta el momento había sido resistente al cisplatino y carboplatino [18,20].

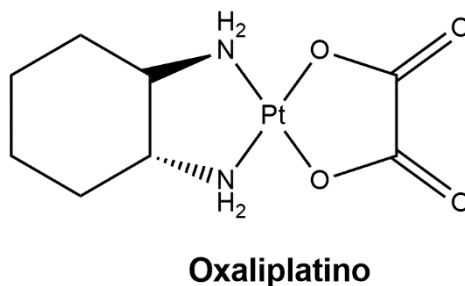


Figura 1.5-3 Estructura química del oxaliplatino.

El mecanismo de acción generalmente aceptado para los complejos derivados de platino (II) de la familia del cisplatino, es la formación de aductos estables con el nitrógeno 7 de dos guaninas vecinas en la hebra del ADN, lo cual causa un bloqueo en la síntesis del ADN, arresto del ciclo celular en la fase G<sub>2</sub> e inducción de muerte celular desencadenando mecanismos de apoptosis. Estos complejos actúan de una manera análoga a los

quimioterapéuticos de tipo alquilantes como la ciclofosfamida, mitomicina, entre otros [21].

El cisplatino y sus derivados demostraron los efectos benéficos de los complejos de metales de transición como agentes farmacoterapéuticos para el tratamiento del cáncer, lo que abrió una puerta de una fuente prácticamente ilimitada de posibles agentes terapéuticos ya que las combinaciones posibles entre ligandos y metales es prácticamente infinita.

Con el objetivo de reducir los efectos adversos asociados a la acumulación de platino en el cuerpo, muchos investigadores optaron por sintetizar complejos que incluyeran metales esenciales para el cuerpo humano, que contaran con mecanismos de detoxificación propios, conduciendo al desarrollo de complejos de hierro, cobre, vanadio, cobalto y zinc [22].

En los últimos años se han incluido estudios con complejos de metales como rutenio, iridio, plata, paladio, galio, titanio y oro [23–27].

## 1.6. Cobre

### 1.6.1. Generalidades del cobre.

El cobre es un elemento traza ubicuo en todos los sistemas vivos y es un cofactor en diferentes enzimas, principalmente como en las que involucran reacciones de tipo oxidorreducción y transporte de electrones. La abundancia promedio de cobre en la corteza terrestre es de 55 ppm, la cual es aproximadamente 900 veces menor con respecto al hierro [28].

En eras primigenias en la naturaleza, se requerían reacciones de tipo oxidación; el elemento químico presente con las condiciones necesarias para esto era el hierro, cuya forma predominante era el estado II, sin embargo, la evolución de las formas vegetales y la aparición del proceso fotosintético, trajeron consigo un drástico aumento de la concentración de oxígeno en el globo, lo cual cambió por completo el estado redox de la tierra y ocasionó que el hierro presente en la corteza fuera oxidado de su estado II al III, donde la forma oxidada ya no estaba disponible dado que precipitó como  $\text{Fe}(\text{OH})_3$  y  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ . Debido al mismo entorno oxidante el cobre también sufrió un cambio y pasó del estado I al II, y se hizo disponible en la naturaleza de forma soluble. La presencia del cobre II hizo que la naturaleza lo usara como moneda de cambio en la mayoría de sus reacciones enzimáticas que involucran procesos de óxido-reducción. [29].

### 1.6.2. Química del cobre

El cobre es un elemento químico que pertenece a la primera serie de transición. Los estudios relacionados con el uso de cobre a nivel terapéutico se han basado en los estados de oxidación más comunes de este, I y II [30,31]. El cobre (I) tiene una configuración electrónica de capa llena  $d^{10}$ , lo que hace que él tenga preferencia por formar complejos con átomos blandos como azufre, fósforo y nitrógenos aromáticos [32]. Mientras que los átomos de cobre (II) tienen una configuración electrónica  $D^9$ , la cual

favorece la formación de entre 4 y 6 tipos de geometrías de coordinación y permite sintetizar complejos con una amplia variedad de ligandos, principalmente aquellos que aporten átomos como nitrógeno, oxígeno y azufre. También cabe mencionar que los complejos formados con átomos divalentes serán más estables, por lo que los complejos de cobre (II) ha sido de amplio interés para la química bioinorgánica enfocada en la farmacología [30,33].

Santini, Iakovidis, Marzano e incluso en nuestro grupo hemos publicado revisiones literarias en las cuales se muestra el amplio espectro de posibilidades de ligandos que pueden formar complejos con cobre y de una manera sistemática “armar” complejos para que lleguen a dianas terapéuticas deseadas, adquieran propiedades fisicoquímicas determinadas y/o efectos farmacológicos diferenciales [31–33].

### 1.6.3. Homeostasis del cobre

El cobre es el tercer metal de transición más abundante en el cuerpo humano, luego del hierro y del zinc [34]. El porcentaje de cobre en el cuerpo humano es aproximadamente  $1.57 \times 10^{-4} \% \text{ (P/p)}$ . En general, la mayor concentración de cobre se encuentra a nivel hepático, seguido por el cerebro, los pulmones, los riñones y ovarios. Cantidades relativamente elevadas de cobre también se encuentran en la parte pigmentada del ojo [34,35].

La principal fuente de cobre para los humanos proviene de la dieta, se encuentra en alta cantidad en crustáceos, mariscos, granos y semillas. La absorción del cobre ocurre en el estómago y en mayor proporción en el intestino delgado [35]. Los iones cobre, una vez que entran en el torrente sanguíneo se unen a transportadores de cobre en para ser llevados desde el intestino hasta el hígado, la ceruloplasmina es la mayor responsable del cobre en el torrente sanguíneo [34,36].

El cobre es un metal de transición que se caracteriza por tener un potencial de reducción de solo 158 mV, para la dupla Cu (II)/Cu (I) en agua. Su utilidad a nivel biológico deriva principalmente de su capacidad para cambiar fácilmente de su forma oxidada a su forma reducida. Por esta razón es utilizado por un gran número de enzimas asociadas a reacciones de óxido-reducción [37].

### 1.6.4. Regulación intracelular del cobre

El cobre es un elemento traza esencial vital en todos los organismos vivos que dependen del metabolismo oxidativo [29], se encuentra incorporado de forma constitutiva en una amplia variedad de proteínas y como cofactor en varias metaloenzimas, además, presenta funciones en formación de tejido conectivo, metabolismo del hierro, angiogénesis, respuesta a la hipoxia, señalización intracelular, mantenimiento del balance redox a nivel intracelular, neuromodulación, entre otros [38].



En la Tabla 1.6-1 se enumeran algunas de las enzimas dependientes de cobre que se encuentran en células de mamíferos.

Dada la alta reactividad del cobre, las células han desarrollado mecanismos sofisticados para controlar el ingreso, excreción y movimiento de cobre a nivel intracelular. Es relevante notar que la gran mayoría del cobre que captado por la célula se encuentra en su forma reducida (I), el cual va a ser estabilizado por el microentorno reductor intracelular y se unirá a átomos blandos por ejemplo de azufre (presentes en el glutatión y metalotioneínas), nitrógeno (presente en la chaperona de cobre para la enzima superóxido dismutasa (SOD)), esta interacción con átomos blandos favorecerá el traspaso del átomo de cobre de una proteína a otra o al sitio en que sea requerido de una manera termodinámicamente favorable [39]. Las proteínas involucradas en el transporte intracelular de cobre se encuentran resumidas en la Tabla 1.6-2.

*Tabla 1.6-1 enzimas dependientes de cobre [40].*

Enzima	Función
Citocromo c oxidasa	Fosforilación oxidativa
Superóxido dismutasa dependiente de Cu, Zn (SOD1)	Detoxificación de superóxido y señalización celular
Ceruloplasmina (Cp)	Ferroxidasa
Lisil oxidasa (LOX)	Entrecruzamiento de colágeno y elastina
Tirosinasa	Síntesis de melanina
Dopamina- $\beta$ -monooxigenasa	Síntesis de norepinefrina
Enzima peptidilglicina $\alpha$ -amidante	Activación de hormonas peptídicas
Amina oxidasa de cobre	Desaminación de aminas
Factores de coagulación V y VIII	Coagulación sanguínea

La captación del cobre a nivel intracelular es predominantemente mediada por el receptor transportador de cobre 1 (Ctr1). Se ha reportado que este receptor solo transporta el cobre en estado de oxidación 1, el cual es provisto por una cuproreductasa y/o por un proceso de reducción químico mediado por compuestos como el ascorbato. A nivel intracelular, el cobre (I) es secuestrado por el glutatión reducido (GSH) o almacenado en metalotioneínas. Mientras que el transporte del cobre nivel intracelular en los lugares requeridos es ejecutado por chaperonas, como CCS hacia la SOD1, por COX17 hacia la citocromo C oxidasa o por Atox1 hacia ATP7A para ingresar al complejo de Golgi. De igual manera la excreción de cobre se hace a través de la ATP7A, en vesículas formadas en el complejo de Golgi o cuando está incluido en proteínas sintetizadas por la célula [38,40,41]. En la Figura 1.6-1 se representa de forma esquemática el movimiento intracelular del cobre.

Tabla 1.6-2 Proteínas involucradas en la homeostasis intracelular del cobre [40].

Proteína	Función
Receptor transportador de cobre 1 (Ctr1)	Captación de cobre
Receptor transportador de cobre 2 (Ctr2)	Captación de cobre
Transportador de metales divalentes 1 (DMT1)	Captación de cobre
Chaperona de cobre para superóxido dismutasa (CCS)	Transporte intracelular del cobre
ATOX1	
Cox17	
Glutación reducido (GSH)	Transporte intracelular del cobre, almacenamiento y detoxificación.
Metalotioneína	Almacenamiento y detoxificación
ATP7A	Excreción de cobre
ATP7B	

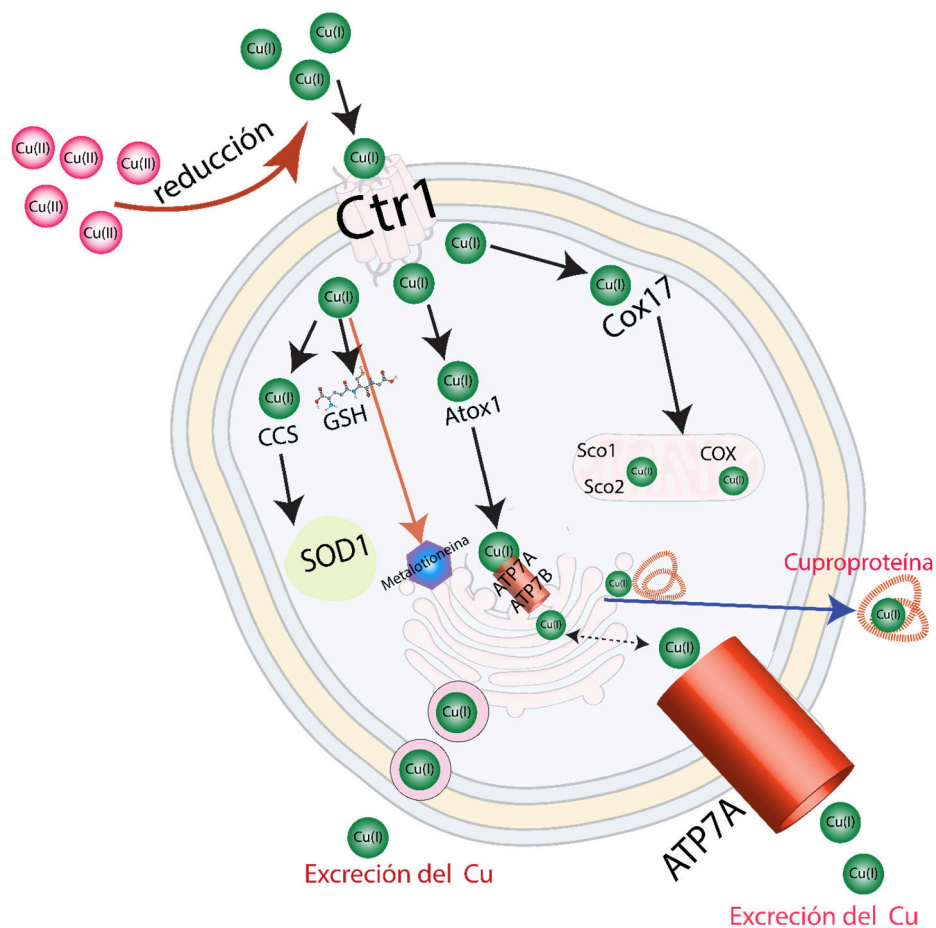


Figura 1.6-1 Representación esquemática del sistema de homeostasis y tráfico intracelular del cobre.

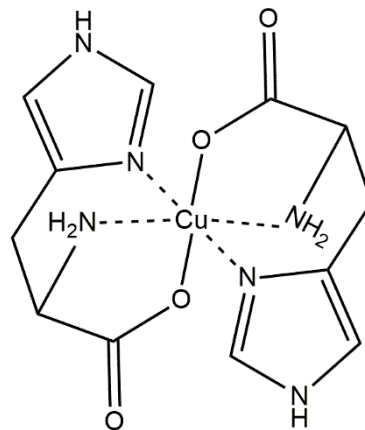
### 1.6.5. Cobre y enfermedades asociadas

#### Enfermedad de Menkes

La enfermedad de Menkes es un error innato en el metabolismo de cobre, se manifiesta en los recién nacidos y se caracteriza por alteraciones en el canal ATP7A. La enfermedad se manifiesta con degeneración neuronal, caída de cabello, hipotermia, hipotonía, alteraciones musculoesqueléticas, convulsiones mioclónicas, bajas concentraciones plasmáticas de cobre y ceruloplasmina. La expectativa de vida de los pacientes sin tratamiento es de aproximadamente 3 años [42].

Fisiopatológicamente se define por la alteración del transportador citoplasmático de cobre, ATP7A, que se encarga de la excreción de cobre a nivel intracelular y el ingreso del cobre (I) al aparato de Golgi cuando se requiere sintetizar enzimas y cuproproteínas, en la enfermedad de Menkes, este transportador se encuentra mutado, causando una acumulación de cobre en el intestino delgado, pero imposibilitando que el cobre alcance a ser biodisponible por lo que paradójicamente causa una deficiencia sistémica de cobre [43].

El tratamiento farmacológico para la enfermedad de Menkes se basa en la administración subcutánea de un complejo de cobre con histidina, con el objetivo de aumentar la biodisponibilidad del cobre y reducir los daños a nivel cerebral [44,45].



Complejo Cobre histidina

*Figura 1.6-2 Estructura química del complejo de cobre con histidina para el tratamiento de la enfermedad de Menkes.*

#### Enfermedad de Wilson

El consumo de cobre en la dieta excede la necesidad metabólica del mismo, la homeostasis en el cuerpo de la excreción de cobre se da exclusivamente de forma biliar. La enfermedad de Wilson es un desorden hereditario asociado a la alteración de la excreción de cobre conduciendo a una acumulación a nivel hepático y cerebral.

La enfermedad de Wilson se debe a una mutación en el transportador de cobre ATP7B, expresado principalmente en los hepatocitos, el cual es responsable de la ruta secretora de cobre hacia la bilis y de la incorporación de este en la apo-ceruloplasmina. La enfermedad cursa a nivel clínico con afecciones hepáticas como cirrosis, alteraciones

neuropsiquiátricas, la aparición de anillos Kayser-Fleischer en la córnea y episodios agudos de hemólisis, a menudo asociados con falla hepática aguda [46].

La terapia farmacológica de la enfermedad de Wilson se basa principalmente en eliminar el exceso de cobre. Se emplean diferentes agentes terapéuticos que forman complejos de cobre, entre los que se encuentran como la D-penicilamina, la cual incrementa la excreción urinaria del cobre, forma un complejo hidrosoluble construido por dos moléculas de penicilamina y un átomo de cobre, la penicilamina también puede inducir la síntesis de metalotioneínas para secuestrar el exceso de cobre intracelular [47].

La trientina es un ligando tetradentado, que forma un complejo estable de geometría cuadrada planar de cobre por cada molécula de ligando. El complejo es eliminado vía urinaria [47].

El tetratiomolibdato de amonio es un agente quelante de cobre, en el tracto intestinal previene la absorción de cobre proveniente de la dieta. En la Figura 1.6-3 se presenta la estructura química de los diferentes quelantes de cobre para el tratamiento de la enfermedad de Wilson y en la Figura 1.6-4 se presenta la estructura química de los complejos de cobre formados con D-penicilamina, trientina y tetratiomolibdato de amonio.

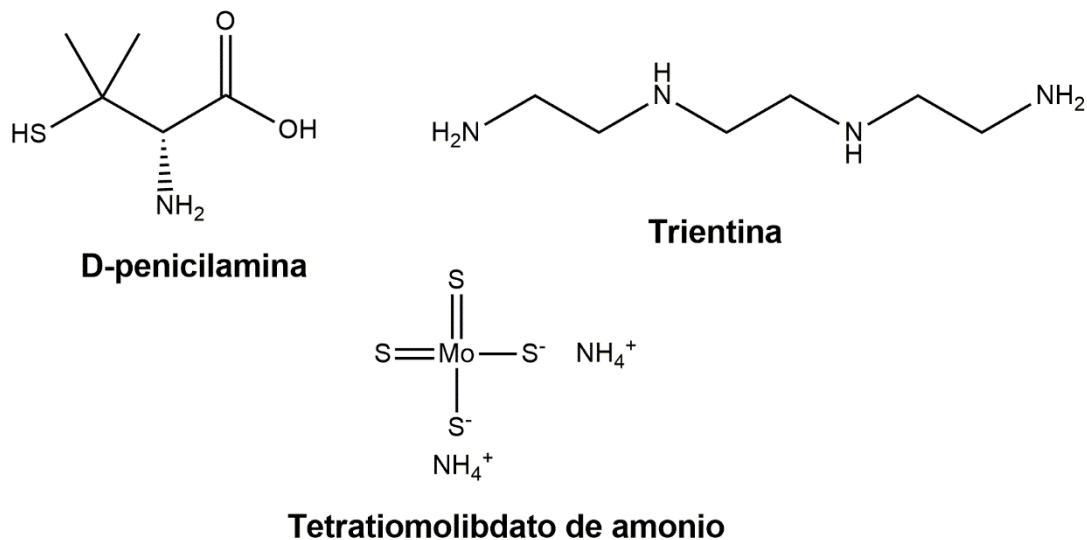
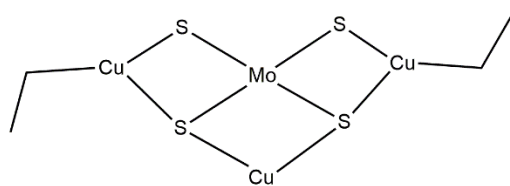
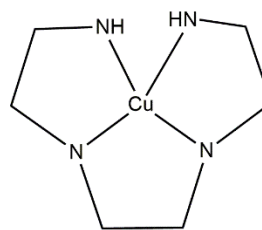
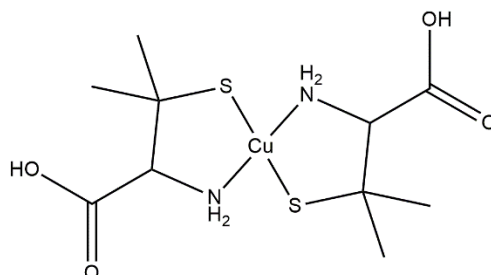


Figura 1.6-3 Estructura química de los compuestos empleados en el tratamiento de la enfermedad de Wilson.

**Complejo de cobre con tetratiomolibdato****Complejo de trientina con cobre****Complejo de penicilamina con cobre**

*Figura 1.6-4 complejos de cobre con tetratiomolibdato, penicilamina y trientina en el tratamiento de la enfermedad de Wilson.*

### 1.6.6. Complejos de cobre con actividad antitumoral in vitro

Se han investigado complejos de coordinación de cobre bajo el supuesto de que los metales endógenos pueden ser menos tóxicos para las células normales con respecto a las células cancerosas. Sin embargo, el cobre también puede ser tóxico debido a su actividad redox y afinidad por los sitios de unión que deben ser ocupados por otros metales. El metabolismo alterado de las células cancerosas y la respuesta diferencial entre las células normales y tumorales al cobre son la base para el desarrollo de complejos de cobre dotados de características antineoplásicas.

A pesar de que la concentración de cobre en el cuerpo humano está estrechamente regulada en los niveles de células, órganos y cuerpo, los niveles séricos de cobre fueron encontrados alterados en muchos tipos de cáncer, incluyendo mama [48], próstata [49], colon [50], pulmón [51] y cerebro [52]. Las razones de esta elevación parecen estar relacionadas con el papel crítico que desempeña el cobre en la angiogénesis [53], que es esencial para el crecimiento, la invasión y la metástasis [54]. Por lo tanto, el empleo de quelantes de cobre se han postulado de valor terapéutico en el tratamiento de varios tipos de cánceres como moléculas antiangiogénicas [55].

Los complejos de cobre han sido sujetos a numerosos estudios como antitumorales y muchos de ellos han demostrado ser activos como agentes anticancerígenos o anticarcinogénicos en sistemas in vitro e in vivo [56–58].

La actividad antitumoral de complejos de cobre con tiosemicarbazonas se ha reportado desde 1960 [59] y en la actualidad siguen siendo de interés científico con un desarrollo continuado de este tipo de complejos [60,61].

Nuevos complejos de cobre con tiosemicarbazonas mostraron actividad anticancerígena en células de neuroblastoma resistentes a cisplatino a través de inhibición del crecimiento celular dependiente de la dosis, arresto del ciclo celular e inducción de apoptosis [61]. Se ha demostrado que un complejo de cobre dimérico con la tiosemicarbazona derivada de piridoxal induce apoptosis en las líneas celulares humanas CEM y U937, pero fue inactivo en las K562. A pesar de esta citotoxicidad carece de actividad in vivo en el linfoma TLX5. Además, altera significativamente el ciclo celular en las células U937 y CEM, también disminuye la actividad telomerasa de U937. Sin embargo, los complejos de cobre con tiosemicarbazonas con piridoxal N-sustituidos no mostraron inhibición de la proliferación en las tres líneas celulares [62].

Las isoflavonas pertenecen a una de las subclases de flavonoides que muestran extensas actividades biológicas y acciones antitumorales [63,64]. Los complejos del cobre (II) demostraron eficacia citotóxica moderada contra cinco líneas celulares del cáncer humano (A549, HeLa, HepG2, SW620, y MDA-MB-435), con valores de IC50 en los rangos de 10 a 50  $\mu$ M [65]. Los resultados indicaron que los complejos poseen mayores efectos inhibitorios en el crecimiento celular que las isoflavonas libres y los iones metálicos correspondientes. Además, por citometría de flujo del contenido de ADN demostró que los complejos exhiben un significativo arresto del ciclo celular en la fase G2/M y una posterior inducción de apoptosis temprana.

Otros flavonoides biológicamente activos como hesperidina y apigenina se han reportado por exhibir efectos antitumorales contra el cáncer de mama y las líneas celulares de hepatoma [66]. Complejos de cobre con hesperidina y apigenina demostraron inhibir el crecimiento de las líneas celulares de SGC-7901 y de HepG2 con respecto a los ligandos libres [67].

En un estudio reciente se ha demostrado que un complejo de cobre (II) con quercetina ocasiona el clivaje del ADN plasmídico, produciendo roturas simples y dobles en las hebras del ADN, también se intercala entre los pares de bases del ADN e induce daño oxidativo en el ADN mediado por la generación de especies de oxígeno reactivas (ROS). Además, los experimentos realizados con células A549 confirmaron su actividad inductora de apoptosis reduciendo la expresión de la proteína survivina y un aumento en la activación de caspasa-3 [68].

El ácido santónico se utilizó como ligando en un complejo de cobre (II), el cual demostró actividad citotóxica contra cuatro líneas celulares (MC3T3-E1, UMR-106, Caco-2 y TC7) [69]. El fármaco antihipertensivo valsartán se usó como ligando en un complejo de cobre II a través de su grupo carboxilato dando origen a un complejo binuclear de cobre (II). Se demostró que el valsartán en concentraciones hasta 100 mM no tuvo efecto sobre dos líneas celulares de origen óseo (células MC3T3-E1 y UMR-106), mientras que su complejo

de cobre mostró actividad antiproliferativa en ambas líneas celulares en el rango micromolar [70].

Desde hace mucho tiempo, se ha encontrado que el cobre posee una alta afinidad por el ADN [71]. Se ha demostrado que los compuestos derivados de cobre interactúan con éste de manera no covalente. Las interacciones incluyen la intercalación entre los pares de bases, la interacción electrostática y la unión del complejo en los surcos mayores y menores del ADN [30].

Muchos estudios revelaron que los complejos de cobre promueven el clivaje del ADN plasmídico en condiciones fisiológicas de una manera oxidativa [72–74]. Este fenómeno ocurre a través de una reacción de tipo Fenton, produciendo ROS como el radical hidroxilo [75] o diferentes productos intermedios basados en el estado de oxidación del metal, que a su vez, causan la oxidación directa y el corte en el ADN [76]. Como consecuencia del daño en el ADN, muchos complejos de cobre activan la vía de muerte celular apoptótica, produciendo regulación al alza de las proteínas proapoptóticas (Bax y Bak) o la regulación a la baja de Bcl-2 [77].

Por otro lado, investigaciones recientes han demostrado la capacidad de los complejos de cobre para inhibir Topoisomerasas, enzimas que regulan el enrollamiento y desenrollamiento del ADN [78]. Los inhibidores de la topoisomerasa han sido postulados como fármacos relevantes en la farmacoterapia oncológica. Se encontró un complejo de cobre de 2-furaldehídooxina que altera la actividad de la topoisomerasa bloqueando la activación de la fosforilación [79].

Recientemente, una serie de nuevas bases de Schiff de tipo quinolinas y sus correspondientes complejos de cobre (II) fueron en células HepG2 como inhibidores de la topoisomerasa. Los resultados indicaron que la complejación sirvió para mejorar significativamente la citotoxicidad mediada por la inhibición de la síntesis del ADN de manera dependiente de la concentración y el tiempo [80].

Otro mecanismo por el cual los complejos de cobre ejercen su actividad antitumoral es a través de la inhibición del proteosoma. El proteosoma es un gran complejo multi proteico localizado tanto en el núcleo como en el citoplasma. La función principal del proteosoma es degradar las proteínas no necesarias o dañadas, una reacción química que rompe los enlaces peptídicos. El proteosoma es parte de un mecanismo importante por el cual las células regulan muchas funciones primarias como proliferación, apoptosis, angiogénesis, y metástasis [81]. Se ha demostrado que las células tumorales son más sensibles a la inhibición del proteosoma que las células normales. Varios complejos de cobre, como el cobre (II) bis-8-hidroxiquinolinato puede inhibir de manera potente y selectiva la actividad del proteosoma in vitro e in vivo en las células de leucemia humanas. Ni la inhibición del proteosoma ni la apoptosis ocurren en las células natural killer humanas no transformadas, inmortalizadas bajo el mismo tratamiento [82].

Se ha establecido que ciertos tipos de ligandos orgánicos podrían unirse al cobre presente en el interior de células tumorales, formando potentes inhibidores de proteasoma e inductores de apoptosis [23].

Se ha observado que los complejos ternarios con 1, 10-fenantrolina son inhibidores más potentes del proteasoma e inductores de la apoptosis que los complejos binucleares en células de cáncer de próstata humano PC-3. Además, los complejos ternarios inhiben la actividad del proteasoma previamente a la inducción de la apoptosis en las células MDA-MB-231 de cáncer de mama, pero no en las células no tumorales MCF-10A, sugiriendo que los complejos de cobre con 1, 10-fenantrolina podrían servir como inhibidores selectivos del proteosoma e inductores de la apoptosis en células tumorales [83]. Se ha hipotetizado que el mecanismo de acción se basa en el hecho de que la fenantrolina transporta el cobre al interior de la célula, causando la inhibición directa del proteosoma y/o oxidándolo, causando la desactivación del complejo multiproteico.

Aunque muchos complejos de cobre se han propuesto como prometedores agentes citotóxicos con base en los ensayos in vitro, no se han esclarecido totalmente los blancos moleculares de estos compuestos y las rutas de señalización celular activado, no obstante, se han propuesto parcialmente varios mecanismos de acción (Figura 1.6-5).

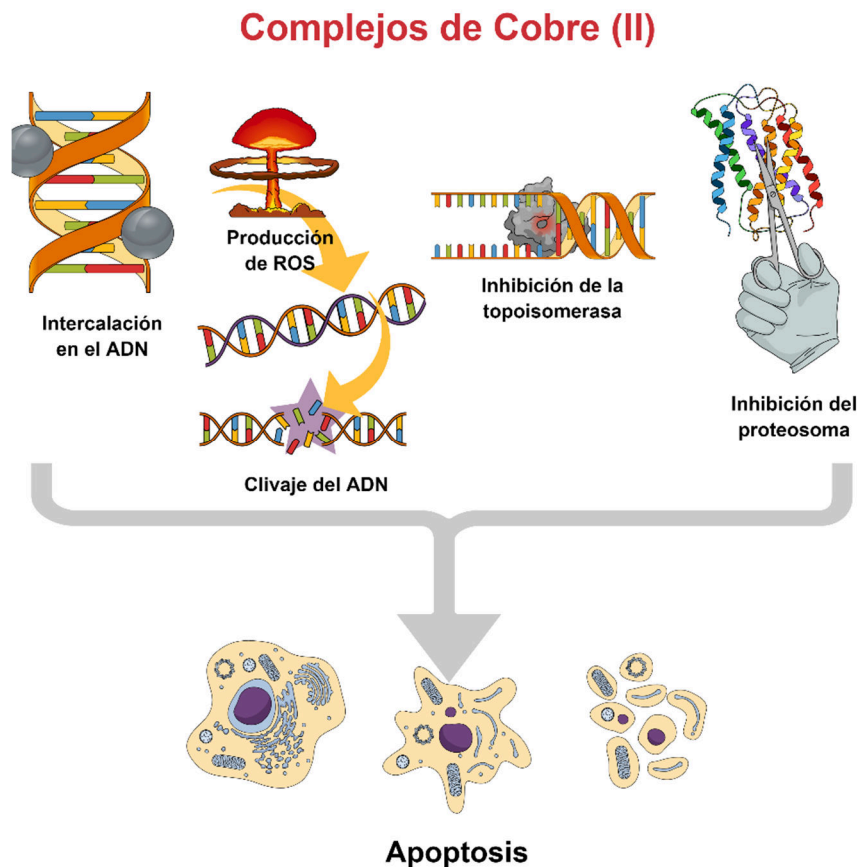


Figura 1.6-5 Resumen esquemático de los mecanismos de acción ejercidos por los complejos de cobre (II) para inducir muerte celular.

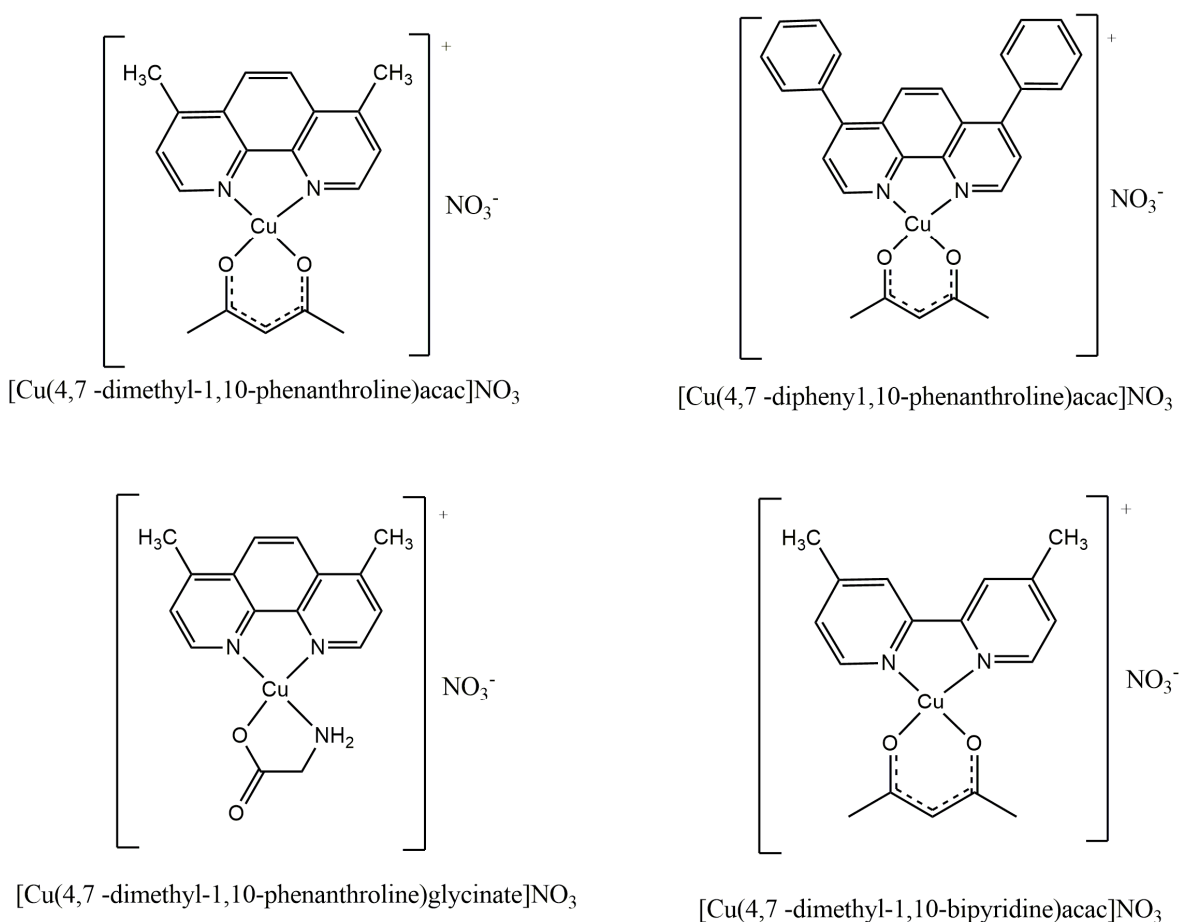


### Estudios preclínicos de complejos de cobre (casiopéinas®)

Las casiopéinas® son una familia de complejos de cobre (II) con fórmula general  $[\text{Cu}(\text{N}-\text{N})(\text{N}-\text{O})\text{H}_2\text{O}]\text{NO}_3$  o  $[\text{Cu}(\text{N}-\text{N})(\text{O}-\text{O})\text{H}_2\text{O}]\text{NO}_3$ , siendo los ligandos bidentados N-N son heterociclos nitrogenados del tipo 1,10-fenatrolina o 2,2' bipiridina sustituidos en diferentes posiciones con radicales metilo, fenilo o nitro; mientras que el ligando con grupos donores del tipo N-O puede ser un aminoácido esencial y el ligando donante O-O puede ser acetetilacetato o salicilaldehído [84].

La combinación de los ligandos ha dado origen a un grupo de alrededor de 100 compuestos agrupados en nueve subclases. En la Figura 1.6-6 se presenta la estructura química de algunas casiopéinas®.

Los autores describieron un mecanismo de apilamiento entre Casiopéinas® y las bases nitrogenadas del ADN que produce quiebres en las hebras del ADN. Dicho comportamiento ha sido demostrado tanto en el clivaje del plásmido pUC19 como en células HeLa. [85,86]. Además, se ha demostrado que los ligandos diiminícos (N-N) podrían interactuar con el ADN como intercalantes [74,87–90]. Propiedades fisicoquímicas, como la planaridad, la hidrofobicidad y el tamaño del ligando donador de nitrógenos, la naturaleza de la coligando, así como la geometría de coordinación del complejo metálico, juegan un papel importante en el modo de unión/intercalación de las casiopéinas® con el ADN [30].



*Figura 1.6-6 estructura química de algunas casiopeínas.*

### 1.6.7. Homeostasis del zinc y complejos relacionados con actividad antitumoral.

El zinc es un oligoelemento esencial que tiene un rol protagónico en la transcripción del ADN y se requiere en numerosos procesos enzimáticos, como parte del centro activo de proteínas involucradas en la señalización y la diferenciación celular, así como en la unión de ADN con variados elementos reguladores [91,92]. Es un elemento que afecta a mediadores clave del sistema inmune, tiene importancia en enzimas, péptidos, citocinas, en los reguladores de la activación de células linfoides, la proliferación celular y en procesos apoptóticos. Al reducir la cantidad de citocinas inflamatorias, merma el riesgo de rebrote del tumor [93–95].

Además, el zinc es muy importante en la síntesis de ADN, y un componente integral de enzimas que intervienen en la división celular, como la ADN-polimerasa, la transcriptasa inversa, la ARN-polimerasa, la tARN-sintetasa y el factor de alargamiento de cadenas proteicas [96]. Al tener influencia en algunas de las enzimas que participan en la síntesis de ADN y ARN, el zinc está relacionado con el ciclo celular. Además, el zinc ha sido identificado como parte de enzimas, participando de forma estructural o participando en los procesos catalíticos. Entre esos sistemas enzimáticos, se encuentran la anhidrasa carbónica, carboxilpeptidasa, fosfatasa alcalina, oxidoreductasas, transferasas, ligasas, hidrolasas, lisasas e isomerasas [97].

El hallazgo de esta correlación entre el zinc y los ácidos nucleicos ha sido importante a la vista de la observación clínica, ya que ha dejado en evidencia que las funciones celulares que implican la replicación de ADN se ven perturbadas con la deficiencia de zinc. Esos procesos incluyen el crecimiento celular, procesos inmunitarios, la fertilidad, la cicatrización de heridas y los niveles de proteínas [98].

El cuerpo humano tiene, en promedio, 2-3 g de zinc (después del hierro, es el metal de transición con mayor abundancia en el cuerpo humano), y aproximadamente 1 mg/L en plasma. Las células cancerosas sólo pueden manifestarse si el entorno lo permite. Por lo tanto, el enfoque nutricional de la prevención del cáncer es proporcionar un ambiente hostil a las células malignas. Una forma de hacerlo es mejorar la inmunidad general utilizando nutrientes como el zinc [99,100]. Cuanto mayor sea el nivel de zinc en el cuerpo antes del tratamiento de quimioterapia, mayor probabilidad de remisión [101]. La suplementación con zinc puede mejorar el curso clínico en pacientes con cáncer. Curiosamente, el Zn(II) también es un fuerte inductor de estrés oxidativo, ya que puede desencadenar la producción de ROS a través de vías mitocondriales e interferir con la actividad de la cadena de transporte de electrones [102,103]. El Zn(II) también puede modular las vías extra mitocondriales involucradas en la generación de ROS promoviendo el aumento de la actividad de NADPH oxidasa, la activación de la proteína quinasa C, así como la inducción de óxido nítrico sintasa (Nnos), que junto con el anión superóxido pueden producir especies dañinas, como los peroxinitritos (ONOO<sup>-</sup>) [104–106].

Se encontró que un complejo de Zn(II) con el ligando 1-hidroxipiridina-2-tiona incrementa la concentración intracelular de zinc libre, lo que a su vez produce un efecto antiproliferativo de la línea celular de carcinoma pulmonar A549, mientras que no se observa ningún efecto tóxico in vivo [107]. Por otro lado, el complejo [Zn(3-Mepic)2fenantrolina]·5H<sub>2</sub>O inhibe eficientemente la topoisomerasa I, y es citotóxico sobre la línea celular MCF7 [108]. Por su parte, un complejo ternario de Zn(II) con los ligandos 1,10'-fenantrolina y ácido etilendiaminoacético, disminuye selectivamente la viabilidad celular de la línea MCF7 de cáncer de mama, induciendo arresto del ciclo celular [109].

## 1.7. Apoptosis y muerte celular

### 1.7.1. Tipos de muerte celular: necrosis y apoptosis

La necrosis es la muerte celular patológica, se puede reconocer por características morfológicas en el citoplasma, pérdida de la estructura normal; en el núcleo, picnosis (retracción del núcleo con condensación de la cromatina), cariolisis (disolución del núcleo) o cariorexis (fragmentación del núcleo en trozos con cromatina condensada). La picnosis, cariolisis y cariorexis son formas diferentes de alteración nuclear, y no representan etapas del daño. Las alteraciones citoplasmáticas y nucleares se dan de forma paralela, por lo que son coexistentes.

Al ser un proceso pasivo, la necrosis no requiere de síntesis proteica, lo que causa la pérdida de la homeostasia. Hay daño mitocondrial, se compromete la integridad de la membrana, hay lisis celular y se libera el contenido celular al medio extracelular [110]. La necrosis es la enfermedad patológica más grave a nivel celular. Se excluye de esta categoría toda muerte que no sea consecuencia de una enfermedad, por ejemplo, la apoptosis que ocurre en la muerte celular normal de los tejidos lábiles, que en condiciones normales están sometidos a recambio de células (células epidérmicas, epitelio respiratorio y digestivo, eritrocitos, entre otros). También se deja de lado la muerte celular debida a la remodelación de órganos en desarrollo. Los procesos de muerte celular cadavéricos, tampoco se consideran como muerte necrótica [111].

Por su parte, la apoptosis es la muerte celular programada es una forma genéticamente definida de suicidio celular. La apoptosis ocurre de forma fisiológica durante la morfogénesis, la regulación del sistema inmunitario y la renovación tisular. Algunos hechos celulares, como la transformación y la progresión tumoral, pueden ser explicados por trastornos en la regulación de los genes responsables de la apoptosis [112]. Los mecanismos reguladores de la muerte celular son esenciales para el desarrollo corriente y el mantenimiento de la homeostasia. El control del crecimiento celular está regulado por genes que generan señales de muerte en estadios definidos de diferenciación y como consecuencia de determinados estímulos fisiológicos [113]. La apoptosis es desencadenada por diversas señales, tanto fisiológicas como exógenas e interviene en múltiples procesos fisiológicos como la embriogénesis, la regulación homeostática, la renovación tisular, y el desarrollo y mantenimiento del sistema inmunitario [112].

Cuando la apoptosis sufre trastornos en su regulación, se producen diversas enfermedades autoinmunes y neurodegenerativas. La apoptosis también participa en la eliminación de células defectuosas, por lo que su desregulación puede ser una causa del desarrollo de diversos tumores [114].

Las características celulares de una célula apoptótica difieren de las de una necrótica. En la Tabla 1.7-1, se presentan las diferencias entre la apoptosis y la necrosis [111].

*Tabla 1.7-1. Diferencias entre Necrosis y Apoptosis.*

	<b>Apoptosis</b>	<b>Necrosis</b>
Estímulo	Fisiológico	Patológico
Presentación	Célula aislada	Grupo de células
Adhesión celular	Pérdida precoz	Pérdida tardía
Núcleo	Pérdida de límites nucleares (cariorrhexis)	Desaparición (cariolisis)
Fragmentación del ADN	Entre nucleosomas	Aleatorio
ADN gel de agarosa	Presente	Ausente
Fagocitosis	Ausente	Presente
Inflamación	Ausente	Presente

### 1.7.2. Características morfológicas de la apoptosis

A diferencia de la necrosis, la apoptosis es un proceso activo y como tal, implica la síntesis proteica, en la cual el núcleo y el citoplasma celular se condensan. Las características fisiológicas muestran condensación de la cromatina nuclear, desintegración nucleolar, encogimiento del núcleo, reducción del tamaño citoplasmático y de las organelas, con excepción de la mitocondria y los ribosomas. Hay alteraciones del citoesqueleto y un aspecto de burbuja de la membrana, aunque esta no llegue a fragmentarse. En las etapas finales de la apoptosis se produce una rotura internucleosomal del ADN y se forman cuerpos apoptóticos (fragmentos nucleares recubiertos de membrana), que son fagocitados sin evidencia de reacción inflamatoria [111]. Otra característica importante es que, durante el proceso de apoptosis, la fosfatidilserina deja de estar limitada al citosol celular y también queda expuesta en la superficie celular [115].

### 1.7.3. Caspasas

Como se dijo en el apartado anterior, la apoptosis es un proceso celular fundamental y de alta complejidad. Este proceso permite eliminar células cuyo material genómico está altamente dañado, y que por lo tanto no son deseadas en el desarrollo animal. La apoptosis también mantiene el equilibrio homeostático del individuo [111]. Hay múltiples maneras de iniciación de la apoptosis, por ejemplo, por la unión de determinados fármacos a la membrana celular, entre otros eventos [116]. Sin embargo, en la mayor parte de los procesos apoptóticos intervienen proteínas denominadas caspasas (cisteínil-aspartato proteasas). Éstas son un grupo de cisteín-proteasas que escinden las proteínas en las posiciones en que existe un grupo aspartato y están implicadas en la activación y ejecución del proceso apoptótico. Hay al menos 14 tipos diferentes de estas proteínas en humanos. Bajo condiciones normales se encuentran inactivas como procaspasas. La

procaspasa-3 se procesa por cortes autocatalíticos [117]. Las caspasas tienen un rol fundamental en todo el ciclo de vida animal, primero en el proceso embrionario, y después en toda la vida del individuo [117]. En mamíferos, la activación de las procaspasas, para producir sus caspasas correspondientes (principalmente la procaspasa-3, que produce caspasa-3) genera un rápido desplegamiento de proteínas con funciones estructurales, de señalización, así como también enzimas reparadoras, lo que, a su vez, modifica la homeostasis de todas estas macromoléculas [112].

#### **1.7.4. Caspasas y cáncer**

El desarrollo del cáncer es impedido por diversos mecanismos implementados en las células. Esos mecanismos son capaces de reconocer mutaciones en el código genético y activan procesos de reparación genómica cuando esta defectuosa. Esto sucede de forma tal, que una célula con su código genético alterado es afectada antes de que el ADN con características oncogénicas se herede en la división celular a las células hijas, evitando de esta manera la enfermedad. Las caspasas son cruciales en el proceso de la apoptosis, por lo que la desregulación de estos sistemas enzimáticos y las vías en las que participan pueden generar la persistencia de células con material genético mutado y en consecuencia promover la aparición del cáncer [117]. Es indudable la importancia de las caspasas en la muerte de las células tumorales, sin embargo, a diferencia de la mutación en p53, la mutación de los genes que codifican a las caspasas (CASP) es infrecuente en las células tumorales humanas. Se ha demostrado que la inactivación de caspasas individuales no suele ser suficiente para interrumpir la cascada de las caspasas [117]. Las células cancerosas sobreviven inactivando los mediadores de señalización en las primeras etapas de la cascada de las caspasas [118]. Además, se sabe que en una variedad de tipos de cáncer se produce una disminución de la expresión de caspasas proapoptóticas [117]. Como se dijo, las mutaciones heredadas en genes CASP son relativamente infrecuentes, sin embargo, se han encontrado ciertos polimorfismos de caspasa que se cree alteran la abundancia y actividad de las caspasas con efectos variados en la creación de los tumores.

#### **1.8. Ciclo celular**

La proliferación celular se da cuando las células aumentan su contenido de moléculas y organelas, está acompañada de un crecimiento en la masa y el tamaño de las células. Las células duplican su contenido cromosómico y después se dividen originando dos células hijas con contenido genético idéntico. La proliferación se da de forma controlada de acuerdo con las necesidades generales del organismo [119]. La célula se puede encontrar en dos estados: la interfase (no hay división) o en el estado de división o Mitosis (fase M) (Figura 1.8-1). La interfase es el estado de la célula comprendido entre dos ciclos de mitosis y ocupa casi el 90 % del tiempo que dura el ciclo celular. Este periodo de no división engloba las fases G1, S y G2. La fase G1 (G de gap) es la primera del ciclo, en esta fase la célula puede quedar en estado de latencia, según el tipo celular, a ese periodo de latencia se le conoce como G0. En G1 la célula sintetiza proteínas, ARN y crece. Es el periodo que abarca desde que finaliza una mitosis y se da el inicio de la síntesis de ADN. En la fase S (síntesis), se produce la replicación del ADN. En la fase G2, se continúa con la

síntesis de proteínas y ARN, con el ADN previamente duplicado. La fase G2 se da por terminada cuando se condensa la cromatina al inicio de la mitosis. Por último, en la fase de mitosis (M), se da la división celular, en la cual una célula eucariótica somática progenitora se divide en dos células hijas idénticas.

La fase M, se divide a su vez en varias etapas, según los diferentes estadios de los cromosomas (profase, metafase, anafase y telofase). Finalmente, el ciclo celular cierra con la producción de la citocinesis, que se inicia en la telofase mitótica [120].

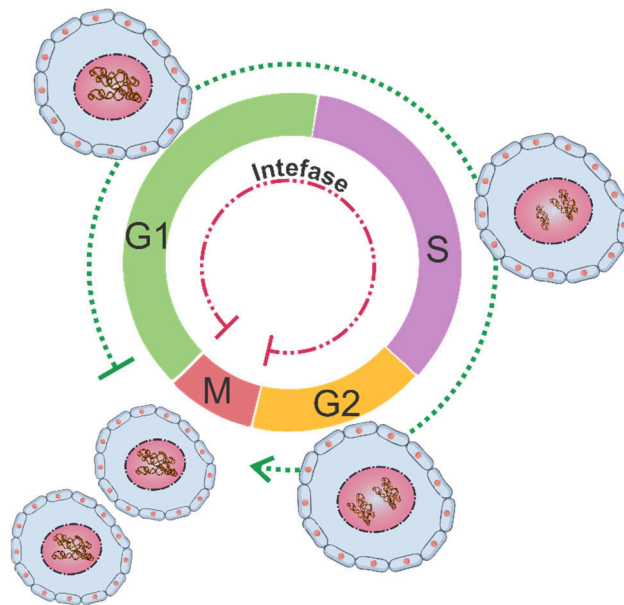


Figura 1.8-1 Esquema del ciclo celular y la cantidad relativa de ADN.

### 1.8.1. Control del ciclo celular

El ciclo celular se regula de forma heterogénea y depende del tipo de célula. Por ejemplo, las células epiteliales se dividen rápidamente, los glóbulos rojos pierden la capacidad de dividirse y las células hepáticas rara vez activan el ciclo celular (solo cuando se secciona una parte del hígado y hasta que recupera su tamaño original).

En cada una de las etapas del ciclo celular se hacen comprobaciones de que las células cumplan con las condiciones de tamaño, presencia de nutrientes, temperatura, entre otras, antes de ingresar en la siguiente etapa del ciclo. Si una célula no cumple estas condiciones, su ciclo celular es detenido y la célula deja de crecer o de dividirse [121].

Este sistema de control del ciclo celular depende de ciertos grupos de genes y de las proteínas codificadas por ellos [122]. Se pueden distinguir los siguientes:

- Genes codificadores de proteínas para el ciclo (enzimas y precursores de la síntesis de ADN, enzimas para la síntesis y ensamblaje de tubulina, etc.).
- Genes codificadores de proteínas que regulan positivamente el ciclo (protooncogenes). Estas proteínas activan la proliferación celular para que las células pasen a la siguiente

fase. Genes supresores de tumores. Codifican proteínas que regulan negativamente el ciclo. Evitan que la mitosis continúe si se ha producido una alteración del proceso normal.

Hay unos puntos de control en los que se lleva a cabo la verificación, que asegura la fidelidad de replicación y segregación o separación del genoma (separación de los cromosomas simples en anafase). Además de detectar fallos, en los puntos de control pueden ponerse en marcha mecanismos de reparación. Si una célula normal detiene su crecimiento, el ciclo celular se detiene en una etapa tardía de la fase G1, primer punto de control del ciclo celular. En algunos casos, las células antes de llegar al primer punto de control entran en una fase de latencia (G0), en la cual pueden detenerse por días, semanas o incluso años, según el tipo de célula, una vez dejan el estado de latencia continúan necesariamente a través del resto de las fases del ciclo, terminando en la fase M con la división. La fase G1 se completa de forma rápida. En la fase S empieza la síntesis de ADN y de histonas. En esta fase, existe otro mecanismo de control durante el proceso de duplicación del ADN que evita que la duplicación se dé más de una vez por ciclo. Cualquier error en el proceso de replicación de ADN en la fase S provoca la muerte apoptótica de la célula [121]. Después, la célula entra en la fase G2, en la cual hay otro punto de control, en el que se comprueba si la célula está por entrar en la fase M, por ejemplo, si existe daño en el código genético. Esto garantiza que solo se dividirán células que hayan completado la duplicación correcta de su material genético. En las células con errores, el ciclo se detiene y no entran a la fase M, sino que se inducen a morir por apoptosis [121].

### **1.8.2. Ciclo celular y cáncer**

El cáncer empieza cuando una célula escapa a los controles de división y muerte celular, comenzando a proliferar de forma desordenada y heredando a sus células hijas sus mutaciones genéticas. Todas las células que componen un tumor, ya sea benigno o maligno, son derivadas de una única célula [120].

La aparición de un cáncer (carcinogénesis) es la consecuencia de dos procesos que se dan de forma sucesiva [119]:

Aumento descontrolado de la proliferación de un grupo de células, lo que origina un tumor o neoplasia.

Las células tumorales adquieren capacidad invasiva, lo que les permite diseminarse desde su sitio de origen en el organismo, para colonizar otros tejidos u órganos y proliferar en ellos (metástasis).

## **1.9. Interacción de los complejos de metales de transición y su potencial mecanismo de acción a través de la alteración del balance redox**

La generación de ROS en general es un proceso fisiológico normal con varias funciones importantes para el organismo como el metabolismo de diferentes sustancias, la

transducción de señales, la regulación de las funciones celulares y la defensa inmune [123].

Los ROS con mayor relevancia fisiológica son el superóxido ( $O_2^-$ ), el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y el radical hidroxilo ( $OH^\bullet$ ). Se ha demostrado que estas especies están directamente involucradas en la regulación de diversas vías de transducción de señales importantes para la proliferación, diferenciación y muerte celular [123,124].

El entorno redox dentro de una célula difiere fuertemente en diversos compartimentos intracelulares [125]. Las organelas más activas de la célula redox son las mitocondrias, que en consecuencia son también los principales generadores intracelulares de ROS [126]. En contraste, el citoplasma se caracteriza por niveles bajos de ROS y un medio menos activo redox. Por lo tanto, se podría hipotetizar que el citoplasma, por un lado, funciona como zona tampón redox entre las organelas celulares y, por otro lado, permite la señalización de ROS específica [123].

La alta reactividad de los ROS hace que sea necesaria una estricta regulación para la supervivencia celular. Las células cuentan con sistemas de defensa antioxidantes que se encargan básicamente de neutralizar los ROS cuando exceden las concentraciones fisiológicas, estos se pueden dividir en cuatro frentes de acción; el primero son las enzimas de detoxificación como la superóxido dismutasa (SOD), la glutatión peroxidasa, la catalasa, entre otros. En segundo lugar, se tienen los scavengers que son moléculas pequeñas “suicidas” que son capaces de aceptar los electrones desapareados o radicalarios provenientes de los ROS e inactivarlos (GSH, ácido ascórbico, alfa tocoferol, entre otros). La tercera línea actúa a nivel de control de daños con enzimas de reparación de biomoléculas importantes como el ADN, lípidos y proteínas. El cuarto y último frente se asocia con respuestas adaptativas al entorno prooxidante [127,128]. En la Figura 1.9-1 se muestra de manera esquemática el sistema interactivo de balance redox intracelular.





*Figura 1.9-1 Representación gráfica del balance redox intracelular.*

La capacidad de los complejos de metales de transición para alterar el balance redox a nivel intracelular ha sido ampliamente estudiada y demostrada [129]. Se ha probado que los modos de acción subyacentes son variados y dependen en gran medida de las propiedades fisicoquímicas del ion metálico. Especialmente, la dureza y blandura de este parece tener un impacto crucial en el comportamiento intracelular de los complejos.

Los metales de transición ("ácidos"), así como los átomos donantes de los ligandos potenciales ("bases") se pueden clasificar en blandos (carga baja / gran radio iónico), intermedios y duros (carga alta / pequeño radio iónico). Según este concepto, los ácidos blandos reaccionan más rápido y forman enlaces más fuertes con bases blandas, mientras que los ácidos duros reaccionan más rápido y forman enlaces más fuertes con bases duras [34]. Por lo tanto, los ácidos blandos Pt(II), As(III) u Au(I) reaccionan fácilmente con bases blandas como el GSH que contiene azufre y otras moléculas ricas en residuos de cisteína, como la TrxR y las metalotioneínas.

Esto conduce a la formación de conjugados de GSH y, en consecuencia, el agotamiento y la sensibilización celular a ROS [130]. Por el contrario, los iones de metales duros, como V(V), Co(III), Cu(II) o Ru(III) tienen menor afinidad por ligandos con donantes blandos, como el átomo de azufre en el GSH.

El agotamiento de este se da por la generación de ROS a través de reacciones de tipo Fenton, que conducen en paralelo a la reducción del metal y a la oxidación de GSH a GSSG [131]. Una parte importante del modo de acción de varios medicamentos basados en metales, relacionados con procesos redox es ampliamente conocida como la hipótesis de "activación por reducción" [31]. Este concepto se basa en la idea de aplicar un profármaco menos citotóxico, que luego se activa en el espacio reductor intracelular. Especialmente, en el caso de los fármacos Pt(IV), Ru(III), Co(III) y Cu(II), se cree que la activación por reducción es importante en sus modos de acción [132]. La reducción resulta en una mayor reactividad del centro metálico junto con la disociación del ligando. Sin embargo, la activación por reducción no necesariamente aumenta la actividad intracelular del fármaco metálico per se, sino que también puede contribuir al transporte selectivo y la liberación de ligandos citotóxicos dentro del tejido tumoral como se observa para varios complejos de cobalto y rutenio [133–135].

#### **1.10. Inducción de muerte celular a través de especies de oxígeno reactivas (ROS) en células tumorales**

En las últimas tres décadas, se ha demostrado que los ROS están involucrados en cada etapa del desarrollo del cáncer, a saber, iniciación, promoción y progresión (Ver Figura 1.10-1). Además, se ha demostrado que los niveles de enzimas antioxidantes como la catalasa y SOD están alterados en las células tumorales.

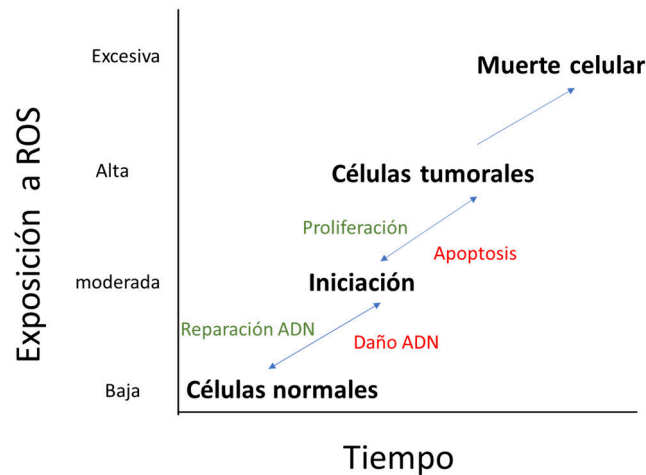


Figura 1.10-1 Diagrama de la relación entre la presencia de ROS y la transformación celular hacia un fenotipo tumoral.

Se ha documentado claramente que las células tumorales están bajo un estrés oxidativo persistente y que el sistema antioxidante en las células cancerosas sufre un ataque constante, ya que tienen que hacer frente a este exceso de ROS que se produce debido a la alta tasa de actividad metabólica. Por lo tanto, se ha sugerido explotar esta condición diferencial de las células tumorales como una estrategia de tratamiento potencial para el cáncer [49].

Se han propuesto dos estrategias principales:

- Inhibición de las enzimas antioxidantes y del sistema antioxidante en general en las células cancerosas.
- Producción de ROS ( $H_2O_2$  y/o superóxido) en células tumorales que resulta en apoptosis y/o necrosis en células cancerosas.

Además, el mayor estrés oxidativo en las células cancerosas en comparación con las células normales también proporciona condiciones para atacar selectivamente a las células cancerosas con agentes que pueden generar más ROS y provocar apoptosis y/o necrosis en las células tumorales, mientras que las células normales deben tener suficientes enzimas antioxidantes para hacer frente a la producción extra de ROS. La estrategia anterior también se muestra esquemáticamente Figura 1.10-2.

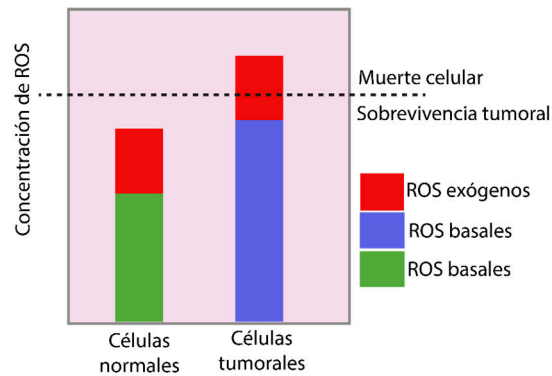


Figura 1.10-2 Mecanismo diferencial de inducción de muerte celular a través de ROS [49].

El peróxido de hidrogeno ha sido la especie reactiva de oxígeno de elección para la terapia contra el cáncer, debido a su estabilidad aparente en comparación con otras especies radicales como el radical hidroxilo y superóxido. Sin embargo, debido a la presencia de altas concentraciones de catalasa plasmática y la capacidad de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para difundirse a través de las membranas, es extremadamente difícil lograr cualquier efecto biológico in vivo con el uso de solamente H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [136]. Nathan y Cohn emplearon la glucosa oxidasa como agente generador de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, lo que produjo actividad antitumoral significativa en un modelo de tumor animal [137]. Desde ésta, varios agentes generadores de radicales superóxido se han investigado como posibles agentes tumorales [138].

También, se ha demostrado que muchos agentes quimioterapéuticos, como la doxorubicina, vinblastina, vincristina y la camptotecina producen su actividad anticancerígena a través de la generación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o la activación de las vías apoptóticas dependientes de éste dentro de las células [139]. Alexandre et al. informaron que la acumulación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es un paso temprano y crucial para la muerte por cáncer inducida por paclitaxel, tanto in vitro como in vivo [140].

Procarbazina, butionina sulfoximina (BSO) y Motexafin gadolinio son algunos de los agentes anticancerosos cuya actividad anticancerígena depende de la producción de ROS o de su interacción con las enzimas eliminadoras de estos [141].

La butionina sulfoximina (BSO) es un inhibidor específico de la gamma glutamil sintetasa y, por lo tanto, inhibe la síntesis de *novo* del glutatión. Varios estudios in vitro e in vivo han demostrado que el agotamiento del glutatión con la ayuda de BSO aumenta la sensibilidad de las células tumorales a la quimioterapia [142]. Además, se demostró que la resistencia a los fármacos citotóxicos como el paclitaxel y cisplatino se correlaciona directamente con la capacidad antioxidante total de las células.

La combinación de trióxido de arsénico con BSO, resultó en una inhibición del crecimiento in vitro en líneas celulares de mama, próstata, pulmón, colon, cervix, vejiga y riñón [143].

En la Figura 1.10-3 se presenta un diagrama el cual resume el papel de los compuestos de coordinación con metales de transición en la inducción de muerte celular asociada con la producción de ROS intracelulares y los blancos moleculares afectados.

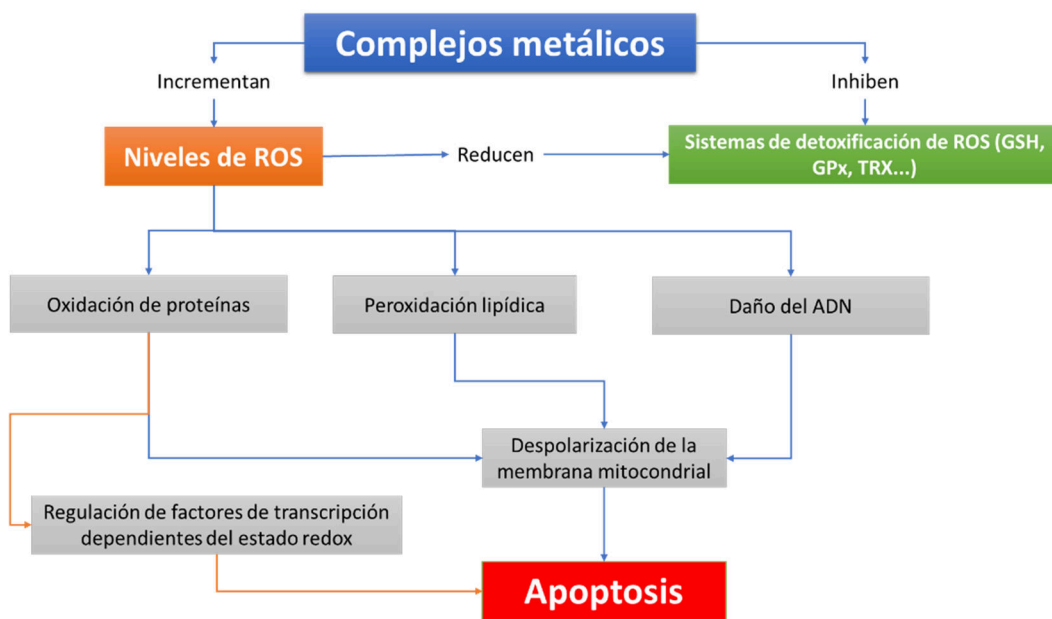


Figura 1.10-3 Descripción general sobre el papel de los ROS en la actividad de los complejos antitumorales [132].

### 1.11. Modelos tridimensionales de cultivo celular (esferoides multicelulares) en estudios in vitro

El cultivo de esferoides celulares tridimensionales está ofreciendo una nueva percepción de la biología tumoral, así como información sobre la diferenciación celular, la organización del tejido y la homeostasis [144].

Los esferoides multicelulares han ganado un lugar relevante en la investigación preclínica en el desarrollo de potenciales fármacos antitumorales solo en los últimos 10 años, a pesar de haber sido utilizados desde hace más de 30 años por los radiobiólogos [145,146].

En comparación con los modelos de cultivo bidimensionales, los esferoides tienen la capacidad de reproducir de manera más precisa el microentorno tumoral, en particular con las alteraciones de la expresión de genes y la sensibilidad a los agentes quimioterapéuticos [147].

Las células en un tejido neoplásico están organizadas en redes tridimensionales de alta complejidad, mostrando gradientes de señales y nutrientes, un mayor contacto entre células e interacciones entre las células y la matriz extracelular. La complejidad de esta configuración induce el fenómeno resistencia multicelular (RMC) a través de varios mecanismos que incluyen [145]:

- La estratificación celular en una capa proliferante externa, una sección intermedia de células quiescentes y una zona central hipóxica y necrótica.
- Permeabilidad de drogas reducida.
- Inhibición de apoptosis

- Modulación de la expresión de proteínas incluyendo topoisomerasas y enzimas de reparación.

Los cultivos celulares 3D, a diferencia de la tradicional monocapa celular, captura la complejidad de los tumores sólidos. La organización concéntrica de las células, así como la heterogeneidad metabólica de las células que conforman un esferoide, hacen que éste simule los estados iniciales, prevasculares de un tumor sólido in vivo, que además dada la forma geométrica permite modelar el crecimiento celular, el transporte de oxígeno, nutrientes y metabolitos y también el movimiento de células dentro del mismo esferoide [148,149].

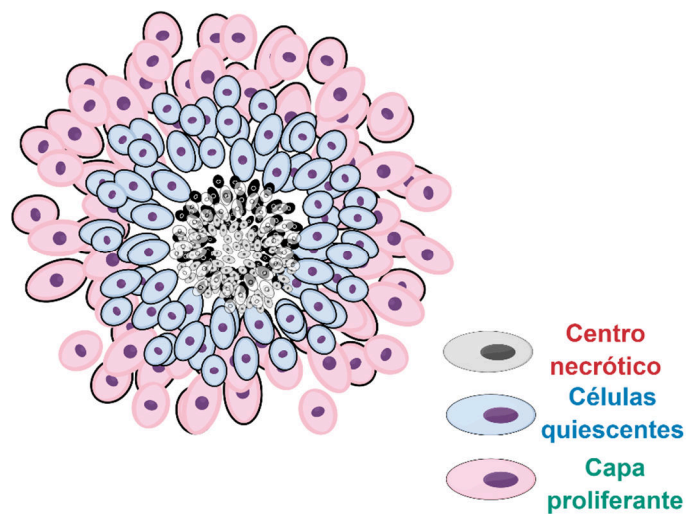


Figura 1.11-1 Esquema representativo de la estratificación de las células presentes en un esferoide.

Tabla 1.11-1 Comparación de las características claves presentadas por los diferentes modelos de cultivo celular con respecto a los tumores in vivo [150].

Características	Monocapa	Esferoides	Tumor in vivo
Restricción espacial.	Si	No	No
Gradientes de concentración de O <sub>2</sub> , nutrientes y desechos metabólicos.	No	Si	Si
Subpoblaciones clonales heterogéneas.	Si	Si	Si
Estratificación de poblaciones celulares.	No	Si	Si
Nicho para células stem.	No	Si	Si

<b>Velocidad de captación de glucosa.</b>	Baja	Alta	Alta
<b>Perfil de expresión génico.</b>	Diferente	Similar	Similar
<b>Resistencia a la apoptosis</b>	Baja	Alta	Alta
<b>Resistencia multicelular</b>	No	Si	Si

Existen diferentes métodos para el cultivo de esferoides multicelulares los más comúnmente empleados se explican brevemente a continuación:

**Gota pendiente:** Los esferoides se forman haciendo crecer una pequeña gota de cultivo en suspensión de células, que cuelgan en la cara interna de la tapa de una caja de Petri o la tapa de una placa multipocillos. Esto conduce a la producción de esferoides con un tamaño bien controlado de manera rápida. Esta técnica se puede utilizar para establecer cocultivos de diferentes tipos de células. El principal inconveniente de este método es que es laborioso y el tratamiento de los esferoides establecidos no es posible a menos que los esferoides sean trasladados a otra placa [146,151].

**Liquid overlay:** En esta técnica de formación de esferoides, la suspensión celular se hace crecer en una placa de cultivo cóncava hecha con sustratos no adhesivos, como agar / agarosa (1–3%), polimetacrilato de hidroximetilo (pHEMA) o Matrigel. Los esferoides se forman debido a la agregación homotípica de células en esferas que crecen en tamaño con el tiempo, manteniendo las funciones de diferenciación de las células individuales. El crecimiento de los esferoides se puede controlar utilizando métodos de análisis estándar como microscopía óptica y análisis digital de imágenes.

Es una técnica simple que permite cocultivos de diferentes tipos de células con facilidad de escalado. Sin embargo, está limitada por la variación en términos de tamaño, número de células y forma de los esferoides generados, y el número de esferoides producidos. Este sistema es más económico que las técnicas de cultivo rotativo, en términos de cantidad de medio, nutrientes, suplementos y materiales de ensayo utilizados [151,152].

**Cultivo rotatorio:** En esta técnica de cultivo en 3D, las células forman estructuras en forma de esfera en condiciones de agitación continua, debido a la agregación espontánea las células, se cultivan en condiciones especiales de agitación a alta velocidad en biorreactores con agitación constante, sin unión a ningún sustrato. Por lo tanto, esta técnica es adecuada solo para aquellas líneas celulares que pueden soportar una alta tensión de cizallamiento. La principal ventaja de esta técnica es que los esferoides crecen con tamaño uniforme, con altos rendimientos, donde el movimiento del medio de cultivo proporciona un entorno controlado para transportar nutrientes y desechos de la superficie del esferoide, imitando el mecanismo de transporte en tumores in vivo. En estas condiciones de cultivo, las mediciones de pH, oxígeno, glucosa y nutrientes están muy estandarizadas [151,152].

En la Figura 1.11-2 se representan de forma esquemática los métodos de cultivo de esferoides mencionados anteriormente.

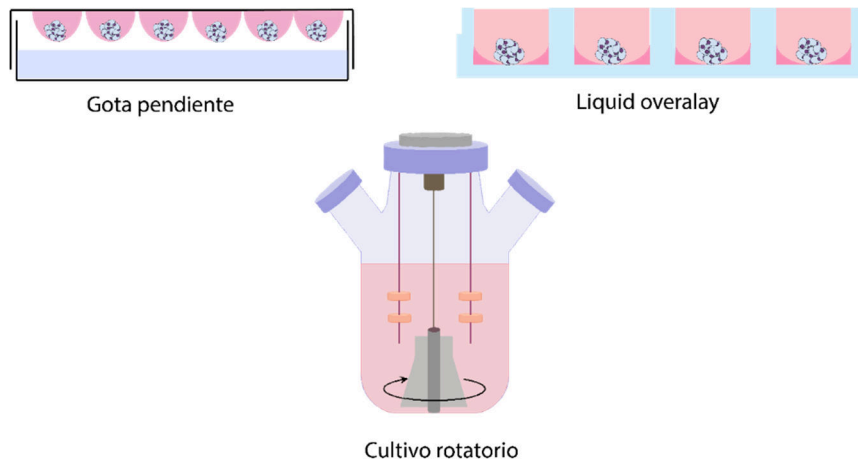
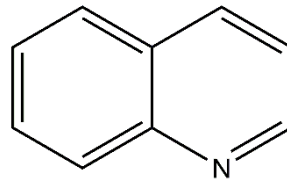


Figura 1.11-2 Métodos de cultivo celular para la obtención de esferoides multicelulares.

## 1.12. Ligandos de interés biológico estudiados en este trabajo

### 1.12.1. Quinolinas



Quinolina

Figura 1.12-1 Estructura química del núcleo quinolina.

La quinolina o 1-aza-naftalina es un compuesto aromático heterocíclico que contiene nitrógeno. Tiene una fórmula molecular  $C_9H_7N$  y su peso molecular es de 129.16 g/mol. El valor de logP es de 2.04, confiriéndole a la quinolina un carácter de base terciaria débil.

El núcleo quinolina se encuentra en varios compuestos naturales de tipo alcaloides derivados de la cinchona y sustancias que muestran una amplia gama de actividad biológica. Se ha encontrado que la quinolina posee actividad antimalárica, anticonvulsiva, antibacteriana, antifúngica, antiinflamatoria, antihelmíntica, cardiotónica, antiviral y analgésica [153].

El esqueleto quinolina desempeña un papel importante en el desarrollo de fármacos antitumorales, ya que sus derivados han mostrado excelentes resultados a través de diferentes mecanismos de acción, como inductores de arresto del ciclo celular y apoptosis, inhibidores de angiogénesis y la migración celular.

La quinolina cumple un rol importante en la síntesis de fármacos antitumorales de uso clínico como camptotecina, irinotecan, topotecan, entre otros (Figura 1.12-2). También se ha encontrado que compuestos derivados de quinolina han mostrado efecto como inhibidores de topoisomerasas I y II, proteinquinasas, la farnesiltransferasa, la anhidrasa carbónica, intercalantes del ADN, entre otros [154,155]. Por lo cual el estudio sistemático

de compuestos relacionados puede conducir al desarrollo de nuevos medicamentos cada vez más necesarios en la lucha contra el cáncer.

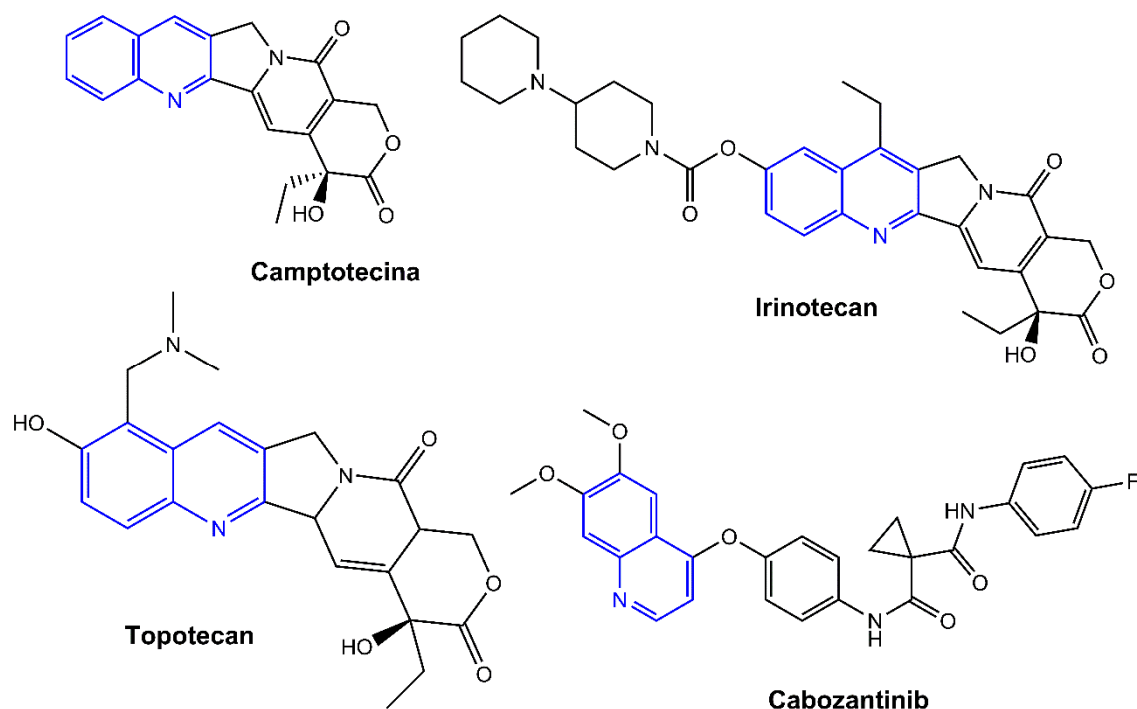


Figura 1.12-2 Estructura química de compuestos antitumorales que contienen el núcleo quinolina.

La presencia del nitrógeno en el heterociclo ha hecho que la quinolina y sus derivados sean aptos como ligandos en la síntesis de complejos de coordinación con una amplia variedad de metales, siendo la familia de la 8-hidroxiquinolina la más estudiada, ya que la presencia del grupo oxidrilo en la posición 8 al ser desprotonado transforma la 8-hidroxiquinolina en un ligando bidentado de tipo N,O [156].

Los compuestos de esta familia más estudiados como ligandos son la 8-hidroxiquinolina, el clioquinol (5-cloro-7-yodoquinoleín-8-ol) y la 8-hidroxi-5-nitroquinolina (ver Figura 1.12-3).

La 8-hidroxiquinolina (8HQ) es un compuesto lipofílico con una diversidad de actividades biológicas, las cuales se relacionan con su actividad quelante ejerciendo funciones como antineurodegenerativo, antitumoral, antimicrobiano, antioxidante, antiinflamatorio y anti diabético [156].

Los ligandos 8HQ y clioquinol actúan como ionóforos, transportando metales como cobre, zinc, cobalto, rutenio, hierro, vanadio, paladio, oro y platino al interior de la célula donde ejercen diferentes efectos biológicos, como la inhibición del proteosoma, intercalación y clivaje del ADN y alteración del balance redox intracelular, entre otros. Lo que ocasiona la muerte celular de manera dependiente o independiente de caspasas. También pueden actuar como quelantes de cobre intracelulares y actuar como inhibidores de la angiogénesis y migración celular, también reducir la síntesis de enzimas



dependientes de cobre como la superóxido dismutasa, SOD1, dependiente de cobre y zinc [156–163].

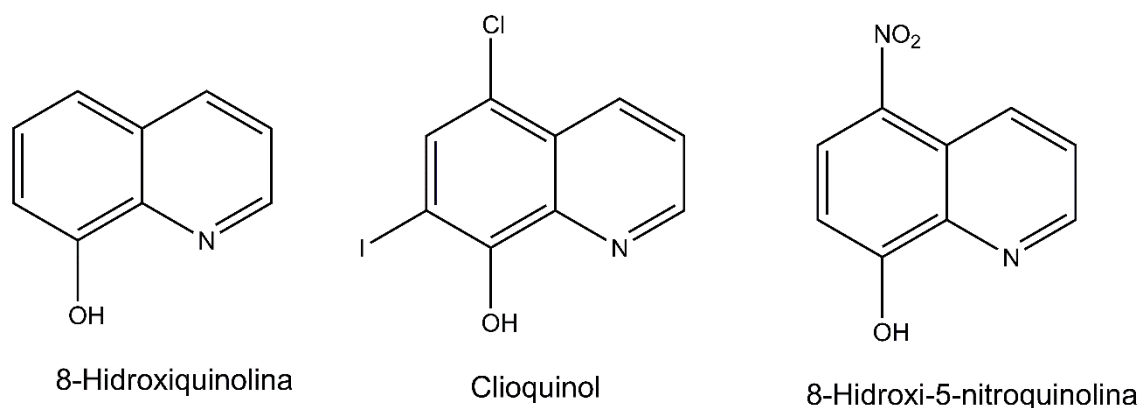


Figura 1.12-3 Estructura química de 8-Hidroxiquinolina, Clioquinol y 8-hidroxi-5-nitroquinolina.

### 1.12.2. Sulfonamidas

Las Sulfonamidas conforman una amplia familia de compuestos bioactivos que han sido extensivamente empleados en la prevención y el tratamiento de diferentes cuadros clínicos, tanto en la medicina humana (ej. sulfametoxazol, sulfadiazina) como en la veterinaria (ej. sulfadimetoxina, sulfaquinoxalina). Estos compuestos fueron los primeros en ser efectivamente empleados en el tratamiento sistémico de infecciones bacterianas en humanos a principios del S. XX [164]. Si bien, rápidamente se generó resistencia por parte de los agentes bacterianos, aún en la actualidad se continúan realizando grandes esfuerzos, buscando estrategias que permitan burlar dichos mecanismos de defensa de los microorganismos. Además del tratamiento en infecciones bacterianas, también han tenido un papel destacado como agentes antiparasitarios y coccidiostáticos [164–166]. En la Figura 1.12-4 se presenta la estructura molecular de algunos miembros del grupo de las sulfonamidas.

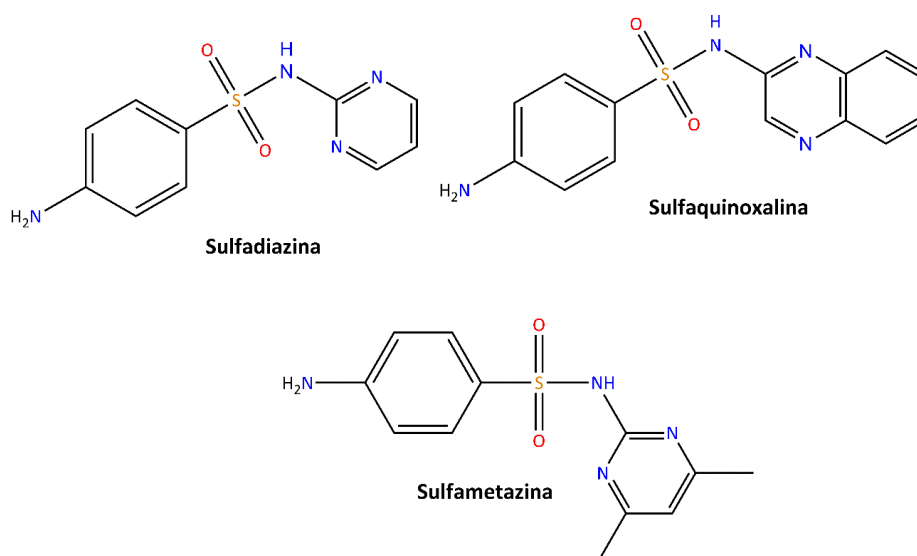


Figura 1.12-4 Estructura química de las p-aminobencensulfonamidas

Entre las estrategias para el desarrollo de nuevos compuestos derivados de las sulfonamidas con potencial actividad biológica, se incluye la preparación de compuestos con diferentes sustituyentes alrededor del grupo funcional sulfonamida ( $R-SO_2NH-R'$ ). Algunos ejemplos, incluyen la obtención de bases de Schiff, obtenidas de la condensación de la sulfonamida a través de alguno de sus sustituyentes amino con un aldehído aromático o alquílico [167–173].

También se han reportado, numerosos estudios con una serie de compuestos de coordinación con diferentes iones metálicos, tanto bivalentes como trivalentes [169,174,183,175–182]. La obtención de estos compuestos ha sido de gran utilidad, no solo para el mejoramiento de las propiedades biológicas, sino también en otras aplicaciones [178,184,193–202,185,203–205,186–192].

En el campo biológico, su estudio ha llevado al descubrimiento de compuestos promisorios en el tratamiento de algunos tipos de cáncer [169,174,175]. Posteriormente, se estudiaron complejos ternarios, incluyendo ligandos auxiliares de diversa naturaleza, entre los que predominan ligandos N-donores [176–179].

La Sulfaquinoxalina (SDQ; 4-amino-N-2-quinoxalinil - bencenosulfonamida), también perteneciente al grupo de las sulfonamidas, es un compuesto que ha tenido gran relevancia en la medicina veterinaria al ser empleado como agente coccidiostático [165]. Algunos derivados de la quinoxalina mostraron actividad antitumoral *in vitro* e *in vivo* [206], como inhibidores potentes de la anhidrasa carbónica [207] y altamente selectivos de la tirosina quinasa [208,209]. A pesar de saber que las propiedades biológicas del ligando podrían ser potenciadas por la complejación de metales de transición, pocos compuestos de coordinación con sulfaquinoxalina como ligando, han sido reportados.

El primero de ellos, fue un complejo polimérico de Cd(II) con interesantes propiedades fotoluminiscentes [186]. Posteriormente, fueron descritos dos complejos ternarios de Zn(II) incluyendo 1,10-fenantrolina o 4,4'-bipiridina como coligandos [188], las estructuras cristalinas de esos compuestos revelaron que el complejo con 1,10'-fenantrolina es monomérico, mientras que el otro presenta una estructura polimérica. Otro de los compuestos que se encuentra en la bibliografía es un complejo binario de Ni(II) [210], pero solamente el estudio espectroscópico de infrarrojo y el comportamiento térmico (TGA y DTA) del sólido, sin el análisis de su estructura cristalina. Recientemente se reportaron unos complejos de Co, Cu y Sn con sulfaquinoxalina como ligando, los cuales mostraron interesantes propiedades anti-glaucoma con mejores efectos que los medicamentos comerciales [211].

Al igual que la sulfadiazina y la sulfaquinoxalina, la Sulfametazina (SMT; 4 - amino - N - (4, 6 - dimetilpirimidin-2-il) -bencenosulfonamida), también llamada comúnmente como sulfadimidina, es un compuesto bioactivo que ha tenido un amplio uso en la prevención y el tratamiento de infecciones bacterianas, particularmente en el tratamiento veterinario de la enteritis por *E. coli*. Este compuesto también suele ser administrado en

forma conjunta con trimetoprima, un agente antibiótico bacteriostático y que potencia la capacidad antibiótica de la sulfonamida.

Se ha estudiado un gran número de derivados de Sulfametazina entre los que se incluyen algunos compuestos de coordinación [184,195–198,200–202,212]. La mayoría de esos complejos son de Cu (II), incluyendo un complejo binario monomérico  $(\text{Cu}(\text{SMT})(\text{NO}_3)(\text{H}_2\text{O})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O})$ , que fue estudiado espectroscópicamente, su estructura fue propuesta a partir de los datos espectroscópicos y de cálculos teórico-cuánticos y sus propiedades electroquímicas fueron investigadas. También se estudió su capacidad antimicrobiana, encontrando que el complejo tiene una acción levemente superior a la del ligando libre [196]. El complejo dimérico  $[\text{Cu}(\text{Ac})_2(\text{SMT})_2 \cdot 2\text{DMF}]$  y el polimérico  $[\text{Cu}(\text{SMT})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}]_\infty$  fueron ampliamente caracterizados, incluyendo sus estructuras cristalinas, propiedades magnéticas y estudios teóricos. Las medidas de susceptibilidad magnética mostraron interacciones antiferromagnéticas entre los centros de Cu(II) en el complejo dimérico [202]. Por otra parte, se reportaron dos complejos ternarios con los coligandos 2,2'-bipiridina y 8-hidroxiquinolina, y se los propuso como candidatos para ser utilizados como antimicrobianos y estabilizadores de polímeros [212–214].

Otros complejos que han sido reportados incluyen el ion Ni(II) y se han estudiado sus propiedades electroquímicas y biológicas. Mansour y coautores, reportaron que un complejo de Ni(II) con SMT no mejoró significativamente las propiedades antimicrobianas con respecto al ligando libre [196]. En otros estudios, Mansour investigó la acción de complejos de SMT con Mn(II), Ru(III) y Pt(II) sobre algunas cepas bacterianas, encontrando que los complejos de Ru(III) y Pt(II) al igual que el de Ni(II) también carecían de actividad antibacteriana. Este hecho fue atribuido a que la acción antibacteriana está relacionada con la forma ionizada de la sulfa, por lo que al estar unida de forma covalente con los metales no presenta actividad [197]. Sin embargo, el compuesto de Mn(II) fue activo, lo que sugiere que una vez el complejo penetra la membrana celular se disocia liberando la sulfametazina aniónica [198].



## 2. Hipótesis de trabajo

La complejación de metales de transición con moléculas orgánicas que presentan actividad farmacológica per se o con compuestos de interés biológico aptos para coordinarse con metales, modificará la actividad propia de los metales o de los ligandos, permitiendo obtener compuestos con efectos antitumorales más potentes y/o menos tóxicos que los metales y ligandos sin complejar.

## 3. Objetivos

### 3.1. Objetivo General

El objetivo general de este trabajo de tesis doctoral es realizar un estudio a nivel de biología celular de diferentes familias de complejos de metales de transición y determinar su efectos citotóxicos y posibles mecanismos de acción como potenciales agentes antitumorales.

### 3.2. Objetivos específicos

1. Poner a punto un modelo de cultivo tridimensional de esferoides multicelulares, como un modelo tumoral prevascular usando las células de fenotipo tumoral A549 (CCL-175).
2. Determinar la citotoxicidad sobre en modelos de cultivo celular 2D y 3D, de fenotipo tumoral, y células normales de los complejos binarios y ternarios de cobre con **sacarina** y **glutamina** (Cu-sac, Cu-gln y Cu-sac-gln), **6-metoxiquinolina** con cobre, zinc, plata y cobalto (Cu6MQ, Zn6MQ, Ag6MQ y Co6MQ) y los complejos ternarios de cobre con **sulfametazina – biquinolina** (SMTCu) y **sulfaquinoxalina – biquinolina** (SDQCu).
3. Estudiar los potenciales mecanismos de acción asociados a los metalofármacos como: inducción de estrés oxidativo, efecto genotóxico, alteración en la proliferación e invasión celular.
4. Determinar si la combinación de algunos complejos produce un efecto sinérgico en la citotoxicidad y además estudiar el potencial efecto sensibilizador de los complejos más activos a la radioterapia.
5. Caracterizar el nivel de lipofilicidad de los complejos derivados de cobre a través de cromatografía de capa fina de fase reversa.

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS APLICADOS

### 4.1. Síntesis química de los diferentes complejos estudiados

#### 4.1.1. Síntesis de glutamatos y sacarinatos de cobre

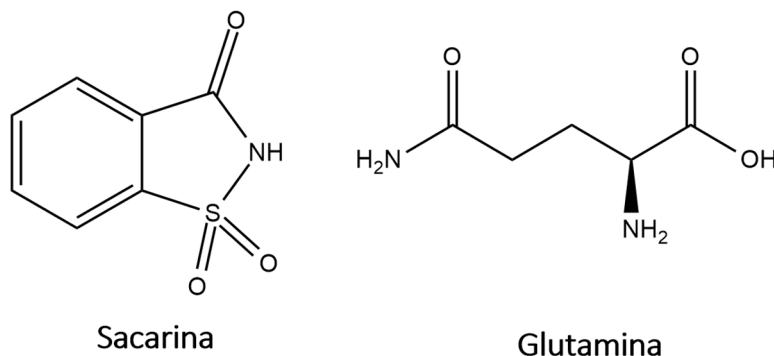


Figura 4.1-1 Estructura química de los ligandos Sacarina sódica y glutamina.

Los complejos heterolépticos de cobre con sacarina y glutamina,  $[\text{Cu}(\text{sac})_2(\text{H}_2\text{O})_4] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Cu}(\text{gln})_2$  y  $\text{Cu}(\text{sac})_2(\text{gln})_2$  nombrados de ahora en adelante Cu-sac, Cu-gln y Cu-sac-gln, cuyos resultados experimentales se encuentran expuestos en la sección 5.2 fueron sintetizados como se describe a continuación.

El complejo Cu-sac fue sintetizado de acuerdo con lo expuesto por Haider y colaboradores. Brevemente, 0.1 mM de  $\text{CuCl}_2$  se mezclaron con 0.2 mM de sacarina en una solución acuosa de carbonato ácido de sodio ( $\text{NaHCO}_3$ ), se agitó de forma constante hasta la obtención de un precipitado de color azul. Subsecuentemente, el sólido fue filtrado, lavado con agua destilada varias veces y secado a temperatura ambiente [215,216]. El complejo de glutamina fue sintetizado tal como se ha descrito por Deschapms, et. al [217].

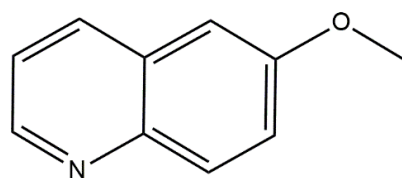
Para la síntesis del complejo Cu-sac-gln se siguió la ruta de sintética propuesta por Santi [218]. Una solución acuosa<sup>1</sup> que contiene 0.4mmol de glutamina fue agregada a una solución acuosa<sup>1</sup> preparada con 0.2 mmol del complejo precursor  $[\text{Cu}(\text{sac})_2(\text{H}_2\text{O})_4] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  [215,219]. La mezcla fue agitada durante 30 minutos a 45°C y concentrada hasta la formación de cristales de color azul, los cuales fueron filtrados, lavados con agua destilada y secados a temperatura ambiente.

#### 4.1.2. Síntesis de complejos con 6-metoxiquinolina

Los complejos de 6-metoxiquinolina con cobre y zinc se realizó de la siguiente manera, donde 1 mmol de 6-metoxiquinolina fue agregada a una solución etanólica<sup>1</sup> caliente con 0.5 mmol de cloruro de cobre o de zinc respectivamente. La solución fue agitada durante una hora, pasado dicho periodo de tiempo un sólido de color verde oliva precipitó en el caso del complejo de cobre y un sólido de color blanco para el complejo de zinc. Ambos

<sup>1</sup> Dichas soluciones son preparadas en el menor volumen de solvente posible para disolver el compuesto.

materiales se lavaron varias veces con etanol y se secaron a 60°C. Para sintetizar el complejo de plata (I) se siguió el procedimiento previamente descrito para los complejos de cobre y zinc, sin embargo la sal metálica de partida fue nitrato de plata [213]. La estructura química de los complejos se encuentra representada en la sección 5.3 Complejos de 6-metoxiquinolina en la Figura 5.3-1., de igual manera en la Figura 4.1-2 se encuentra representada la estructura del ligando empleado.



6-Metoxiquinolina

Figura 4.1-2 Estructura química del ligando 6-metoxiquinolina.

#### 4.1.3. Síntesis de complejos ternarios de 2,2' biquinolina con sulfonamidas

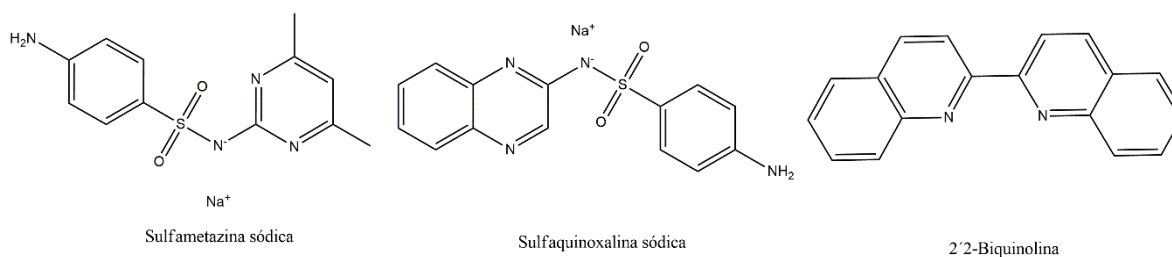


Figura 4.1-3 Estructura química de los ligandos sulfametazina sódica (SMT), Sulfaquinoxalina (SDQ) y 2,2' Biquinolina (BQ).

Para la síntesis del complejo SDQCu se empleó una solución metanólica de cloruro de cobre dihidrato (0.4 mmol) la cual fue agregada gota a gota a una solución metanólica caliente de sulfaquinoxalina sódica (SDQ) (0.4 mmol) y 2,2' biquinolina (0.4 mmol). En el caso del complejo SMTCu la sal de cobre fue agregada gota a gota a una solución metanólica<sup>2</sup> caliente de sulfametazina sódica (SMT) (0.4 mmol) y 2,2' biquinolina (0.4 mmol). Para ambos casos las soluciones se mantuvieron en reflujo durante dos horas, una vez finalizado dicho periodo una solución de color violeta fue obtenida y filtrada. Fueron transferidas a cristalizadores y luego de varios días se obtuvieron sólidos cristalinos de color marrón aptos para ser analizados a través de difracción de rayos X. De igual manera los complejos fueron complementariamente caracterizados a través de técnicas espectroscópicas electrónicas y vibracionales. Información adicional se encuentra publicada por Villa-Pérez et. al. en [220]. En la Figura 4.1-3 se representan las estructuras químicas de los ligandos empleados en esta síntesis.

<sup>2</sup> Dicha solución es preparada en el menor volumen de solvente posible para disolver el compuesto.

#### 4.2. Evaluación in vitro del carácter lipofílico de los complejos

Dentro de las características fisicoquímicas más relevantes en el desarrollo de nuevos principios activos, la solubilidad y el carácter lipofílico son propiedades que determinan considerablemente el desempeño farmacológico en procesos tales como la absorción, distribución, metabolismo, eliminación y toxicidad [221].

El método más ampliamente difundido para evaluar el carácter lipofílico de una molécula es el del frasco de agitación en el cual una sistema heterogéneo de octanol/agua se le agrega el compuesto de interés y se agita durante 5 minutos y posteriormente se determina la concentración del compuesto en cada fase y se calcula la relación de las concentraciones en octanol/agua[222]. Sin embargo, en el caso de los complejos estudiados, dada su baja solubilidad se han adoptado técnicas equivalentes fundamentadas en los principios de cromatografía de fase reversa ya sea cromatografía líquida de alta presión (HPLC) o cromatografía de fase reversa en capa fina (RP-TLC) las cuales han demostrado gran robustez en cuanto a los resultados obtenidos [223].

En el caso de la cromatografía de fase reversa en capa fina, se emplea como fase estacionaria una placa de sílica funcionalizada con una cadena de 18 carbonos (C18) la cual es una superficie altamente apolar. En el caso de la fase móvil se emplea una mezcla binaria de agua o buffer y un solvente orgánico tales como acetona, acetonitrilo o metanol [224,225].

$$Rf = \frac{x}{f}$$

*Ecuación 1 Determinación de Rf de los complejos en la placa de sílica. Donde x es la distancia recorrida por el complejo y f es la distancia en cm del frente del solvente.*

$$R_M = \log_{10} \left( \frac{1}{Rf} - 1 \right)$$

*Ecuación 2 Determinación de  $R_m$  a partir del valor  $Rf$  a través del procedimiento Bate-Smith y Westall.*

$$R_m = R_M^0 + b\varphi$$

*Ecuación 3 Ecuación de la línea recta de la correlación entre  $R_m$  y la concentración de solvente orgánico ( $\varphi$ ).*

Experimentalmente, se obtienen los valores de la distancia recorrida por el complejo (x) y la distancia en cm del frente del solvente (f) y se calcula  $Rf$  con la Ecuación 1. El valor experimental obtenido,  $Rf$ , se transforma matemáticamente a través de la Ecuación 2 en el parámetro  $R_m$  el cual, al ser graficado en función de la fracción del solvente orgánico ( $\varphi$ ), se puede establecer una relación lineal la cual es representada en la Ecuación 3.

La constante de retención cromatográfica ( $R_M^0$ ) representa el intercepto en la relación lineal entre la retención del soluto,  $R_m$  y la concentración del solvente orgánico empleado ( $\varphi$ ). Cuando la concentración de solvente orgánico se extrapola a cero, se



puede emplear dicho valor como el coeficiente de partición del complejo entre el agua o fase polar y la sílica o fase estacionaria [226,227].

La pendiente (*b*) indica la tasa a la cual la solubilidad del complejo aumenta con los cambios en la concentración del componente orgánico y puede ser relacionada con el área hidrofóbica superficial de la molécula del complejo.

Se encuentra entonces, que a mayor valor de  $R_M^0$ , mayor es la afinidad del complejo por la fase estacionaria y en consecuencia se puede inferir que mayor será su lipofilicidad.

Experimentalmente, los diferentes complejos fueron disueltos con concentraciones de 1 mg/mL en dimetilsulfóxido. Posteriormente se preparó una dilución 0.1 mg/mL en acetonitrilo grado HPLC.

Como fase estacionaria se emplearon placas de aluminio con sílica C18, de 4 x 8 cm y un grosor de 150  $\mu$ m marca Sorbtech (Norcross, Georgia, EE. UU.). Dos  $\mu$ L de las soluciones de cada complejo fueron depositados en la placa cromatográfica.

La corrida cromatográfica se desarrolló en cámaras de vidrio individuales cargadas y previamente saturadas con fases móviles compuestas por una mezcla binaria acetonitrilo: agua, donde la concentración de solvente se evaluó entre 40 y 70% con incrementos sucesivos de 5%. El *R<sub>f</sub>* de cada complejo fue determinado bajo la luz UV a 254 nm y en algunos casos se empleó como revelador universal vapores de yodo elemental.

Los cálculos posteriores y las transformaciones matemáticas se llevaron a cabo empleando el software Graphpad Prism.

### 4.3. Ensayos de Estabilidad

Los diferentes estudios de estabilidad se realizaron a través de espectroscopía UV-visible, en la cual las soluciones stock de los complejos fueron preparadas en DMSO de la misma manera que se utilizaron para los estudios en células, estas fueron luego diluidas en buffer fosfato o medio de cultivo DMEM libre de antibióticos y de suero fetal bovino.

Los experimentos se realizaron a una temperatura de 25°C y los espectros se registraron en periodos de tiempo de hasta 24 horas. El descenso de la intensidad de la absorbancia fue graficada con respecto al tiempo de manera normalizada como porcentaje, tomando como 100% la absorbancia de la muestra a tiempo cero.

En el caso de emplear medio de cultivo para realizar las diluciones de los complejos en este tipo de experimentos y con el fin de evitar interferencias por contaminación microbiana, la solución se preparó bajo técnica aséptica y fue fraccionada en varias partes que fueron almacenadas a 25°C en tubos estériles herméticamente cerrados. Los espectros fueron registrados para cada solución de acuerdo con el diseño experimental en un espectrofotómetro Shimadzu UV-Vis spectrophotometer UV-2600.

#### 4.4. Descripción de las líneas celulares empleadas en este trabajo

##### 4.4.1. A549 (CCL-185)

La línea celular A549 fue aislada por primera vez en 1972 por D.J. Giard, et al. [228], mediante la extirpación y cultivo de tejido pulmonar canceroso de un hombre caucásico de 58 años. Las células producidas son células epiteliales basales alveolares con un número de cromosomas modal de 66. Este tipo de célula en un pulmón normal es de tipo escamosa y realiza las funciones de difusión de agua, electrolitos y otras sustancias a través de la superficie de los alvéolos.

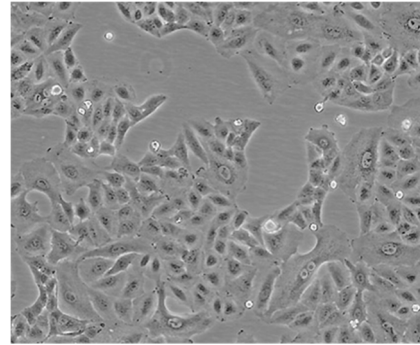


Figura 4.4-1 Morfología células A549

Las células A549 se han caracterizado a lo largo de los años y son una herramienta valiosa en modelos in vitro e in vivo de cáncer pulmonar de células no pequeñas (NSCLC, por sus siglas en inglés)[229].

##### 4.4.2. MRC-5 (CCL-175)

La línea celular MRC-5 fue aislada de un feto de 14 semanas en 1966 por Jacob y colaboradores. Las células son de morfología fibroblástica, derivada de tejido pulmonar de tipo normal [230]. Ha sido ampliamente usada en la investigación clínica de nuevos fármacos y dada su susceptibilidad a ser infectada por virus y su analogía con la línea celular WI 38 ha sido empleada en el desarrollo de bioprocesos relacionado con la producción de vacunas en enfermedades como la viruela, hepatitis A, rubéola, herpes, adenovirus tipo 4 y tipo 7 y rabia [231].

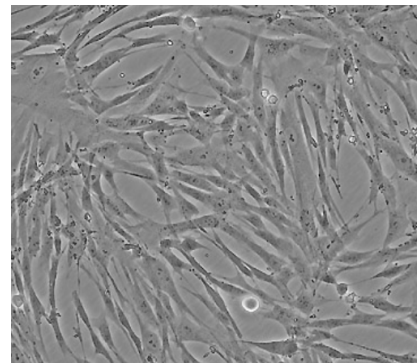


Figura 4.4-2 Morfología células MRC-5.

##### 4.4.3. MG-63 (CCL-1427)

Esta línea celular derivada de osteosarcoma fue aislada de un varón caucásico de 14 años, en 1977 por Billiau y colaboradores [232] La línea MG-63 es ampliamente utilizadas en investigación biomédica, en particular en estudios de biocompatibilidad de implantes óseos y dentales.

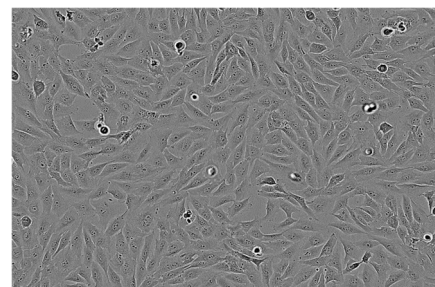


Figura 4.4-3 Morfología células MG-63.

#### 4.4.4. L929 (CCL-1)

La línea celular L929 es de origen murino con fenotipo normal. La cepa L fue obtenida de un tejido normal de un ratón C3H/An, macho de 100 días, la cual fue una de las primeras líneas celulares en ser cultivadas de forma continua y el clon 929 (tejido conectivo) fue una de las primeras cepas en ser obtenidas a partir de clonación.

Estos fibroblastos son ampliamente usados para ensayos de biocompatibilidad y citotoxicidad (ISO 10993-5 citotoxicidad en dispositivos médicos e ISO 7405 evaluación preclínica de dispositivos médicos odontológicos). Además, demostraron tasas de crecimiento y respuestas biológicas reproducibles [233].

#### 4.5. Condiciones de cultivo

Las células fueron cultivadas en medio de cultivo DMEM adicionado con 100 UI/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina. En el caso de las células A549, MG-63 y L929 se suplementaron con 10 % v/v de suero fetal bovino, mientras que en el caso de los fibroblastos MRC-5 se agregó un 20 % v/v de suero fetal bovino.

Los cultivos se mantuvieron en botellas plásticas de 25 cm<sup>2</sup> y 75 cm<sup>2</sup> en una estufa a 37°C con atmosfera humidificada y con 5% de CO<sub>2</sub>. Las células fueron subcultivadas empleando TrypLE™ cuando alcanzaron entre el 80 y 90% de confluencia.

*Tabla 4.5-1 Condiciones de cultivo empleadas en las diferentes líneas celulares en este trabajo.*

Línea celular	Medio de cultivo	de SFB	Rango de repiques empleados	Dilución empleada
MG-63	DMEM	10 %	10-30	1:4
A549	DMEM	10 %	15-35	1:9
MRC-5	DMEM	20 %	5-10	1:2
L929	DMEM	10 %	5-15	1:3

#### 4.6. Cultivo de tridimensional de esferoides multicelulares (MCS)

Los esferoides multicelulares fueron cultivados por medio de la técnica de liquid-overlay [152,234], que se describe a continuación. A las placas de cultivo se les realizó un recubrimiento de agarosa con dos objetivos: el primero crear un pocillo con fondo en “U” y forzar la suspensión de células a depositarse en el fondo y principalmente en el centro del pocillo, y el segundo objetivo es obtener una superficie de baja adherencia para las células que impida que éstas crezcan en monocapa y en su lugar se agreguen entre sí para formar el esferoide.

A cada pocillo de una placa de 96 se le agregaron 60 µL de una solución agarosa estéril 1.5% p/v, esta se dejó gelificar durante 25 minutos en el flujo laminar, posteriormente se depositaron 200 µL de suspensión celular con 1500 células (7500 células/mL). Los pocillos ubicados en las filas y columnas más externas de la placa fueron llenados con 250 µL de

agua o PBS estéril con el fin de reducir la evaporación del medio de cultivo de los pocillos más internos. La placa se mantuvo en una estufa bajo condiciones estándares de cultivo durante 4-5 días, al final de este periodo los esferoides alcanzaron un diámetro promedio de 400  $\mu\text{m}$  y se encontraron aptos para realizar experimentos con ellos. En la Figura 4.6-1, se puede observar un esquema grafico de la evolución del crecimiento y cultivo de los esferoides.

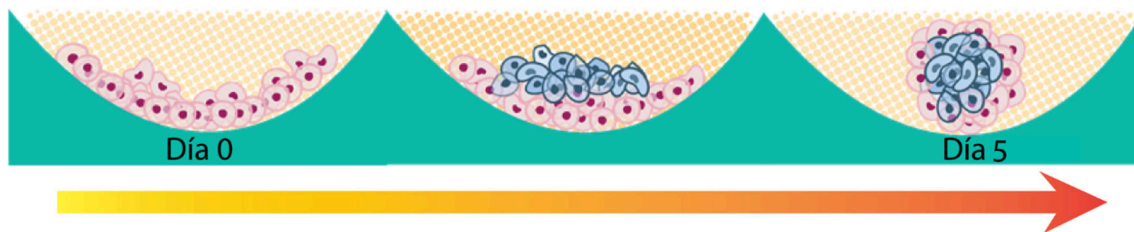


Figura 4.6-1 Esquema de crecimiento de los esferoides multicelulares (MCS) bajo la técnica de liquid overlay.

## 4.7. Ensayos de viabilidad celular

### 4.7.1. Estudios de morfología celular

Se utilizó este estudio con el fin de evaluar las diferentes alteraciones morfológicas que presentan las células después de ser tratadas con los diferentes complejos. Es una herramienta básica y fundamental con la cual se puede evaluar visualmente y de forma cualitativa el daño producido en las células y observar estructuras subcelulares relevantes tales como la membrana celular, el núcleo y el citoplasma [235].

La metodología empleada en esta sección se describe a continuación:  $5.0 \times 10^5$  células fueron depositadas en placas de 6 pocillos (superficie por pocillo de  $9.5 \text{ cm}^2$ ), se cultivaron bajo condiciones estándar overnight. Al día siguiente con una confluencia de entre el 70 y 80% fueron tratadas con los diferentes compuestos en DMEM. Una vez terminado el periodo de incubación, el medio fue descartado, la monocapa lavada cuidadosamente con PBS dos veces y fijada con metanol frío ( $-20^\circ\text{C}$ ) y durante 10 minutos, pasado el tiempo de fijación se agregaron 200  $\mu\text{L}$  de Giemsa concentrado y 400  $\mu\text{L}$  de agua destilada. La solución de Giemsa se descartó y la placa se sumergió en agua corriente repetidas veces, hasta que no se observó liberación de colorante.

Las placas se analizaron con microscopio óptico Olympus BX50 con una cámara digital acoplada (resolución de 10 megapíxeles), varios campos visuales fueron fotografiados y analizados.

### 4.7.2. Ensayo de cristal violeta

El ensayo de cristal violeta o violeta de genciana tiene como objetivo determinar a través de una medida colorimétrica la cantidad de células vivas remanentes en una población celular que ha sido sometida a un estímulo, como es el caso de los experimentos enmarcados dentro de esta tesis.

Las células adherentes al morir se despegan de la superficie de las placas de cultivo. Por lo tanto, se puede discriminar solo la población que se conservó viable (es decir adherida a la superficie de cultivo). Dicha característica se usa indirectamente para cuantificar la muerte celular y determinar diferencias en la proliferación tras un estímulo con agentes citotóxicos. Para detectar las células que se mantuvieron adheridas, estas son teñidas con cristal violeta (cloruro de Tris(4-(dimetilamino)fenil) metilo) el cual tiene la capacidad de intercalarse en las proteínas y el ADN de las células [236].

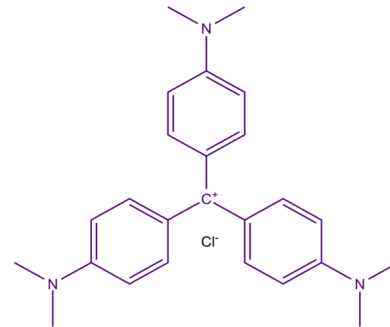


Figura 4.7-1 Estructura química del cristal violeta o cloruro de Tris(4-(dimetilamino)fenil) metilo

A continuación, se describe el procedimiento experimental:  $3 \times 10^4$  células se cultivaron overnight con DMEM + 10 % SFB en placas de 48 pocillos (superficie  $0.8 \text{ cm}^2$  por pocillo), posteriormente se retiró el medio de cultivo y se reemplazó por  $500 \mu\text{L}$  de diferentes soluciones de los complejos preparadas con DMEM libre de SFB durante el periodo de incubación deseado (entre 6 y 24 horas). Después de la incubación con los complejos, se retiró el medio de cultivo y la monocapa fue lavada con PBS a temperatura ambiente, se fijó con glutaraldehído al 5% v/v en PBS durante 5 minutos a temperatura ambiente. Luego, la monocapa se tiñó con cristal violeta al 0.5% en metanol durante 10 minutos, se descartó el exceso de colorante y la monocapa se lavó exhaustivamente tres veces por inmersión en agua corriente y una cuarta vez con agua destilada. Las placas se dejaron secar invertidas sobre la mesada y posteriormente el colorante incorporado en la monocapa fue extraído con solución de buffer glicina-HCl (0.1M, pH 3) y metanol 30%. La absorbancia de las muestras se determinó a 570 nm empleando un espectrofotómetro UV-Vis Shimadzu UV-2600. Los cálculos respectivos se realizaron empleando la siguiente ecuación, donde las células control se refieren a las tratadas únicamente con 0.5% de DMSO como control de solvente.

$$\% \text{ viabilidad celular} = \frac{\text{Absorbancia células tratadas}}{\text{Absorbancia células control}} \times 100$$

Ecuación 4. Determinación de la viabilidad celular

#### 4.7.3. Ensayo de MTT

El MTT es un ensayo colorimétrico sensible y un indicador confiable de la actividad metabólica celular, el cual se basa en la reducción de un sustrato inicialmente de color amarillo a un colorante violeta, insoluble en medio acuoso. Dicha reducción es llevada a cabo por enzimas del tipo oxidoreductasas dependientes de NAD(P)H y de deshidrogenasas. Como las células viables serán aquellas que se encuentren metabólicamente activas, se puede establecer una relación entre la absorbancia a 570

nm y la cantidad de células vivas [237]. La reacción del MTT se esquematiza en la Figura 4.7-2

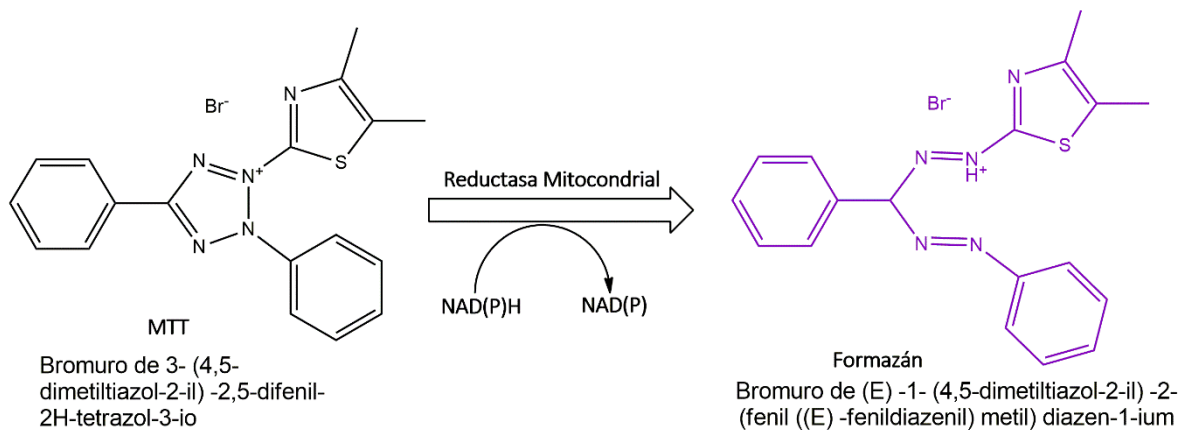


Figura 4.7-2 Esquema de reducción del MTT al interior de la célula.

Experimentalmente, la técnica se desarrolló de la siguiente manera.  $1 \times 10^4$  células (100  $\mu\text{L}$ ) fueron sembradas en placas de 96 pocillos en DMEM + 10% SFB, se incubaron bajo condiciones estándar de cultivo overnight. Posteriormente a cada pocillo se le adicionaron diluciones seriadas con DMEM de los diferentes complejos previamente disueltos en DMSO (solución stock). Las placas fueron incubadas según el periodo deseado. Al finalizar del tiempo de exposición, el medio de cultivo se descartó y cada pocillo se lavó con 200  $\mu\text{L}$  de PBS y finalmente se agregaron 100  $\mu\text{L}$  de una solución 0.5 mg/mL de MTT en DMEM. La placa se incubó a 37°C en oscuridad durante 4 horas, se descartó el sobrenadante, se lavó la monocapa y se agregaron 100  $\mu\text{L}$  de DMSO para disolver los cristales violetas de formazán. Finalmente, la absorbancia de cada pocillo se registró a 570 nm empleando un lector de placas Multiskan FC Thermo. Los cálculos respectivos se realizaron empleando la Ecuación 4, donde las células control se refieren a las tratadas únicamente con 0.5% de DMSO como control de solvente.

#### 4.7.4. Ensayo Alamarblue™ o resazurina

Con el fin de determinar la viabilidad de los esferoides multicelulares (MCS) se empleó el ensayo del Alamarblue™ o resazurina.

La resazurina, como se esquematiza en la Figura 4.7-3 es un compuesto de color azul, el cual no es tóxico para las células, una vez dentro de las mismas es reducido a resurofina, un compuesto de color rojo, el cual exhibe una alta fluorescencia a 590 nm cuando es excitado a longitudes de onda entre 530 y 560 nm. Dentro de las ventajas de este método se encuentra que la resurofina es excretada extracelularmente por lo tanto no se requiere hacer una lisis celular. Asimismo, tanto la resazurina como la resurofina son hidrosolubles, lo que permite que ambos compuestos sean solubles en medio de cultivo y no se es necesario la utilización de solventes orgánicos. [238–240]

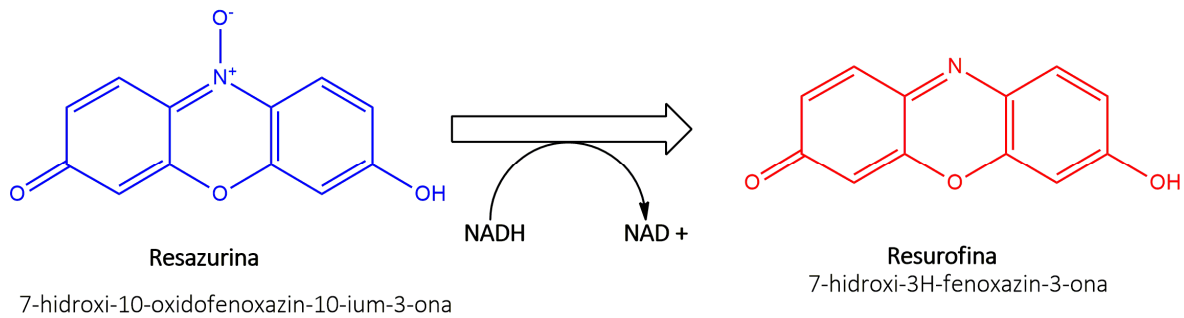


Figura 4.7-3 Reacción de reducción de resazurina dentro de las células.

Experimentalmente se siguieron los siguientes pasos: Los esferoides (MCS) fueron cultivados tal como se describe en la sección 4.6 y fueron expuestos a diferentes concentraciones de los complejos o drogas durante el periodo de tiempo deseado. Una vez finalizada la incubación, se retiraron 150  $\mu\text{L}$  de medio de cada pocillo y fueron reemplazados por 150  $\mu\text{L}$  de una solución 400 $\mu\text{M}$  de resazurina preparada en DMEM. La placa fue incubada overnight en estufa gaseada a 37°C, pasado el tiempo de incubación, se determinó la intensidad de fluorescencia de cada pocillo usando espectrofluorómetro Shimadzu RF-6000 empleando celdas de cuarzo de 400  $\mu\text{L}$ . La longitud de onda de excitación fue de 530 nm y la de emisión se registró a 590 nm. Para cada experimento se incluyeron blancos experimentales los cuales contenían DMEM, agarosa y resazurina con el fin de determinar la autoreducción de la resazurina durante la incubación, adicionalmente se incluyeron controles los cuales se refieren a esferoides tratados únicamente con 0.5% de DMSO como control de solvente.

La viabilidad de los esferoides se calculó empleando la siguiente ecuación.

$$\begin{aligned}
 & \% \text{ viabilidad esferoides} \\
 & = \frac{\text{Fluorescencia MCS} - \text{Fluorescencia blanco}}{\text{Fluorescencia MCS control} - \text{Fluorescencia blanco}} \times 100
 \end{aligned}$$

Ecuación 5 Determinación viabilidad esferoides multicelulares.

#### 4.7.5. Evaluación de la proliferación celular a través del ensayo clonogénico

Con el fin de determinar los efectos de los diferentes tratamientos, ya sea el de los compuestos o la radiación se empleó el ensayo clonogénico o formación de colonias. Dicho experimento permite evaluar la habilidad de una única célula, de formar a lo largo del tiempo colonias que contengan como mínimo 50 células (ver Figura 4.7-4).

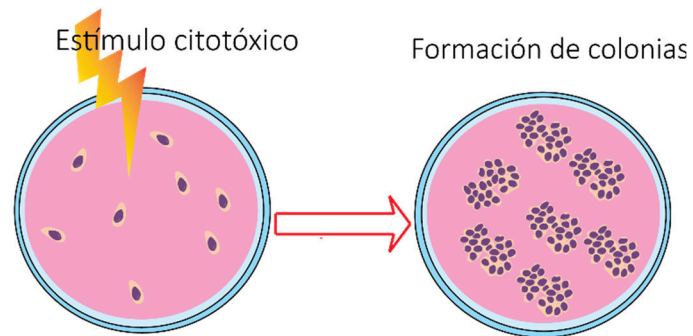


Figura 4.7-4 Representación gráfica ensayo clonogénico o de proliferación celular.

Este ensayo es el método de elección para determinar la muerte reproductiva de una célula después de un tratamiento con radiación ionizante o con otros compuestos citotóxicos. solo una fracción de la población sembrada es capaz de retener la capacidad de reproducirse y formar colonias [241,242].

El protocolo experimental de plaqueo previo al tratamiento seguido se describe a continuación: 150 células (500  $\mu$ L) por pocillo fueron sembradas la noche anterior al tratamiento en placas de 12 pocillos con DMEM + 10% de SFB, al día siguiente el medio de cultivo fue reemplazado con diferentes concentraciones de complejos e incubadas durante diferentes periodos de tiempo. En parte de los experimentos que se llevaron a cabo, las células fueron irradiadas con diferentes dosis de radiación. Este procedimiento está descrito en la sección 4.14.

Una vez que las células fueron expuestas al estímulo citotóxico, el medio fue reemplazado por 1.5 mL de DMEM + 10% de SFB y se incubaron bajo condiciones normales de cultivo durante dos semanas. Posteriormente, el medio de cultivo fue descartado, las células fueron lavadas dos veces con PBS y fijadas con 2 mL de una mezcla de 6% de glutaraldehído y 0.5% de cristal violeta durante treinta minutos. Luego, el colorante fue eliminado y los pocillos lavados con agua corriente hasta que las colonias formadas fueron claramente visibles. Las placas se dejaron secar al aire y luego cada colonia fue contada con la ayuda de un estereomicroscopio, teniendo como criterio que cada una de las colonias debería estar formada por al menos 50 células.

Los cálculos de la fracción sobreviviente se realizaron empleando la Ecuación 6 y la Ecuación 7.

$$\text{Eficiencia de plaqueo (EF)} = \frac{\text{número de colonias formadas.}}{\text{numero de células sembradas.}}$$

Ecuación 6 Determinación de la eficiencia de plaqueo (EF).

$$\text{Fracción sobreviviente} = \frac{\text{número de colonias formadas despues del tratamiento}}{\text{numero de células sembradas x EF}}$$

Ecuación 7 para la determinación de la fracción sobreviviente de células en el ensayo clonogénico.



#### 4.7.6. Tinción con fluoresceína diacetato y yoduro de propidio en esferoides multicelulares (MCS) – Live Dead staining

Esta técnica se fundamenta en el empleo simultáneo de dos colorantes fluorescentes, como lo son la fluoresceína diacetato (FDA) y el yoduro de propidio (IP), lo cual permite discriminar la población de células vivas y de células muertas.

La fluoresceína diacetato ingresa a la célula por difusión pasiva, una vez dentro, las esterasas presentes en el citoplasma hidrolizan los dos grupos acetato dando como producto la fluoresceína (ver Figura 4.7-5), molécula que emite fluorescencia en el verde (Ex. 490 nm / Em. 525 nm). Dado que la fluoresceína se encuentra en el citoplasma sólo va a ser retenida por las células que tengan la membrana intacta, lo que permite discriminar la población viable. Por el contrario, el yoduro de propidio es un colorante nuclear cargado, que es incapaz de ingresar al interior de células viables. El IP sólo puede alcanzar el núcleo celular a través de membranas que han perdido su integridad.

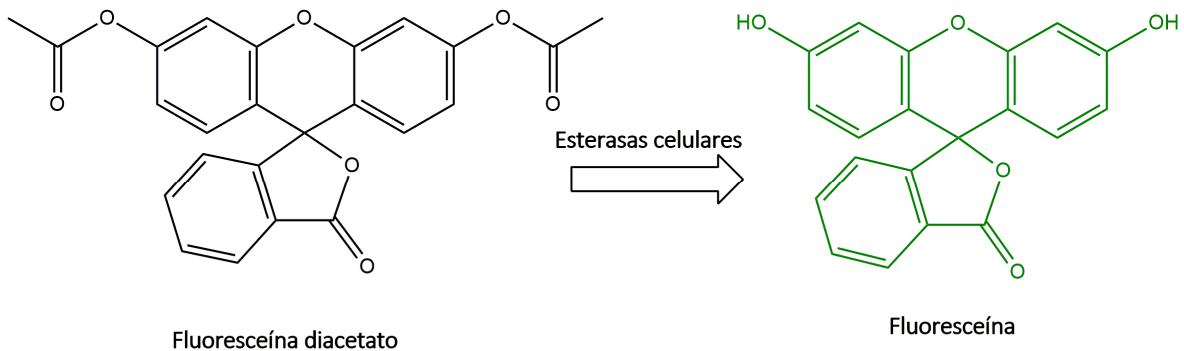


Figura 4.7-5 Reacción de hidrólisis de la fluoresceína diacetato catalizado por las esterasas celulares.

Los esferoides fueron cultivados como se indica en la sección 4.6 y fueron expuestos a diferentes concentraciones de los complejos y drogas. Una vez finalizada la incubación con los distintos agentes, se descartó entre el 85% y 90% del medio de cultivo y cada pocillo se lavó con 100  $\mu\text{L}$  de PBS, posteriormente se extrajeron 100  $\mu\text{L}$  de cada pocillo y se agregaron 150  $\mu\text{L}$  de una solución fresca de  $8 \times 10^{-3}$   $\mu\text{g}/\text{mL}$  de fluoresceína diacetato y de  $2 \times 10^{-2}$   $\mu\text{g}/\text{mL}$  de yoduro de propidio preparada en DMEM libre de suero fetal bovino. Se incubó la placa a temperatura ambiente en la oscuridad durante 5 minutos, a continuación, se retiró la solución de tinción y cada pocillo se lavó dos veces con PBS.

Finalmente, la fluorescencia en los canales para rojo y verde fue registrada usando un microscopio invertido de fluorescencia Nikon Ti Eclipse, las imágenes fueron procesadas y analizadas con los programas ImageJ y Adobe InDesign.

### 4.8. Determinación de estrés oxidativo

#### 4.8.1. Determinación de especies reactivas de oxígeno usando citometría de flujo

La presente técnica se fundamenta en el empleo de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato ( $\text{H}_2\text{DCFDA}$ ), un sustrato no fluorescente que tiene la capacidad de ingresar a la

célula a través de difusión pasiva. Una vez dentro de las mismas, los grupos aceto son hidrolizados por esterasas para producir 2',7'-diclorodihidrofluoresceína, la cual queda retenida en el interior de la célula quedando disponible como sustrato en la reacción de oxidación mediada por especies de oxígeno reactivas (ROS). Estas especies inducen un equilibrio tautomérico cetoenólico, dando como producto la 2',7'-diclorofluoresceína la cual es un fluoróforo (Ex: 501 nm, Em: 521nm) [243]. En la Figura 4.8-1 se esquematiza la reacción llevada a cabo a nivel intracelular.

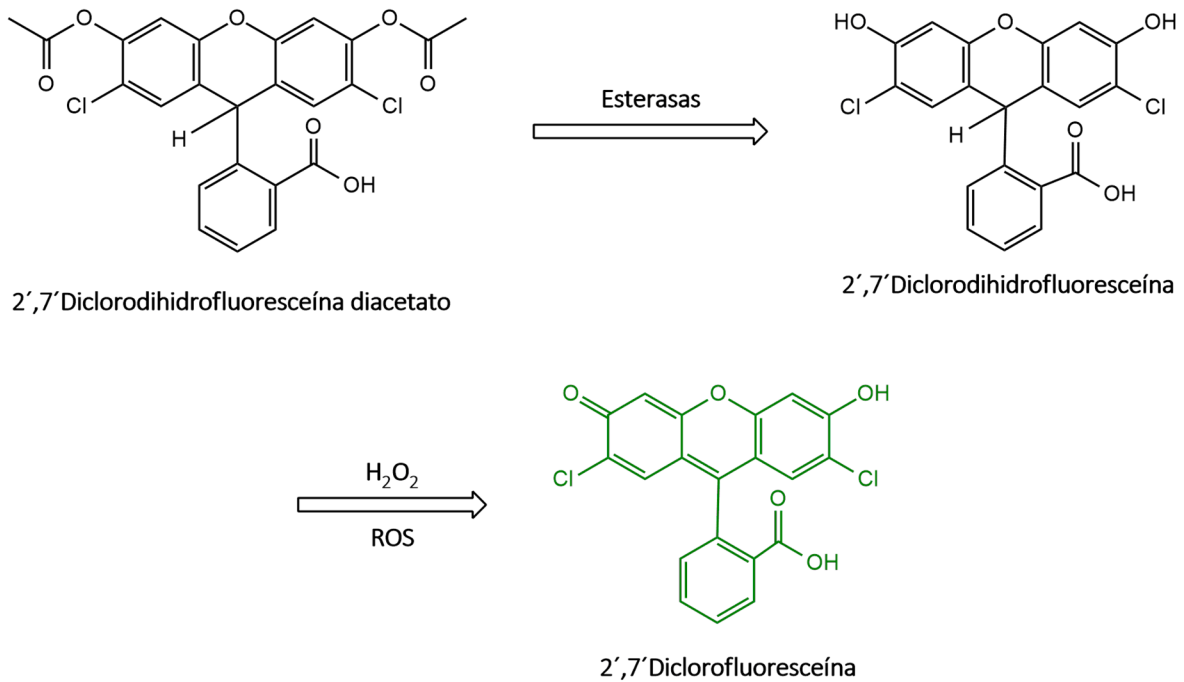


Figura 4.8-1 Esquema reacción de hidrólisis y oxidación de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato (H<sub>2</sub>DCFDA).

Para esta determinación se siguió el protocolo descrito por Chang [244] con leves modificaciones.  $3 \times 10^5$  células fueron cultivadas overnight en una placa de 12 pocillos (1 mL/pocillo), al día siguiente las células fueron expuestas a diferentes concentraciones de los complejos o drogas de interés. Una vez finalizado el tratamiento, el medio de cultivo fue transferido a tubos de centrifuga de 2 mL, la monocapa remanente fue disgregada usando 200  $\mu$ L de Tryple durante 5 minutos a 37°C. A continuación, se agregaron 300  $\mu$ L de PBS para diluir el Tryple y la suspensión celular fue homogenizada por pipeteo hasta que no se observaran cúmulos de células y fue transferida a los tubos de centrifuga que previamente contenían el medio de cultivo. Las muestras fueron centrifugadas a 1000 rpm en una microcentrifuga Hermle Z 216MK durante 5 minutos a 20°C. Posteriormente, el sobrenadante fue descartado y las células fueron lavadas 2 veces con 500  $\mu$ L de PBS e incubadas en la oscuridad con 0.1  $\mu$ M H<sub>2</sub>DCFDA por 30 minutos. Las muestras fueron centrifugadas nuevamente, lavadas con PBS y finalmente, fueron resuspendidas en 300  $\mu$ L de PBS y transferidas a tubos de citómetro.

Controles negativos (células incubadas 1 hora con NAC 5 mM), controles positivos (células incubadas 30 minutos con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.7 mM), controles de autofluorescencia (incubados sin H<sub>2</sub>DCFDA) y controles de solvente (incubados con 0.5% de DMSO) fueron incluidos en cada experimento. Las muestras fueron analizadas usando un citómetro Becton Dickinson FACScalibur. Para cada muestra fueron adquiridos 20000 eventos, las células fueron excitadas con láser de longitud de onda de 488 nm y registradas en el canal FL1. El análisis poblacional fue realizado empleando los programas Flowing 2.5.1 y FlowJo 10.0.

#### 4.8.2. Determinación de la relación GSH/GSSG.

La presencia del glutatión (GSH) al interior de la célula reviste especial importancia dado su rol como defensa antioxidante de tipo no enzimático de las células. El glutatión ( $\gamma$ -glutamyl-L-cisteinyl-glycine) es un tripéptido no proteico de tipo tiol, altamente distribuido en plantas y animales, el cual es oxidado a la forma GSSG por diferentes agentes, tales como las especies de oxígeno reactivas. Tanto los niveles de GSSG como la variación de la relación GSH/GSSG se puede correlacionar con la alteración del balance redox dentro de la célula, en la Figura 4.8-2 se esquematiza la reacción que sufre el GSH al ser oxidado.

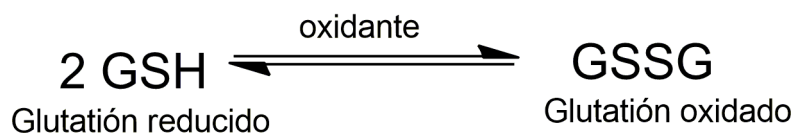


Figura 4.8-2 Esquema de la reacción de oxidación del GSH a GSSG.

La determinación de la relación GSH/GSSG se realiza de manera fluorimétrica siguiendo el protocolo reportado por Hissin [245], en el cual el GSH presente en las muestras es conjugado con o-ftalaldehído (OPT) a pH 8. Dicho conjugado emite fluorescencia a 420 nm cuando es excitado a una longitud de onda de 350 nm. La reacción se esquematiza en la Figura 4.8-3.

La determinación del glutatión oxidado (GSSG) se realiza en varias etapas, en la primera se hace un enmascaramiento del GSH presente en la muestra con N-etilmaleimida (NEM), la cual se une al grupo tiol con el fin de bloquear el átomo de azufre, y de esta manera inhibir la reacción con el OPT. En la segunda etapa, se lleva a cabo una hidrólisis alcalina para romper el puente disulfuro de las dos moléculas de GSH, que en el último paso son conjugadas con OPT. La intensidad de la fluorescencia se determina excitando la muestra a 350 nm y registrando la intensidad de fluorescencia a 420 nm. En la Figura 4.8-4 se esquematiza gráficamente el procedimiento anteriormente descrito.

Conjugación GSH-OPT

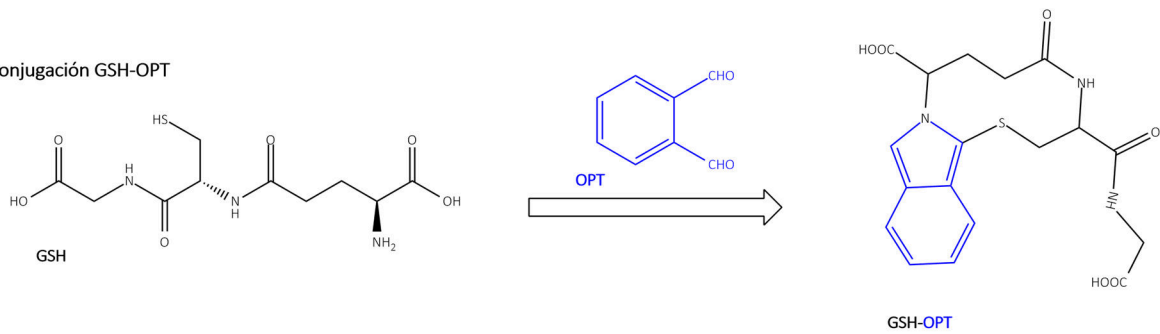
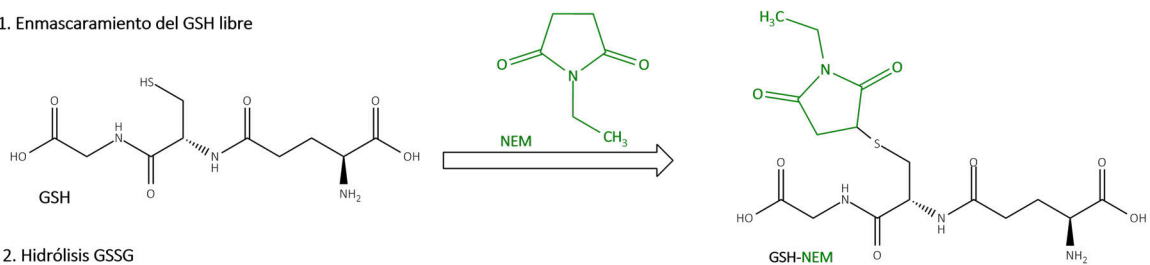


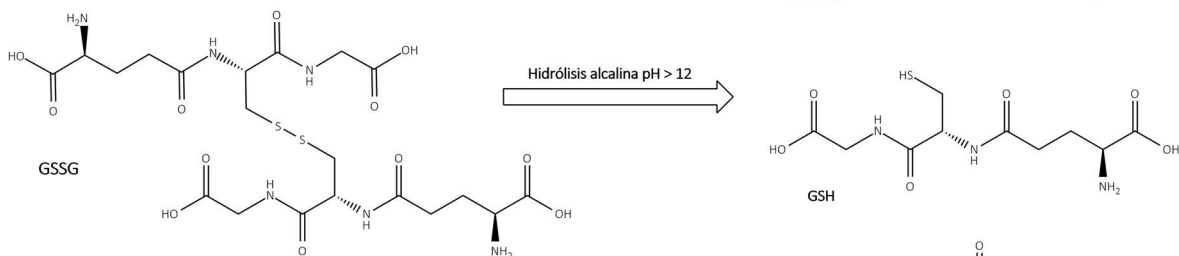
Figura 4.8-3 Esquema reacción de conjugación OPT-GSH.

Experimentalmente se siguió la siguiente metodología, en una placa de 24 pocillos se cultivaron  $1,5 \times 10^5$  células por pocillo (500  $\mu$ L), las células fueron tratadas con diferentes concentraciones de los complejos por periodos de incubación que variaron entre 6 y 24 horas. Una vez concluida la incubación, se retiró el medio de cultivo y la monocapa se lavó cuidadosamente con 500  $\mu$ L de PBS frío, posteriormente las células fueron lisadas con 250  $\mu$ L de Tritón X-100 0.1% (v/v) durante 30 minutos a 8°C protegidas de la luz.

1. Enmascaramiento del GSH libre



2. Hidrólisis GSSG



3. Conjugación OPT

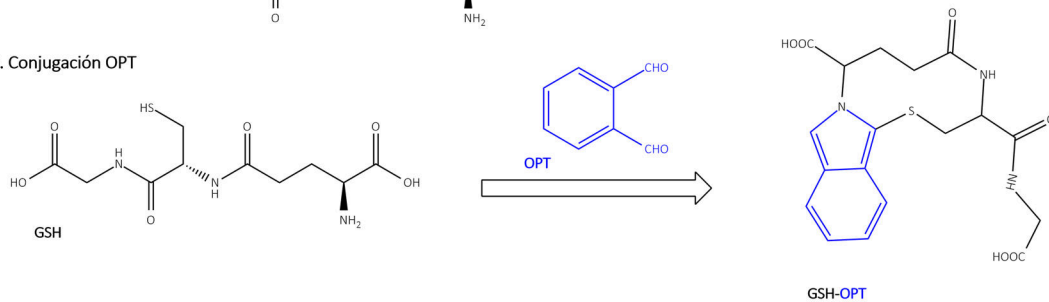


Figura 4.8-4 Esquema reacciones determinación de GSSG.

Las muestras fueron transferidas a tubos de microcentrífuga de 1.5 mL y centrifugadas a 1000 rpm durante 5 minutos a 4°C. Para la determinación de GSH, 100  $\mu$ L del lisado celular fueron transferidos a un tubo de vidrio, se agregaron 100  $\mu$ L de una solución metanólica de OPT 0.1% p/v, y finalmente se adicionaron 1.8 mL de buffer fosfato de sodio 0.1 M – EDTA 0.05 M, pH 8.0. La solución fue homogenizada y se registró la

intensidad de fluorescencia usando un espectrofluorómetro Shimadzu RF6000 a 420 nm después de excitar la muestra a 350 nm.

En el caso de la determinación de GSSG, se transfirieron 100  $\mu$ L del lisado celular a tubos de vidrio, se adicionaron 20  $\mu$ L de una solución etanólica de NEM 0.08 M y se incubaron durante 20 minutos protegidos de la luz, se agregaron 1.8 mL de NaOH 0.1 M y posteriormente se adicionaron 100  $\mu$ L de una solución metanólica de OPT 0.1 % p/v. La intensidad de la fluorescencia se registró de igual manera al caso anterior.

Los cálculos correspondientes a la relación GSH/GSSG se realizaron empleando la Ecuación 8, donde IF GSH corresponde a la intensidad de la señal derivada de la determinación del GSH, IF GSSG corresponde a la intensidad de fluorescencia al ser determinada el GSSG y en el denominador la señal de GSSG se divide entre dos con el fin de reflejar el número de moles en la muestra, no el número de moles de GSH generado tras la reacción de oxidación.

La señal de un mol de GSSG aparece como la señal de dos moles de GSH; por lo cual la medida del glutatión oxidado (GSSG) es dividida entre 2:

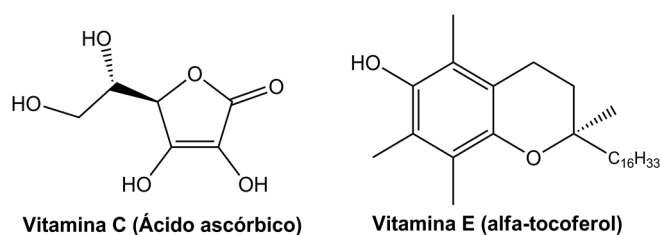
$$\text{Relación } \frac{\text{GSH}}{\text{GSSG}} = \frac{(\text{IF GSH}) - (\text{IF GSSG})}{\frac{\text{IF GSSG}}{2}}$$

*Ecuación 8 Cálculo relación GSH/GSSG.*

#### 4.8.3. Efecto de scavengers de especies de reactivas de oxígeno en la viabilidad celular

Dentro de los sistemas biológicos se pueden encontrar pequeñas moléculas con capacidad para neutralizar radicales libres en especial especies reactivas de oxígeno, nitrógeno y azufre. Entre las más comunes se encuentran la vitamina C y la vitamina E (Figura 4.8-5). Estas moléculas reaccionan con los radicales libres para de esta manera detener la reacción en cadena y minimizar el daño causado por los ROS [246].

En este caso, con el fin de confirmar si las especies reactivas de oxígeno generadas por los complejos empleados tienen un impacto en la viabilidad celular, se hicieron experimentos en los cuales las células fueron incubadas con los diferentes complejos y en simultáneo se agregaron 50  $\mu$ M de vitaminas C y E. Se aplicaron las técnicas para la determinación de la viabilidad celular descriptas en la sección 4.7.



*Figura 4.8-5 Estructura química de las Vitaminas C y E.*

Adicionalmente, con el fin de determinar el efecto de la depleción del glutatión en la viabilidad celular las células también fueron tratadas con los diferentes complejos y pre y/o co-incubadas con 100  $\mu$ M de butionina sulfoximina (su estructura química se encuentra representada en la Figura 4.8-6), esta sustancia es un inhibidor selectivo de la gamma-glutamylcisteína sintetasa, enzima responsable del primer paso en la síntesis de GSH (ver sección 1.10) y de igual manera la viabilidad de las células en cultivo se determinó tal y como ha sido expuesto en secciones anteriores [247].

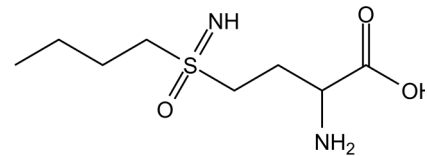


Figura 4.8-6 Estructura química Butionina Sulfoximina (BSO)

## 4.9. Determinación de apoptosis

### 4.9.1. Tinción con Anexina V-FITC y yoduro de propidio

La inducción de apoptosis o muerte celular programada es un mecanismo provocado por la misma célula, con el fin de controlar su desarrollo y crecimiento, y está desencadenado por señales celulares controladas genéticamente. En el desarrollo de nuevos fármacos antitumorales es un efecto deseado, debido a que se induce una muerte “natural” en una población en particular de células. La apoptosis se caracteriza por exhibir una variedad de cambios morfológicos entre los que se puede contar: pérdida de la simetría de membrana y adherencia, condensación del citoplasma y el núcleo y rompimiento del ADN nuclear. Evaluando dichos cambios en el tiempo se puede determinar de una manera relativamente fácil el nivel de avance en este proceso.

Uno de los primeros marcadores de apoptosis es la traslocación de la fosfatidilserina desde la cara interna de la membrana celular hacia la externa, la cual, una vez expuesta ofrece sitios en los cuales la anexina V (una proteína de unión a fosfolípidos con peso molecular 35-36-kDa dependiente de iones de calcio con una alta afinidad por la fosfatidilserina) que se encuentra conjugada con el fluorocromo FITC (Isotiocianato de fluoresceína).

El paso anterior precede otros procesos apoptóticos más tardíos, como la pérdida de integridad de la membrana plasmática, cuya evaluación se hace a través de colorantes vitales como el yoduro de propidio, el cual es excluido de células cuya membrana celular está intacta, pero en etapas finales de la apoptosis el yoduro puede ingresar al interior de la célula y adherirse al ADN y emitir fluorescencia.

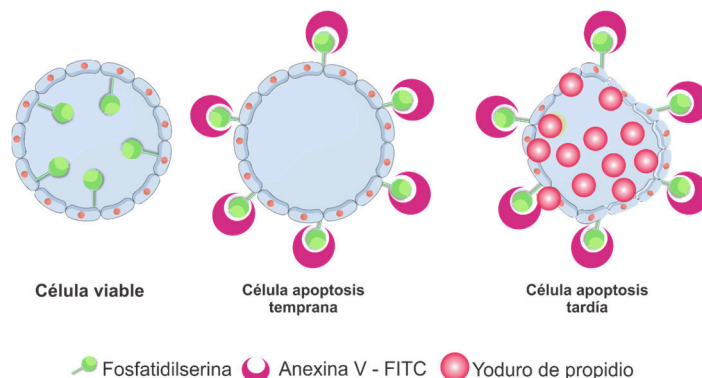


Figura 4.9-1 Esquema determinación de apoptosis.

En la Figura 4.9-1 se esquematiza de forma gráfica las tinciones y las características apoptóticas evaluadas.

A nivel experimental fue aplicado el protocolo establecido para la utilización del kit para detección de apoptosis con anexina V – FITC de BD Biosciences. Se resume brevemente a continuación:  $2.0 \times 10^5$  células por pocillo fueron cultivadas en placas de 12 pocillos (1000  $\mu$ L) overnight bajo condiciones estándar de cultivo, las células fueron tratadas con diferentes concentraciones de complejos a tiempos de incubación deseados. Una vez terminado el tratamiento, el medio sobrenadante fue transferido a tubos de centrifuga de 1.5 mL y la monocapa celular fue levantada con Tryple (200  $\mu$ L) durante 5 minutos a 37°C. Se agregaron 300  $\mu$ L de PBS y la suspensión celular fue transferida a los tubos previamente preparados.

Las muestras fueron centrifugadas a 1000 RPM durante 5 minutos a 4°C, el sobrenadante fue descartado y las células fueron lavadas con 500  $\mu$ L de PBS, las células fueron resuspendidas y centrifugadas nuevamente. El PBS fue descartado y se agregaron 100  $\mu$ L del buffer de unión y la suspensión celular fue homogenizada. De manera consiguiente, se agregaron 2  $\mu$ L de anexina FITC a cada tubo y las muestras fueron transferidas a tubos aptos para citometría e incubados protegidos de la luz durante 30 minutos a temperatura ambiente.

Finalmente, antes de la medición se agregó 1  $\mu$ L de yoduro de propidio (1 mg/mL). De cada muestra se adquirieron 20000 eventos y las intensidades de fluorescencia fueron registradas en los canales FL1 y FL2 de un citómetro de flujo BD FACScalibur.

#### 4.9.2. Determinación de caspasa 3 activa

La familia de cisteína proteasas caspasas es una familia de enzimas pertenecientes al grupo de las cisteín-proteasas, caracterizadas por presentar un residuo de cisteína que media la ruptura de otras proteínas que desempeñan un papel clave en la apoptosis y la inflamación. La caspasa-3 es una proteasa clave que se activa durante las primeras etapas de la apoptosis y, como otros miembros de la familia de las caspasas, se sintetizan como una pro-enzima inactiva que se procesa en las células experimentando apoptosis por autoproteólisis y / o escisión por otra proteasa. La caspasa-3 activa, un marcador para células que experimentan apoptosis, consiste en de un heterodímero de subunidades de 17 y 12 kDa que se deriva de la proenzima de 32 kDa. La caspasa-3 activa escinde proteolíticamente y activa otras caspasas, así como objetivos relevantes en el citoplasma, por ejemplo, D4-GDI y Bcl-2, y en el núcleo (por ejemplo, PARP). En este experimento solo se determina selectivamente la caspasa-3 activa.

El protocolo experimental empleado fue el recomendado por el proveedor del kit caspase-3 active assay (BD-biosciences, New Jersey, EE. UU.). Brevemente,  $1.5 \times 10^5$  fueron cultivadas en placas de 12 pocillos overnight, posteriormente fueron expuestas a diferentes concentraciones de los complejos y tratadas durante diferentes periodos de tiempo. Las células fueron levantadas empleando 100  $\mu$ L de Tryple™ e incubadas durante 5 minutos a 37°C, luego se agregaron 400  $\mu$ L de PBS y la suspensión celular fue transferida a tubos de centrifuga de 1.5 mL. En el caso de los esferoides, estos fueron cultivados tal

como se describe en la sección 4.6 y fueron expuestos a diferentes concentraciones de complejos. Una vez finalizado el periodo de incubación, 5 esferoides por cada concentración fueron transferidos a tubos de centrifuga de 1.5 mL, y con el fin de disociar las células se agregaron 150  $\mu\text{L}$  de tripsina 3X. Los tubos se incubaron 5 minutos a 37°C, luego cada tubo fue homogenizado utilizando un agitador tipo vortex, y cuando no se observaron cúmulos de células se agregaron 600  $\mu\text{L}$  de DMEM + 10% de suero fetal bovino.

La suspensión celular, tanto de los experimentos en monocapa como en esferoides fue centrifugada durante 5 minutos a 1000 RPM a 4°C, el pellet fue lavado 2 veces con PBS frío. Las células fueron resuspendidas en 100  $\mu\text{L}$  de la solución BD Cytofix/Cytoperm™, luego las células fueron incubadas 20 minutos en hielo, y nuevamente centrifugadas y lavadas dos veces con 250  $\mu\text{L}$  de la solución BD Perm/Wash™. Las células fueron resuspendidas en 250  $\mu\text{L}$  de la última solución y 10  $\mu\text{L}$  del anticuerpo anti-caspasa 3 fueron agregados e incubados durante 30 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, las células se lavaron con 500  $\mu\text{L}$  de la solución Perm/Wash™ y fueron resuspendidas en 300  $\mu\text{L}$  de ésta última solución y analizadas a través del citómetro de flujo en el canal FL1, por cada ensayo se analizaron  $2.0 \times 10^4$  células.

#### 4.10. Evaluación del ciclo celular

Como se ha expuesto en la sección 1.8 las células siguen una serie ordenada de procesos estrictamente controlados con el fin de dividir y duplicar su ADN y autorreproducirse para formar dos células hijas.

La posibilidad de alterar de una manera controlada esta serie de procesos ofrece una potencial herramienta terapéutica en el tratamiento del cáncer, por lo cual es una prueba necesaria en la evaluación de los mecanismos de acción.

Uno de los marcadores representativos de este proceso es la cantidad relativa de ADN presente en cada célula a lo largo del ciclo celular, lo cual brinda una herramienta a nivel de investigación para hacer un seguimiento de dicho fenómeno. Por tanto, realizando marcaciones del ADN con colorantes fluorescentes como el yoduro de propidio y el DAPI, entre otros, se puede correlacionar la cantidad de ADN con la intensidad de fluorescencia. Al analizar la población celular en un citómetro de flujo, el histograma mostrará una distribución bimodal (ver Figura 4.10-1). En la fase G1 la célula se encuentra metabólicamente activa, pero no se está replicando el ADN, por lo tanto, su contenido de ADN puede ser representado como 2n (n es el contenido de DNA haploide en el

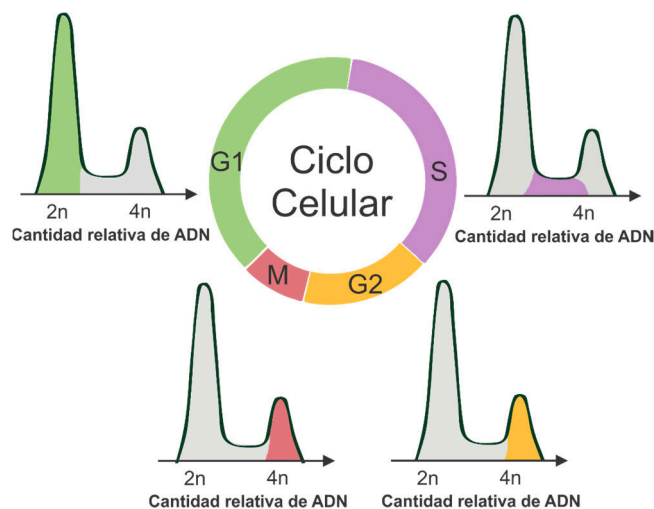


Figura 4.10-1 Esquema representativo correlación entre la cantidad relativa de ADN y las fases del ciclo celular.



genoma), en la fase S o de síntesis el material genético se reproduce por lo tanto su cantidad incrementará con respecto a G1 y por lo tanto su fluorescencia. Finalmente, en la fase G2 la célula sintetiza proteínas para iniciar la mitosis y tiene el doble de ADN (4n) esta cantidad relativa de ADN se mantendrá también durante la fase M hasta que se ocurra la citocinesis.

El procedimiento experimental aplicado fue el siguiente:  $1.5 \times 10^5$  células fueron cultivadas en placa de 12 pocillos overnight, las células fueron tratadas con los complejos por distintos periodos de tiempo. Una vez finalizado el tratamiento, el sobrenadante de las células fue transferido a tubos de centrifuga de 1,5 mL. La monocapa celular fue lavada con PBS y se agregaron 100  $\mu$ L de Tryple y se incubó durante 5 minutos a 37°C, luego se agregaron 500  $\mu$ L de PBS, se homogenizó la suspensión celular con pipeta y fue transferida a los tubos de centrifuga.

Las muestras fueron centrifugadas durante 5 minutos a 2500 rpm y el sobrenadante fue descartado, el pellet se lavó con PBS (1 mL), se centrifugó y eliminó el sobrenadante. Posteriormente a cada tubo se le agregó gota a gota un mililitro de etanol absoluto frio (-20 °C), la suspensión se homogenizó suavemente con vortex (5 segundos) y se incubaron las muestras durante 2 horas a 8 °C. Los tubos se centrifugaron y el sobrenadante fue descartado y lavado con 500  $\mu$ L de PBS/EDTA 2 mM. La muestra se centrifugó nuevamente y las células fueron resuspendidas en 300  $\mu$ L de la solución PBS/EDTA 2mM. Con el fin de eliminar la interferencia de ARN se agregaron a cada tubo 15  $\mu$ L de una solución RNAsa (1 mg/mL) y las muestras se incubaron 20 minutos a 37°C. Las células fueron teñidas con 15  $\mu$ L de una solución 1 mg/mL de yoduro de propidio, overnight a 8°C.

Las muestras fueron analizadas en citómetro de flujo en el canal FL3 en formato lineal, se analizaron 10000 eventos por muestra y el análisis de datos se realizó con el software Flowjo 10.

#### **4.11. Ensayos de genotoxicidad.**

##### **4.11.1. Electroforesis en gel de una única célula (Ensayo cometa)**

El ensayo de electroforesis de una única célula (Ensayo Cometa) es utilizado para detectar quiebres simples y dobles del ADN y sitios lábiles al álcali [248]. Teniendo en cuenta el rol de las especies de oxígeno reactivas como agentes que potencialmente pueden inducir oxidación a nivel del ADN, se utilizó la digestión con la enzima EndoIII (ec 4.2.99.18), una enzima reparadora del ADN de *Escherichia coli* que escinde bases purínicas oxidadas, en particular, 8-oxo-7,8-dihidroguanina (8-oxo-Gua), y formamidopirimidinas, aunque también ataca aductos de guanina N7 de anillo abierto producidos por agentes alquilantes [249]. Por lo tanto, la incubación con esta enzima produce un aumento de los quiebres en la hebras de ADN con respecto a las no incubadas y se puede correlacionar un el daño causado por los ROS en el ADN a través de esta experiencia.

Las células se subcultivaron en placas de 12 pocillos (40000 células/pocillo) y fueron tratadas con el compuesto de interés, usando concentraciones inferiores al IC50. Luego las células se resuspendieron en 80 $\mu$ L de 0.5 % de agarosa de bajo punto de fusión y

rápidamente se colocaron sobre portaobjetos tratados previamente con 1% de agarosa de punto de fusión normal. Los portaobjetos se prepararon por duplicado, uno se usó para evaluar los quiebres simples en la hebra de ADN y el otro se incubó con EndoIII para evaluar la presencia de bases oxidadas.

Las muestras se colocaron a 4 °C por 5-10 minutos y luego se sumergieron en solución de lisis a 4°C (2.5 M NaCl, 10 mM Tris-HCl buffer, 100 mM Na<sub>2</sub>EDTA, 1% Tritón X-100, 10% DMSO a un pH de 10) al menos por 1 h para lisar las células, desnaturalizar las proteínas y desenrollar las hebras de ADN. Los portaobjetos se lavaron tres veces con buffer HEPES (0.1 M KCl, 0.5 mM Na<sub>2</sub>EDTA, 40 mM HEPES-KOH y 0.2 mg/mL de albúmina sérica bovina con pH 8.0). Luego, fueron incubadas a 37°C por 45 minutos con la enzima disuelta en buffer HEPES o con el buffer sólo. Posteriormente las muestras se colocaron en buffer de electroforesis (1mM Na<sub>2</sub>EDTA, 300mM NaOH, pH 12.7) por 20 minutos y se realizó la corrida electroforética a 25V ( $\approx$  0.8V/cm) por 30 minutos a 4 °C, en la oscuridad. Luego, los preparados se neutralizaron con buffer TRIS-HCl, se tiñeron con SYBR Green 1X y se analizaron en microscopio de fluorescencia ( $\lambda$  excitación = 498 nm y de  $\lambda$  emisión = 522 nm). Un pulso de 20 minutos con 10  $\mu$ g/mL de bleomicina antes de levantar las células fue empleado como control positivo.

Las células con mayor daño del ADN mostraron mayor migración del material genético que se pudo visualizar como la “cola” de un cometa. Se midieron las longitudes de las colas de al menos 100 células, así como la intensidad de fluorescencia. Se calculó el “Tail Moment” como la longitud de la cola por la cantidad de ADN en la cola (intensidad de fluorescencia) utilizando el Comet Score™ Freeware v1.5.

#### 4.11.2. Ensayo micronúcleo.

El ensayo de MN permite evaluar el daño producido por agentes aneugénicos y/o clastogénicos. Durante la división celular el ADN se replica y divide equitativamente dando lugar a dos células hijas idénticas; este proceso puede producirse de manera errónea debido al quiebre en algún cromosoma (efecto clastogénico), o por separación de alguno de ellos (efecto aneugénico). Cuando esto ocurre, el material genético que se desprende y que, por tanto, queda excluido, no se incorpora correctamente al núcleo de la célula hija, y origina un nuevo núcleo de menor tamaño que el primario, denominado “micronúcleo” (MN), visible fácilmente al microscopio óptico [250].

Brevemente, las células se sembraron en placas de 6 pocillos ( $4 \times 10^4$  células/ pocillo) por 24 h. Se cambió el medio por otro que contiene la sustancia de interés y citocalasina B (3  $\mu$ g/mL) y se incubó a 37°C en 5% CO<sub>2</sub>. Luego del tratamiento, se las trató con solución hipotónica y posteriormente fueron fijadas con metanol-ácido acético (3:1). Los preparados se secaron y se tiñeron con Giemsa 5% para la observación al microscopio. Se analizaron 500 células binucleadas por pocillo [251].

#### 4.12. Invasión de esferoides en geles de colágeno

Una de las mayores complicaciones del cáncer se relaciona con la metástasis, en la cual células migran desde un punto dentro del organismo a otro a través del torrente sanguíneo, ocasionando una invasión de otros órganos no afectados inicialmente. Por lo

cual es importante evaluar si las nuevas sustancias bajo investigación tienen la capacidad de evitar que las células migren del punto inicial de crecimiento hacia otro.

Siendo los esferoides un modelo 3D de pequeños tumores avasculares, su inmersión en geles de colágeno proporciona un sistema *in vitro* para evaluar las propiedades antimetastásicas preliminares de los compuestos. En dicho experimento los esferoides fueron cultivados como se describe en la sección 4.6 y fueron transferidos a una nueva placa multipocillos de 96 pocillos, siguiendo el siguiente procedimiento: primero a cada pocillo se le agregaron 50  $\mu\text{L}$  de una solución fría formada 10 % de medio de cultivo MEM (10X) y 80% de la solución de colágeno, el pH fue ajustado con 25  $\mu\text{L}$  NaOH 1M estéril por cada mililitro de solución de colágeno. Posteriormente la placa fue transferida a una estufa a 37°C para permitir la gelificación del colágeno. Una vez que la capa inferior de colágeno se encontró gelificada, se transfirió a cada pocillo un esferoide, se dejó sedimentar y delicadamente se agregaron 50  $\mu\text{L}$  de la solución fría de colágeno previamente descrita; de igual manera, se transfirió durante 30 minutos a una estufa a 37°C con el fin de que se gelifique el colágeno.

Una vez que el gel gelificó completamente, se agregaron 100  $\mu\text{L}$  de una solución de los complejos a evaluar y se documentó fotográficamente el tamaño del esferoide, el área y descriptores de forma, los cuales son un set de números calculados con la finalidad de representar una determinada propiedad o característica geométrica de una imagen bajo estudio para eventualmente permitir su caracterización o discriminación de otras figuras (ver sección 4.16). las mediciones fueron realizadas empleando el programa ImageJ®.

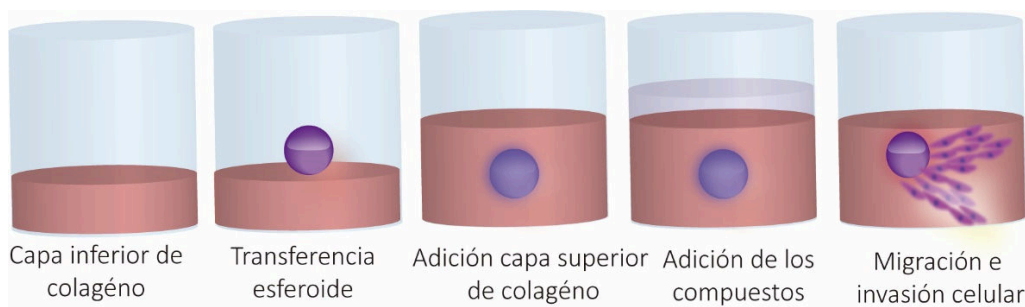


Figura 4.12-1 Esquema experimento invasión de esferoides en geles de colágeno.

#### 4.13. Ensayo de proliferación o spreading celular desde esferoides

Este ensayo se llevó a cabo con el fin de evaluar la remanencia de la capa proliferante (ver sección 1.11), y la capacidad reproductiva de las células que componen esta zona de los esferoides, luego de ser tratados con los diferentes compuestos.

Para esto, se siguió el protocolo experimental descrito a continuación: los esferoides fueron cultivados como se indica en la sección 4.6, expuestos a diferentes concentraciones de complejos e incubados a 37 °C con 0.5 % de CO<sub>2</sub>. Una vez que el tratamiento con el compuesto finalizó, los esferoides se transfirieron a una nueva placa

de cultivo con DMEM + 10 % SFB, la que se colocó nuevamente en la estufa a 37 °C. Los días subsiguientes se documentó, a través de microfotografías en contraste de fase, la proliferación de la población de células adheridas a la placa provenientes del cuerpo principal del esferoide. La cantidad o extensión de dicho crecimiento celular se analizó cualitativamente y se comparó con los esferoides o muestras control.

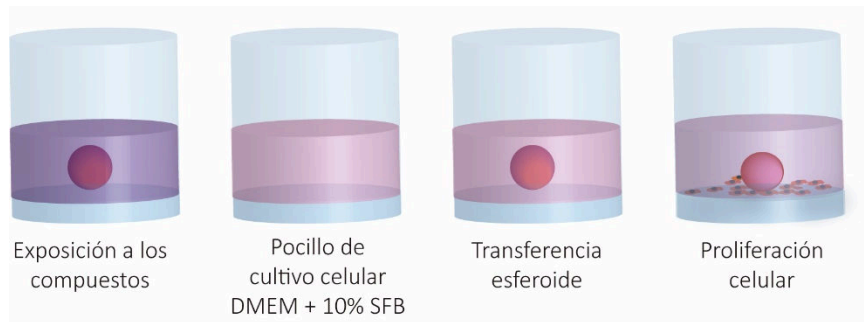


Figura 4.13-1 Ensayo de proliferación o spreading celular desde esferoides

#### 4.14. Procedimiento de irradiación de células

Las células empleadas en los experimentos que involucran radiación ionizante se prepararon y trataron de la forma que se describe en la sección 4.7.5 Evaluación de la proliferación celular a través del ensayo clonogénico.

Para irradiar las células se empleó un acelerador lineal Varían Clinac® 6MV (Varian Medical Systems, Palo Alto, California, EE. UU.). La tasa de dosis fue de 300 cGy/minuto. Las placas de cultivo con las células se ubicaron al interior de un recipiente phantom de acrílico lleno con agua destilada hasta una altura equivalente a la del medio de cultivo dentro de los pocillos en las placas, cuya densidad es equivalente al tejido blando. El montaje se ubicó en un panel de soporte de tipo raqueta de tenis del acelerador y se irradió desde la parte inferior del montaje. Los haces de fotones del isocentro (2, 4, 6, 12 Gy) se irradiaron usando un campo de 10 x 15 centímetros. Una vez concluida la irradiación, el medio de cultivo fue reemplazado por DMEM fresco + 10% SFB y las células fueron incubadas hasta el momento de revelar las colonias como se describe en la sección 4.7.5.

#### 4.15. Cuantificación de la cantidad de cobre en el interior de las células

El cobre es un biometal cuyo ingreso al interior de las células se encuentra altamente regulado, tal como se expone en la sección 1.6 por lo que es de interés cuantificar la cantidad de este elemento que es transportado al interior de las células, luego de ser tratadas con los diferentes complejos contemplados dentro de este trabajo de tesis doctoral.

El procedimiento experimental seguido se describe a continuación. Las  $2 \times 10^5$  células/mL fueron cultivadas en cajas de Petri de 100 mm (8 mL) y se dejaron crecer bajo condiciones estándar de cultivo (ver sección 4.5) hasta lograr una confluencia de entre el 80 y 90%

(aproximadamente 48 horas), el medio fue descartado y reemplazado por 8 mL de medio con diferentes concentraciones de los complejos de cobre, las células fueron tratadas durante 24 horas.

Una vez que se completó el tiempo de incubación, el medio sobrenadante fue transferido a tubos de centrifuga plásticos de 15 mL y la suspensión celular fue centrifugada durante 10 minutos en una centrifuga Rolco CM 2036 de ángulo oscilante a 500 rpm, el sobrenadante fue descartado por volcado. La monocapa celular fue disgregada con 2 mL de Tryple™ e incubada durante 20 minutos a 37°C; una vez pasado el periodo de incubación, a cada placa se le agregaron 5 mL de DMEM, con el fin de resuspender las células y transferir dicha suspensión a los tubos de centrifuga previamente utilizados y rotulados. Las muestras fueron centrifugadas (500 rpm por 10 minutos) y el sobrenadante fue descartado. Con el fin de eliminar el cobre externo a las células éstas fueron lavadas 2 veces con 10 mL de PBS frio, centrifugando a 500 rpm durante 10 minutos. Finalmente, las células se resuspendieron en 2 mL de PBS y se centrifugaron bajo las condiciones ya presentadas, el sobrenadante fue descartado delicadamente evitando perturbar el pellet celular. A cada tubo se le agregaron 150 µL de una solución 0.1% (v/v) de Tritón-X100, la suspensión celular se sometió a agitación mecánica con vortex durante 10 minutos con el fin de inducir lisis celular y se separó una alícuota de 10µL con el fin de determinar la concentración de proteínas en cada muestra. A cada muestra se le agregó 1 mL de una solución de ácido nítrico 20%, se homogenizó mecánicamente con vortex y los tubos fueron transferidos a un baño ultrasónico a 55°C y las muestras fueron sonicadas a máxima potencia durante 60 minutos y posteriormente almacenadas en heladera durante 48 horas. A continuación, las muestras fueron puestas de nuevo en baño ultrasónico a 55°C durante dos horas e inmediatamente centrifugadas a 3000 rpm durante 20 minutos y 1000 µL de cada muestra fueron trasferidos a nuevos tubos de centrifuga de 15 mL.

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

#### **4.16. Análisis digital de imágenes**

Para el análisis de las fotografías adquiridas, las cuales son proyecciones bidimensionales de objetos 3D, se realizó digitalmente una transformación en objetos binarios donde cada píxel adquirió un valor de 0 o 1, en función de que dicho espacio sea blanco o negro, respectivamente. Tales imágenes fueron caracterizadas morfológicamente a través del programa ImageJ®, lo cual permitió calcular descriptores de forma clásicos como el perímetro (contorno de la forma), el área (el número de pixeles ocupados por la forma), la circularidad (se relaciona que tanto se asemeja la figura estudiada a una esfera, entre más cercano a uno sea dicho valor mayor será la semejanza a una esfera), el diámetro de Feret (se define como el valor medio de la distancia entre dos líneas paralelas

tangenciales al perímetro), redondez (se puede correlacionar con la presencia o ausencia de irregularidades, a mayores valores más regular o menos angular será la figura), relación de aspecto (se determina al dividir la distancia del lado más largo de la figura entre el más corto: si el valor de este cociente es cercano a la unidad se puede inferir que la figura evaluada tendrá una forma redondeada). Dichos estudios morfológicos en imágenes han sido ampliamente estudiados por [252,253].

$$\text{Área} = \pi r^2$$

*Ecuación 9 determinación área de un círculo.*

$$\text{Relación de aspecto} = \frac{\text{eje mayor}}{\text{eje menor}}$$

*Ecuación 10 Determinación relación de aspecto.*

$$\text{Redondez} = 4 \times \frac{\text{área}}{\pi \times [\text{eje mayor}]^2}$$

*Ecuación 11 Determinación de la redondez.*

$$\text{Circularidad} = 4\pi \times \frac{\text{área}}{\text{perímetro}^2}$$

*Ecuación 12 Determinación circularidad.*

#### 4.17. Evaluación de sinergia entre diferentes compuestos.

Con el objetivo de evaluar la posible sinergia al combinar diferentes compuestos empleados en esta tesis, se aplicó la metodología de análisis del efecto de dosis media descrito por Chou [254–256]. Dicho método es el más difundido para analizar combinaciones de drogas tanto a nivel de ensayos clínicos como preclínicos. Este modelo asume que las curvas de efecto en función de la concentración (en el caso de esta tesis inhibición de la viabilidad celular) tendrán una forma sigmoidea, el nivel de ajuste a la forma sigmoidea ( $m$ ) y la  $D_m$  (equivalente al IC50), pueden ser estimados primero haciendo la transformación logarítmica de los valores de concentración. Consecutivamente, una regresión lineal de los datos logarítmicos puede ser ajustados en una ecuación en la cual, el efecto inhibitorio del crecimiento ( $Fa$ ) de cada droga evaluada,  $m$  y la  $D_m$  permiten calcular el índice de combinación ( $CI$ ). El  $CI$ , toma valores de 0 a infinito indicando que entre menor sea dicho valor, más intenso será el sinergismo y a valores más altos el comportamiento tenderá al antagonístico (ver Tabla 4.17-1). En la Ecuación 13 y Ecuación 14 se describen los parámetros de cálculo empleados para en las experiencias de sinergismo [257].

$$D_{1-Fa} = D_x \left[ \frac{Fa}{(1 - Fa)} \right]^{1/m}$$

*Ecuación 13 Cálculo de dosis para las distintas drogas y combinaciones para inducir varios niveles de citotoxicidad.*

$$CI = \frac{(D)_1}{(D_{1-fa})_1} + \frac{(D)_2}{(D_{1-fa})_2} + \left[ \frac{\alpha(D)_1(D)_2}{(D_{1-fa})_1(D_{1-fa})_2} \right]$$

*Ecuación 14 Para la determinación del índice de combinación donde  $(D)_1$  y  $(D)_2$  representa la concentración de la combinación de los compuestos, mientras que  $(D_{1-fa})_1$  y  $(D_{1-fa})_2$  son las concentraciones de los compuestos individuales a diferentes niveles de citotoxicidad  $(1-Fa)$  y  $\alpha=1$ .*

Tabla 4.17-1 Valores del índice de combinación y su indicación

Valor de CI	Indicación
< 0.1	Sinergismo muy fuerte
0.1 – 0.3	Sinergismo fuerte
0.3 – 0.7	Sinergismo
0.7 – 0.85	Sinergismo moderado
0.85 – 0.9	Ligero sinergismo
0.9 – 1.1	Aditivo
1.1 – 1.2	Ligero antagonismo
1.2 – 1.45	Antagonismo moderado
1.45 – 3.3	Antagonismo
3.3 – 10	Fuerte antagonismo
> 10	Antagonismo muy fuerte

A nivel experimental se obtuvieron a través de los ensayos de viabilidad ya sea el MTT (sección 4.7.3) para los experimentos en monocapa o de resazurina (sección 4.7.4) en el caso de los esferoides multicelulares. Posteriormente, los datos se transformaron empleando la Ecuación 15 para obtener los datos como fracción afectada (Fa). Finalmente, los valores de CI fueron calculados usando el programa compusyn versión 1.0.

$$Fa = 1 - \left( \frac{\% \text{ viabilidad celular}}{100} \right)$$

*Ecuación 15 Para el cálculo de los valores experimentales de Fa.*

#### 4.18. Métodos estadísticos empleados.

Con el fin de comparar si hay diferencia significativa entre los diferentes tratamientos aplicados en los experimentos, se realizaron análisis de tipo ANOVA con el fin de rechazar la hipótesis nula de que las medias del grupo tratado y el control son iguales con un valor alfa de 0.05. Posteriormente se aplicaron las pruebas post-hoc de Tukey HSD (Honestly Significantly Different) para comparar las medias de los grupos pareados de tratamientos y establecer rangos de varianza y se aplicó según el caso el test de Dunnett con el fin de comparar la media de un tratamiento con la media de un grupo de control.

Adicionalmente, se aplicaron pruebas estadísticas de análisis multivariado (análisis de componente principal y análisis de conglomerados) con las variables resultantes de los descriptores de forma derivados de la estandarización del cultivo de esferoides multicelulares (sección 5.1).

Los cálculos a nivel estadístico fueron realizados empleando los programas Graphpad Prism 6, StataSoft Statistica 12.5 y Statgraphics Centurión 18.





## 5. Resultados y discusión

### 5.1. Estandarización cultivo de esferoides multicelulares

Como se expuso en la sección 1.11, el uso de esferoides multicelulares en estudios in vitro ofrece una alternativa valiosa en la investigación de potenciales drogas para el tratamiento del cáncer, ya que es un modelo de células en cultivo que presenta similitudes fisiológicas y bioquímicas a las que posee un tumor sólido prevascular in vivo [258].

La diversidad de métodos para cultivar los esferoides multicelulares ofrece un abanico de posibilidades para ser adaptado a las condiciones de cada laboratorio; en nuestro caso se aplicaron dos de los métodos más accesibles y ampliamente difundidos, como son el cultivo por gota pendiente (hanging drop) y liquid-overlay. Cada una de las metodologías ofrece ventajas y desventajas explicitadas en el apartado 1.11.

Para el cultivo de esferoides de células A549 cabe aclarar que, en las primeras etapas de puesta a punto del sistema de cultivo, se compararon ambos métodos, sin embargo, dado que el método de gota pendiente a pesar de ofrecer esferoides con una distribución de tamaño muy homogénea presentó deficiencias en cuanto a la cantidad de esferoides obtenidos (rendimiento) y consume mayor cantidad de recursos tanto como placas de cultivo y tiempo del operador en el cuarto de cultivo. Mientras que el método de liquid-overlay a pesar de requerir mayor tiempo de cultivo para alcanzar los parámetros aptos de trabajo es compensado con la cantidad o número de esferoides que se obtienen por experimento.

Carver y colaboradores [259] han indicado que esferoides con un diámetro de entre 200 y 500  $\mu\text{m}$  presentan gradientes de oxígeno, nutrientes y catabolitos, manteniendo analogías morfológicas y funcionales similares a un tumor, mientras que Mittler y Vinci sugieren que un tamaño de 400  $\mu\text{m}$  es óptimo para estudios preclínicos para terapia antitumoral [260,261]. Por lo tanto, el primer objetivo al iniciar los cultivos fue obtener esferoides con dicho diámetro.

#### 5.1.1. Selección del tamaño de esferoide.

En el diseño experimental se sembraron diferentes cantidades de células en placas de 96 pocillos (500, 1000, 2000, 3000, 4000 y 5000 células). El crecimiento y formación del esferoide se documentó desde las 48 hasta las 144 horas de cultivo. Dentro de las primeras 48 horas del cultivo de los esferoides, se observan varias etapas como la sedimentación de las células en el fondo del pocillo y la formación de un agregado flojo de células vía integrinas-matriz extracelular (MEC), a continuación se observa un periodo de retraso, en el cual se incrementa la expresión y acumulación de E-caderinas para finalmente compactarse y formar los esferoides a través interacciones caderina-caderina [151].

Una vez los esferoides se formaron, se documentó fotográficamente la evolución de sus características morfológicas a 48, 72, 96, 120 y 144 horas, se realizó un análisis tanto del tamaño de cada esferoide como de los descriptores de forma presentados en la sección 4.16.

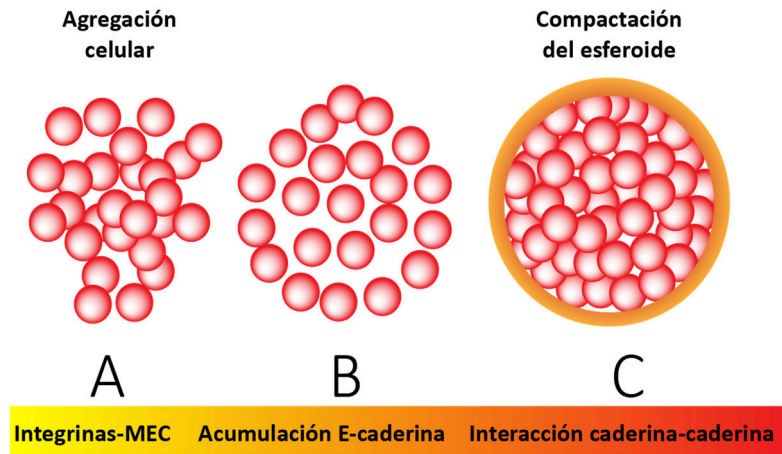


Figura 5.1-1 Esquema representativo de la agregación y compactación celular [151]

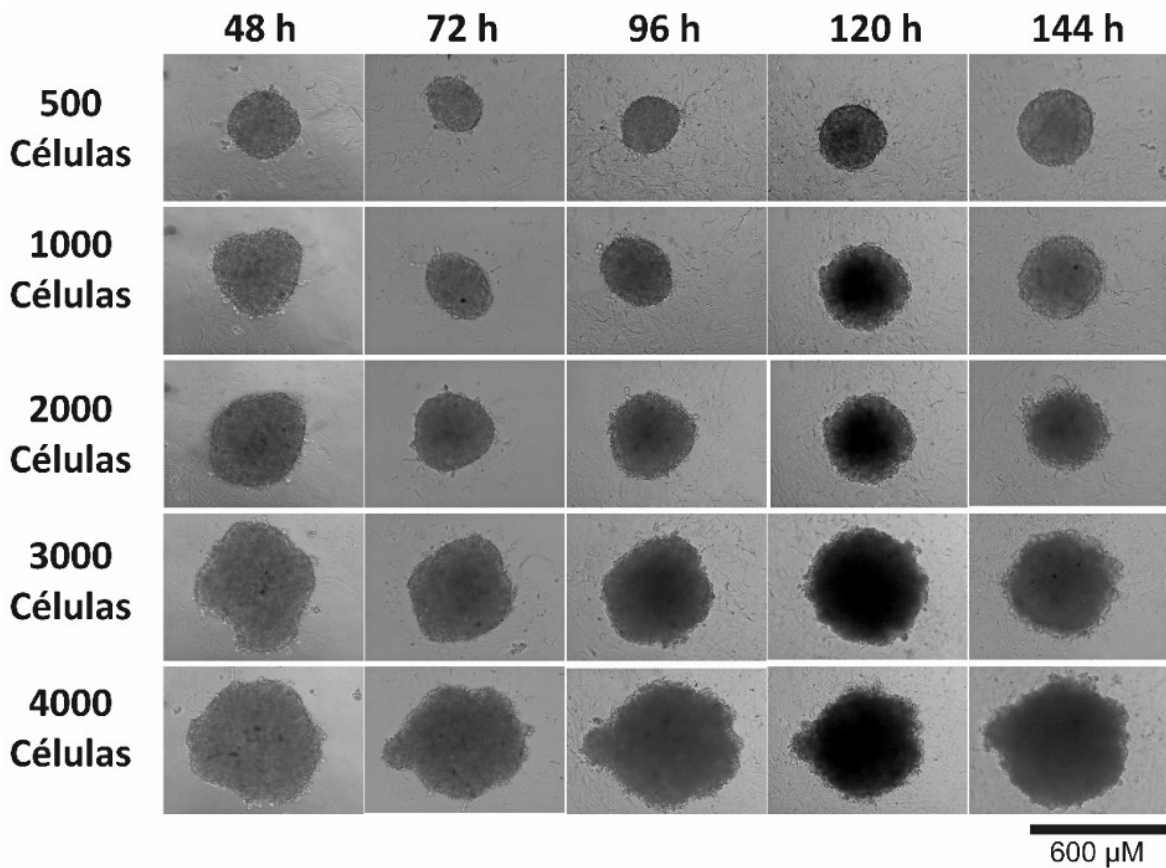


Figura 5.1-2 Evolución del crecimiento de los esferoides de A549 a diferentes densidades de plaqueo.

En la Figura 5.1-2 se puede observar un collage de las fotografías adquiridas de los esferoides a distintos tiempos de cultivo y las diferentes densidades de plaqueo, además, en la Figura 5.1-3 se presenta un diagrama de cajas y bigotes en el cual, se representa gráficamente el diámetro de 20 esferoides analizados por cada concentración de células estudiada, donde se puede observar que las concentraciones de 500, 1000 y 2000 células por pocillo son las que ofrecen esferoides en el rango de trabajo de 200 y 400  $\mu\text{m}$  durante todo el periodo de tiempo analizado, mientras que concentraciones superiores no solo exceden los 400 micrómetros, sino que también se da un aumento en la dispersión de las medidas, tal dispersión de tamaños no es ideal al hacer screening de potenciales drogas citotóxicas, puesto que la presencia de gradientes de concentración es una de las características que se intenta explotar en estos modelos preclínicos, además de la homogeneidad en la morfología y la geometría es un requisito fundamental para la obtención de datos confiables y extrapolables a otros sistemas.

Una observación valiosa de este análisis, con respecto a la evolución del tamaño de los esferoides es que se puede apreciar que pasadas las 72 horas, el valor de la mediana del diámetro del esferoide se reduce en comparación con la medición de las 48 horas, lo cual estaría indicando que el esferoide estaría en las fase C de la compactación (ver Figura 5.1-1) donde hay un grado mayor de interacción entre las células vía caderinas. Tal observación se hace más notoria a mayor densidad de células cultivadas.

Teniendo como primer criterio de selección que el tamaño del esferoide se encuentre alrededor de los 400 micrómetros, con una dispersión de datos pequeña se seleccionaron las densidades de siembra de 1000 y 2000 células por pocillo como las más adecuadas (ver Tabla 5.1-1)

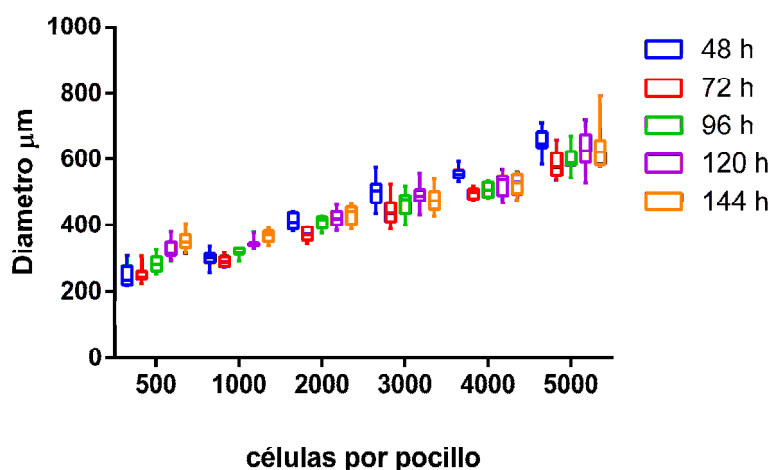


Figura 5.1-3 Diagrama de caja y bigotes para la evolución del diámetro de los MCS en el tiempo a diferentes densidades de plaqueo.

Tabla 5.1-1 Resumen de la mediciones del diámetro de los esferoides formados a partir de diferente cantidad de células sembradas, expresadas como valores promedio ( $\mu\text{m}$ ) y su desviación estándar, SD, el n muestral es 20 esferoides para cada concentración de células.

Horas	500 células		1000 células		2000 células		3000 células		4000 células		5000 células	
	Media	SD	Media	SD	Media	SD	Media	SD	Media	SD	Media	SD
48	243.8	12.5	304.1	7.3	410.9	5.5	495.2	8.7	552.4	3.7	646.2	6.2
72	252.2	10.2	291.9	5.2	373.5	4.8	443.1	9.3	497.3	3.1	589.2	7.2
96	284.5	9.5	319.3	4.2	408.4	4.9	465.9	7.6	508.7	3.8	602.1	6.0
120	321.7	8.3	346.3	4.0	421.7	6.1	492.6	7.4	525.7	6.4	628.7	9.5
144	351.9	7.3	367.4	4.8	430.5	6.7	478.6	7.1	524.2	5.7	638.5	10.0

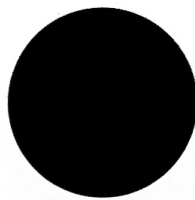


Figura 5.1-4 fotografía escalada del círculo de calibración empleado.

### 5.1.2. Homogenización de la forma de los esferoides (descriptores de forma)

En la Figura 5.1-5 se presenta el gráfico de cajas y bigotes para el descriptor de forma redondez, este valor se relaciona con la regularidad de la figura analizada como se introdujo en el apartado 4.16. La redondez se eligió parámetro de selección, puesto que se espera que a medida que el esferoide se compacte a lo largo del tiempo sus bordes adquieran una forma menos angular, en la figura encontramos dicha correlación, ya que los valores de este descriptor tienden a la unidad en el periodo de tiempo entre 48 y 120 horas, para luego decaer. De la gráfica se puede analizar que las mediciones de esferoides formados a partir de 500, 3000 y 5000 células por pocillo muestran una mayor dispersión de valores de redondez, indicando una amplia variabilidad entre la población de esferoides, lo cual indica diferencias en el grado de compactación obtenido. Zaroni [262] demostró que estas diferencias en la forma y regularidad de los esferoides tienen relación directa con la distribución de las células metabólicamente activas, quiescentes y necróticas dentro del esferoide. Esferoides con formas irregulares han mostrado diferencias significativas en los valores de viabilidad cuando se compara con esferoides de forma más homogénea [262].

Las concentraciones de células estudiadas con mayor valor de redondez y menor dispersión fueron 1000, 2000 y 4000 células por pocillo, ésta última fue descartada para ser usada a nivel experimental ya que los esferoides obtenidos tienen un diámetro superior a  $400 \mu\text{m}$  desde el inicio del cultivo como se indica en la Tabla 5.1-2 y la Figura 5.1-5. Una densidad de siembra entre 1000 y 2000 células parece ser la más adecuada para el cultivo de los esferoides, de igual manera se puede observar que el mayor nivel

de regularidad se da entre las 96 y las 120 horas de cultivo, por lo cual se define un periodo de 4 a 5 días para obtener esferoides multicelulares aptos para ser expuestos a los diferentes compuestos.

Tabla 5.1-2 Valores de redondez obtenidos al analizar las fotografías de 20 esferoides en función de la cantidad de células sembradas por pocillo expresados como valores promedio y desviación estándar (SD).

Horas	500 células		1000 células		2000 células		3000 células		4000 células		5000 células	
	Media	SD	Media	SD	Media	SD	Media	SD	Media	SD	Media	SD
48	0.80	0.08	0.87	0.09	0.85	0.07	0.84	0.15	0.88	0.07	0.82	0.13
72	0.77	0.21	0.90	0.08	0.89	0.04	0.85	0.15	0.90	0.06	0.81	0.13
96	0.81	0.21	0.93	0.06	0.89	0.05	0.87	0.15	0.91	0.05	0.81	0.14
120	0.87	0.12	0.95	0.04	0.91	0.04	0.87	0.15	0.92	0.04	0.80	0.17
144	0.87	0.12	0.93	0.03	0.91	0.03	0.90	0.14	0.92	0.04	0.83	0.16

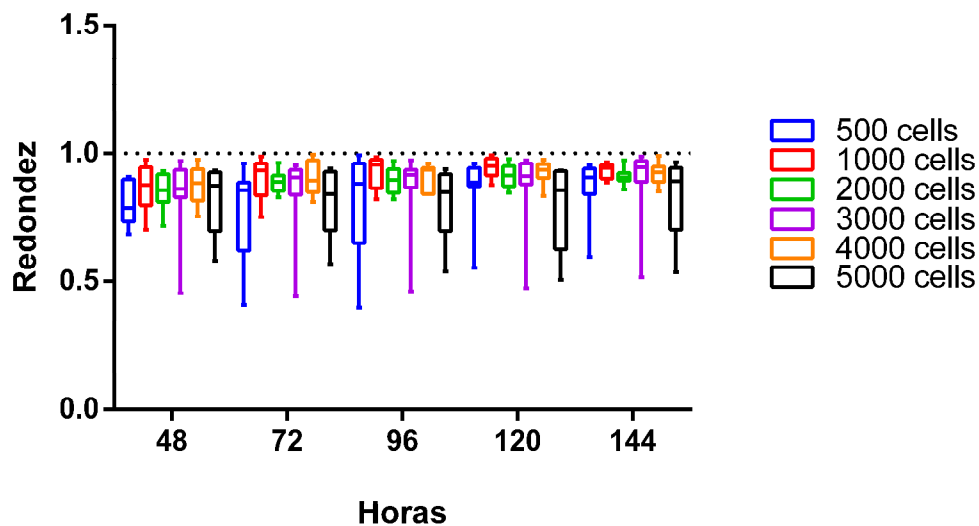


Figura 5.1-5 Evaluación de la evolución de la redondez de los esferoides en el tiempo a diferentes densidades de placa.

### 5.1.3. Análisis de componentes principales

Para estandarizar el método de cultivo de los esferoides de células A549, se hizo un análisis de más de 500 fotografías de esferoides a los cuales se les midieron propiedades como: área, diámetro, diámetro de Feret, circularidad, relación de aspecto y redondez, distribuidos en un diseño experimental de seis niveles de concentración y cinco tiempos de muestreo (48, 72, 96, 120 y 144 horas). Con el objetivo de extraer más información de este grupo de variables, se intentó realizar un análisis estadístico multivariado, en particular un análisis de componentes principales o PCA por sus siglas en inglés, en un intento de reducir la cantidad de variables y agruparlas en un nuevo set de componentes.

Luego de analizar los resultados de la prueba de componentes principales se confirmó a través de una prueba de factorabilidad (Medición Kaiser-Meyer-Olkin o KMO), la cual

permite identificar si el grupo de variables y sus varianzas analizadas cumple con los criterios estadísticos para ser agrupada a nivel factorial y establecer contribuciones significativas de dichas variables a los componentes y al ajuste general del modelo. Sin embargo, se encontró que el valor KMO para los análisis realizados es de 0.46, por lo cual las variables no se adaptan a un modelo factorial [263,264]. Dado lo anterior se descartó seguir con un análisis factorial de las variables.

#### 5.1.4. Análisis de clúster de variables por el método de vecino más cercano

A pesar de que no fue posible obtener resultados satisfactorios del análisis de componentes principales, al analizar los resultados se pudo encontrar que había cierto nivel de correlación entre los descriptores de forma, el tamaño de los esferoides obtenidos y el tiempo de cultivo, debido a esto se realizó un análisis de conglomerado o de clúster, de las variables, lo cual, a pesar de ser un método multivariado, es de tipo descriptivo por lo tanto más flexible en cuanto al análisis realizado.

El algoritmo de formación de conglomerados permite agrupar de forma jerárquica variables en un mismo grupo que sean muy similares entre sí (cohesión interna del grupo) y los clústeres diferentes sean distintos (aislamiento externo del grupo). En la Figura 5.1-6 se encuentra representado este análisis donde se analizó un único conglomerado conformado por 5 variables analizadas en cuatro etapas sucesivas.

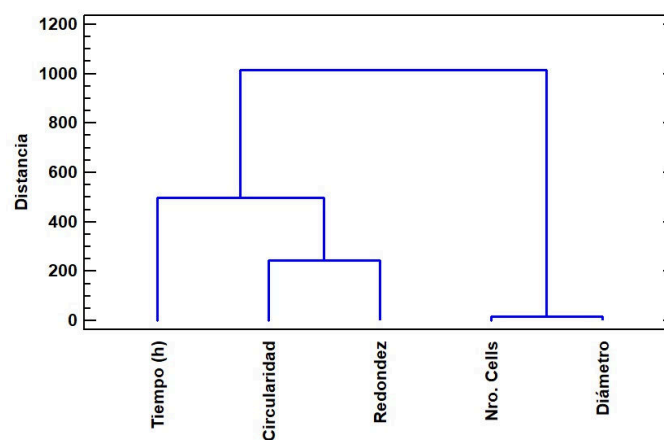


Figura 5.1-6 Dendrograma aglomeración de variables, por vecino más cercano.

Del dendrograma se puede inferir que hay dos grupos principales de variables, uno conformado por el número de células sembradas y el diámetro y en el segundo se encuentran agrupados el tiempo de cultivo y los descriptores de forma (homogeneidad geométrica del esferoide). De lo anterior se puede deducir que el tamaño final del esferoide de células A549 va a estar principalmente controlado por la cantidad de células que se siembren, mientras que la uniformidad geométrica va a depender principalmente del tiempo de incubación.

### 5.1.5. Parámetros finales seleccionados.

Después del análisis realizado y en vista de que el rango ideal para obtener esferoides del tamaño deseado ( $\approx 400 \mu\text{m}$ ) y con una geometría lo más esférica y regular posible, estaba entre 1000 y 2000 células por pocillo cultivadas por un periodo entre 96 y 120 horas, se realizó un nuevo experimento en el cual se sembraron 1500 células por pocillo y se dejaron crecer durante 5 días (120 horas). Para realizar las mediciones se usó un portaobjetos micrométrico, del cual se seleccionó y fotografió un círculo con un diámetro nominal de  $600 \mu\text{m}$  (representado en la Figura 5.1-4) al analizar el círculo se obtuvieron como valores de referencia 0.71 (circularidad), 1.00 (relación de aspecto) y 0.999 (redondez).

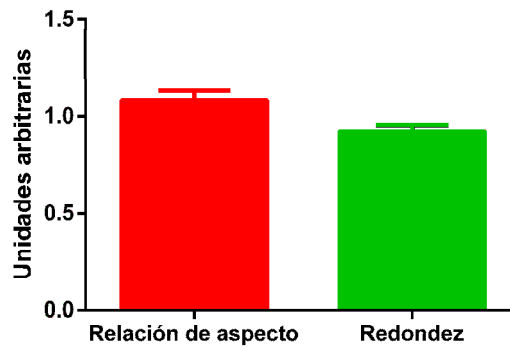


Figura 5.1-7 histograma de valores para los descriptores de forma relación de aspecto (RA) y redondez, obtenidos de analizar 20 esferoides con densidad de siembra de 1500 células cultivados por 5 días.

En la Figura 5.1-8, se presentan fotografías de los esferoides obtenidos bajo las condiciones previamente descritas, donde se puede ver que estos presentan un tamaño y forma homogéneos entre muestras. Además de un grado aceptable de compactación. En la Figura 5.1-7 se presenta un histograma de frecuencia para los valores de los descriptores de forma estudiados, en los cuales se puede ver que los valores de relación de aspecto (RA) y redondez, fueron  $1.1 \pm 0.045$  y  $0.92 \pm 0.038$ , respectivamente. Lo que indica una alta similitud con una esfera [265], ambos parámetros presentan una alta simetría con respecto a una distribución normal y también son leptocúrticas, cuya nube de datos se encuentra distribuida alrededor de la media, el resumen de estos datos estadísticos se encuentra en la Tabla 5.1-3.

Con respecto a la distribución de tamaño de los esferoides analizados, se encontró que el valor de la mediana después de 120 horas de cultivo es  $392.0 \pm 9.9 \mu\text{m}$ , también se halló que esta variable no tiene una distribución normal, sus valores se encuentran distribuidos cerca del valor de la media (leptocurtosis) con asimetría hacia el lado derecho (ver Tabla 5.1-3).

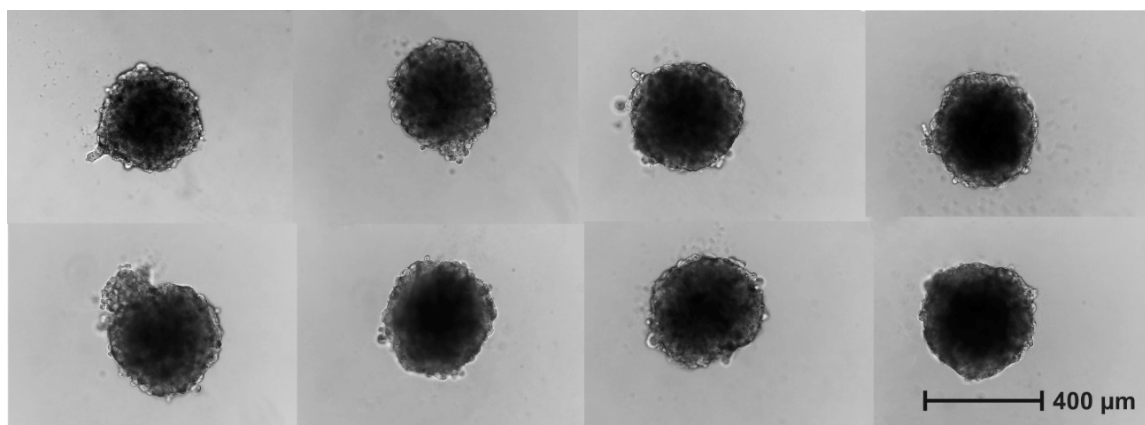


Figura 5.1-8 Esferoides de células A549 cultivados por el método de liquid-overlay a partir de 1500 células durante 5 días.

Tabla 5.1-3 Resumen de parámetros estadísticos calculados a partir de 20 esferoides

Parámetros estadísticos	Circularidad	Diámetro	Relación de aspecto	Redondez
n	20	20	20	20
Mínimo	0.19	382	1.0	0.85
Mediana	0.28	392	1.1	0.92
Máximo	0.36	415	1.2	0.98
Promedio	0.28	394	1.1	0.92
Desviación estándar	0.05	9.9	0.045	0.038
SEM	0.012	2.214	0.010	0.008
Coficiente de variación	19.6%	2.51%	4.09%	4.13%
Media geométrica	0.27	393	1.1	0.92
Asimetría	-0.28	1.5	0.87	-0.61
Curtosis	-0.52	3.0	2.1	1.8
<b>Prueba de normalidad (D'Agostino &amp; Pearson)</b>				
K2	0.10	7.055	3.2	2.131
Valor P	0.91	0.03	0.20	0.35
¿Distribución normal?	Si	No	Si	Si

#### 5.1.6. Resumen sección 5.1 Estandarización cultivo de esferoides multicelulares

En esta sección se resume la puesta a punto del sistema de cultivo 3D de esferoides multicelulares de una línea celular epitelial de pulmón (A549), durante la cual se evaluaron criterios de homogeneidad de tamaño y morfología de los esferoides, variando la cantidad de células sembradas y el tiempo de cultivo.

Se sembraron en placas de cultivo entre 500 y 5000 células por pocillo y se evaluó el crecimiento del esferoide multicelular durante seis días. Se adquirieron y analizaron fotografías cada 24 horas y se midió el diámetro y varios descriptores de forma como circularidad, relación de aspecto y redondez. Con los datos obtenidos, se hicieron



diferentes análisis estadísticos con el fin de seleccionar las mejores condiciones de cultivo (tiempo y cantidad de células sembradas). Se encontró que el método liquid-overlay es más eficiente para la formación de esferoides con este tipo de células, en comparación con el de la gota pendiente. Del análisis de clústeres se infiere que el diámetro del esferoide depende de la cantidad de células sembradas, mientras que los cambios morfológicos y formación del esferoide dependen del tiempo de cultivo. Esferoides cultivados a partir de 1500 células por pocillo, por un periodo de tiempo que oscila entre 96 y 120 horas es ideal para obtener esferoides de geometría uniforme (relación de aspecto y redondez con valores cercanos a la unidad) y diámetro alrededor de 400  $\mu\text{m}$ .

## 5.2. Complejos ternarios de cobre con sacarina y glutamina

### 5.2.1. Introducción

En la Figura 5.2-1 se presenta la estructura química de los complejos de cobre con sacarina (Cu-sac), con glutamina (Cu-gln) y el complejo heteroléptico de cobre, sacarina y glutamina (Cu-sac-gln), los cuales fueron sintetizados como ha sido descrito en la sección 4.1.1 [216,218] y fueron evaluados como posibles agentes antitumorales en este trabajo de tesis doctoral.

La sacarina es un edulcorante artificial sin valor energético desde el punto de vista alimentario descubierto en 1879, ampliamente utilizado como aditivo alimentario y excipiente en la industria farmacéutica [266]. Desde el punto de vista químico la sacarina (o-sulfobenzimida) representada en la Figura 5.2-2, se puede describir como una sulfonamida cíclica secundaria [267]. La sacarina ha demostrado poseer la capacidad de inhibir diferentes metaloenzimas dependientes de zinc de la familia de anhidrasas carbónica (AC) (EC 4.2.1.1), en especial la IX, la cual se encuentra asociada a la membrana celular. La selectividad de la sacarina por esta última es 1000 veces mayor en comparación con otras isoformas de AC y la inhibición de la misma se da a escala nanomolar [268]. La anhidrasa carbónica se ha convertido en un blanco terapéutico, dado que dicha enzima juega un papel importante en el metabolismo celular, ya que la sobreexpresión de esta proteína en regiones anaeróbicas tumorales actúa como mecanismo de defensa ante la hipoxia y la acidificación del entorno celular, producto de la glicolisis anaerobia [269].

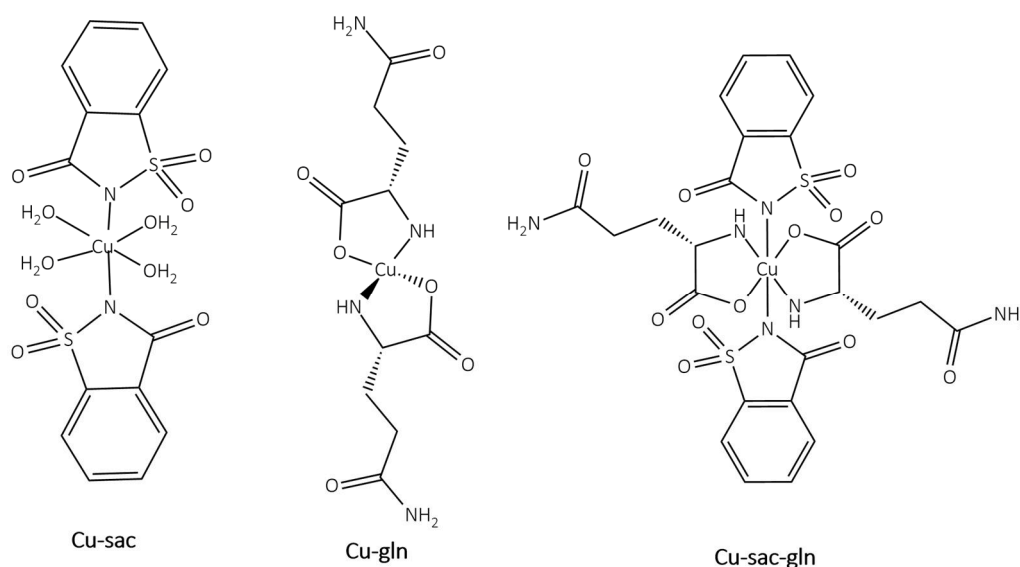


Figura 5.2-1 Estructura química de los complejos Cobre-sacarina (Cu-sac), Cobre-glutamina (Cu-gln) y Cobre-sacarina-glutamina (Cu-sac-gln).

La glutamina o ácido 2-amino-4-carbamoilbutanoico (ver Figura 5.2-2) es un aminoácido esencial condicional, con una cadena de cinco carbonos y dos grupos aminos, descrito por primera vez en 1877 [270]. La glutamina es el aminoácido libre presente en mayor proporción en el plasma y es abundante en el músculo esquelético, riñones, pulmones,



5.2.2. Efectos de los complejos de cobre (II), sacarina y glutamina en la viabilidad celular

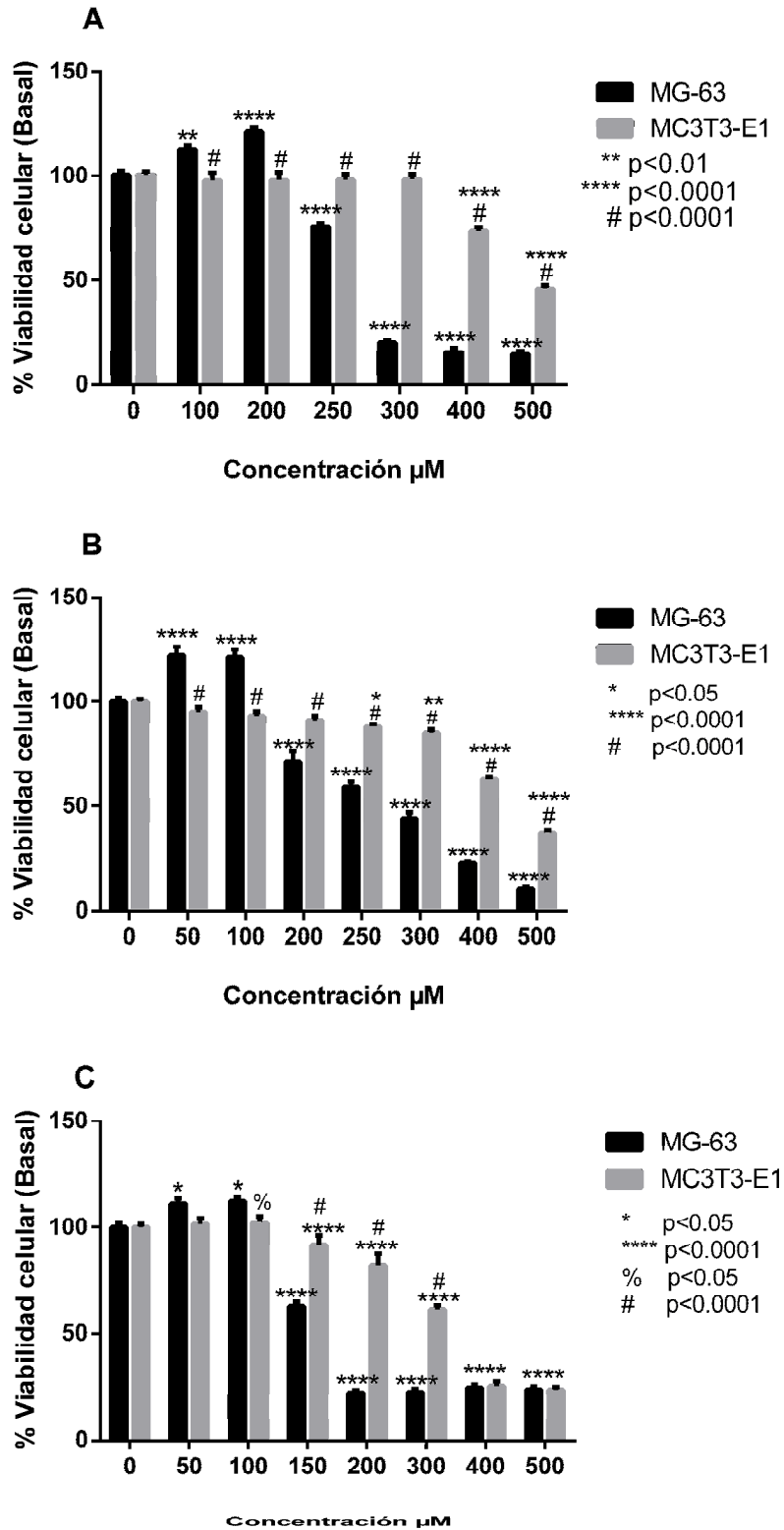


Figura 5.2-3 Viabilidad celular de complejos de cobre con sacarina y glutamina en células MG-63 a través del ensayo de cristal violeta (A) Cu-sac, (B) Cu-gln y (C) Cu-sac-gln. El símbolo asterisco representa una diferencia significativa con respecto al control (0 µM) \* p<0.05, \*\* p<0.01, \*\*\*\* p<0.0001. Los símbolos porcentaje (%) y numeral (#) representan una diferencia significativa entre las células de fenotipo tumoral y fenotipo normal con valores de p<0.05 y p<0.0001 respectivamente. Los datos se representan como la media ±SEM con n=9.

Las células MG-63 y MC3T3-E1 de fenotipo tumoral y normal respectivamente, fueron expuestas durante 24 horas a diferentes concentraciones de los complejos Cu-sac, Cu-gln y Cu-sac-gln, con el objetivo de evaluar el efecto sobre la viabilidad celular a través del método del cristal violeta (ver sección 4.7.2). Los resultados que se presentan en los paneles A, B y C de la Figura 5.2-3 permiten observar que cuando las células MG-63 son expuestas a concentraciones  $\leq 100 \mu\text{M}$  de los complejos no hay un efecto deletéreo sobre éstas y particularmente este rango de concentraciones induce un incremento significativo ( $p < 0.001$ ) en la viabilidad celular con respecto al control, mientras que en el rango superior de concentraciones se observa un compromiso de la viabilidad de las células MG-63 en el cual más del 70% de la población es afectada.

Al comparar los datos de viabilidad de la línea tumoral con la de fenotipo normal se puede establecer que los complejos binarios (Cu-sac y Cu-gln) son menos lesivos para este tipo de células, mientras que el complejo ternario (Cu-sac-gln) induce un nivel de muerte celular comparable al que sufren las células tumorales en el rango superior de concentraciones. Sin embargo, en la Tabla 5.2-1, se puede observar una diferencia significativa entre los valores del  $\text{IC}_{50}$ , lo que demuestra que los complejos presentan cierto nivel de selectividad entre ambas líneas celulares.

Para esta familia de complejos se puede observar una diferencia en la actividad citotóxica de sus miembros, pudiéndose establecer un orden de actividad  $\text{Cu-sac-gln} > \text{Cu-sac} \approx \text{Cu-gln}$ . Dicha diferencia en la actividad de estos complejos puede ser atribuida a las diferencias en la lipofilicidad de los ligandos.

Según el postulado de Overton sobre la permeabilidad celular, los compuestos más liposolubles tienen la capacidad de cruzar con más facilidad la membrana celular [278], y en el caso de los complejos de cobre relacionados en esta sección se puede aplicar la teoría de la quelación, bajo la cual se puede explicar que la polaridad del ion metálico es reducida parcialmente debido al solapamiento de los orbitales moleculares del ligando y la deslocalización de la carga positiva del metal con los átomos de coordinación, por resonancia de los electrones  $\pi$  presentes en los ligandos, lo que al final aumenta la lipofilicidad del complejo [279,280].

Desde el punto de vista fisicoquímico, al analizar el coeficiente de partición octanol/agua expresado como logaritmo ( $\text{Log } K_{o/w}$ ) de los ligandos se encontró que la sacarina tiene un valor de 0.91 y una solubilidad en agua de 3.44 mg/mL, mientras que la glutamina tiene  $\text{Log } K_{o/w} -3.15$  y una solubilidad en agua de 35.7 mg/mL [281]. Dado lo expuesto anteriormente es factible establecer una relación entre una mejora en la lipofilicidad del complejo heteroléptico, Cu-sac-gln, el cual incluye ambos ligandos y su mayor efecto citotóxico en las células expuestas a este. Dicha correlación entre lipofilicidad y citotoxicidad ha sido establecida y reportada en la literatura para varios complejos y ligandos [33,282].

*Tabla 5.2-1 Resumen de los valores de IC<sub>50</sub> (μM) de los compuestos de cobre, sacarina y glutamina, probados en varias líneas celulares durante 24 horas.*

Línea celular	Cu-sac	Cu-gln	Cu-sac-gln	CuCl <sub>2</sub>
MG-63	272.1 ± 5.4 <sup>a</sup>	278.6 ± 11.5 <sup>a</sup>	169.3 ± 18.5 <sup>a</sup>	> 300 <sup>a</sup>
MC3T3-E1	483.9 ± 20.1 <sup>a</sup>	457.1 ± 11.4 <sup>a</sup>	237.5 ± 14.1 <sup>a</sup>	>500 <sup>a</sup>
A549	>500 <sup>b</sup>	>500 <sup>b</sup>	>500 <sup>b</sup>	>500 <sup>b</sup>

a Valores de IC<sub>50</sub> obtenidos con el ensayo de cristal violeta.

b Valores de IC<sub>50</sub> obtenidos con el ensayo de MTT.

La viabilidad de células humanas A549 derivadas de carcinoma de pulmón no fue afectada por los complejos de sacarina y glutamina con cobre, cuando fueron expuestas a concentraciones de hasta 500 μM. Por lo que se decidió no profundizar en otros estudios con esta línea celular.

### 5.2.3. Inducción de estrés oxidativo en células MG-63 y su rol en la viabilidad celular

Todas las células para mantenerse viables deben conservar una condición de equilibrio entre la concentración de las especies oxidantes y antioxidantes en su interior, ambos tipos de sustancias son esenciales en el metabolismo, transducción de señales y regulación de funciones celulares. El estrés oxidativo se puede definir, básicamente, como un desbalance en la relación oxidantes-antioxidantes a favor del entorno oxidante [130].

La alteración de la homeostasis redox, a través de la generación de especies de oxígeno reactivas (ROS) en las células tumorales e inducción de estrés oxidativo, ha sido un blanco terapéutico ampliamente explorado en la química medicinal y ha demostrado ser un mecanismo de acción efectivo en el tratamiento de diversos tipos de cáncer [283].

La alta tasa reproductiva de las células tumorales y sus necesidades bioenergéticas ocasionan un incremento en la producción de ROS que no puede ser compensado por los sistemas antioxidantes, lo que desencadena un estado persistente de estrés oxidativo en este tipo de células [284]. Por lo que se ha planteado como estrategia terapéutica aumentar moderadamente los ROS en las células tumorales, lo que conducirá a la muerte celular [283].

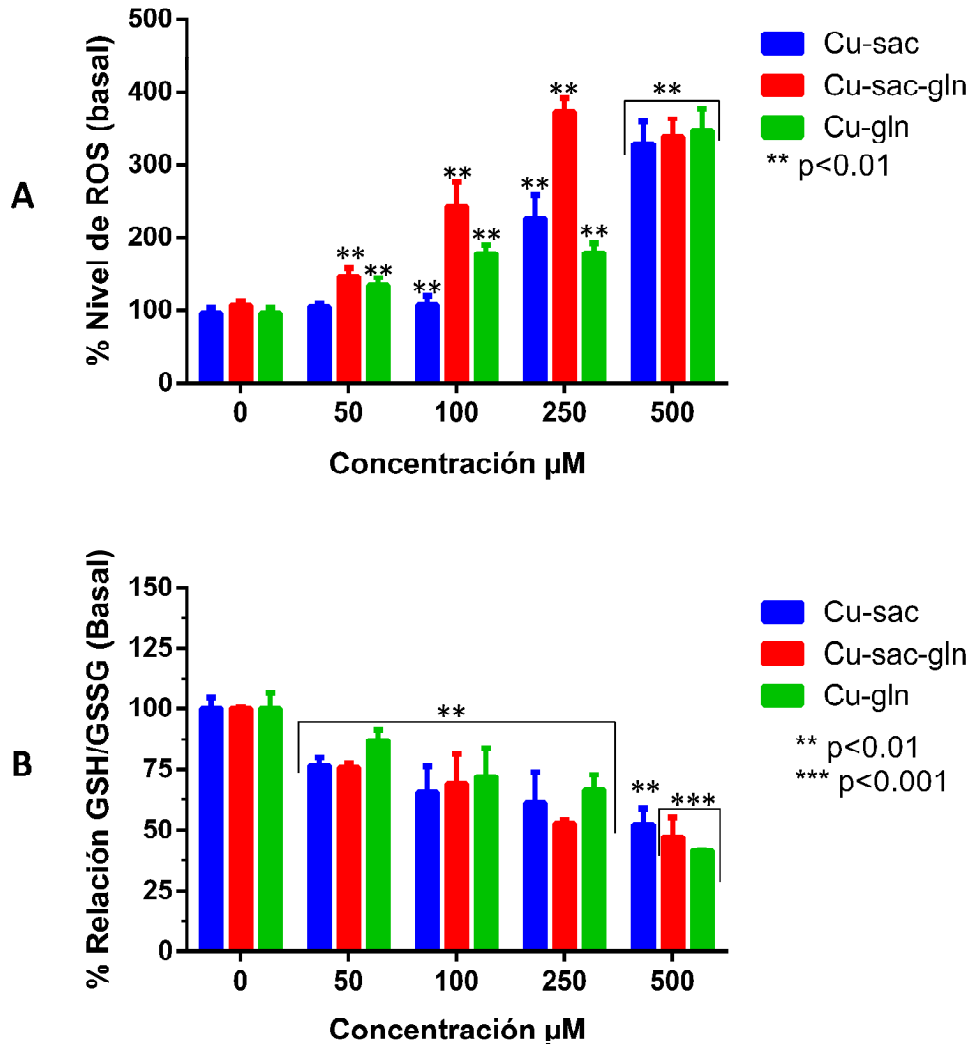


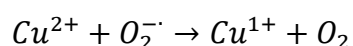
Figura 5.2-4 (A) Inducción de especies de reactivas de oxígeno por lo complejos de  $\text{Cu}^{+2}$  con sacarina y glutamina en células MG-63 tratadas durante 24 h, \*\*diferencia significativa con respecto al control (0  $\mu\text{M}$ ). Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SEM, con  $n = 9$ . (B) Alteración en la relación GSH/GSSG inducida por los complejos de sacarina y glutamina en células MG-63, Los asteriscos representan diferencia con respecto a las células control (0  $\mu\text{M}$ ) \*\*  $p < 0.01$  y \*\*\*  $p < 0.001$ . Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SEM, con un  $n = 10$ .

En la Figura 5.2-4(A) se presentan los resultados de la determinación de la presencia de especies de oxígeno reactivas al incubar las células de osteosarcoma humano, MG-63, durante 24 horas con los complejos de cobre: Cu-sac, Cu-gln y Cu-sac-gln. Como se puede observar los tres compuestos incrementaron significativamente ( $p < 0.01$ ) la cantidad de ROS con respecto al control correspondiente, alcanzando valores aproximados al 300 % con respecto al basal, siendo el más activo el complejo Cu-sac-gln, que presenta un efecto dosis dependiente ( $p < 0.05$ ). El complejo con glutamina también indujo un incremento en la cantidad de ROS en todo el rango experimental evaluado, mientras que el compuesto con sacarina solo lo hizo a partir de 100  $\mu\text{M}$ .

Por otro lado, en el panel B de la Figura 5.2-4 se presenta la relación del glutatión reducido y oxidado en el interior de las células después de ser expuestas durante 24 horas

a los complejos de cobre. Se puede observar que todos los complejos ocasionaron una reducción significativa de los valores obtenidos ( $p < 0.001$ ), alcanzando una reducción inferior al 50 % en la concentración máxima utilizada, estos resultados señalan que hay una reducción de la cantidad de GSH y una acumulación de GSSG al interior de la célula, esta alteración permite indicar que los complejos lograron inducir estrés oxidativo en las células MG-63 [285,286]

El mecanismo de acción de numerosos complejos de cobre reportados en la literatura señala que su actividad citotóxica se debe a la capacidad redox del cobre(II), que es reducido a cobre(I) en el interior de la célula, produciendo peróxido, de igual manera se da una re-oxidación del cobre a través de una reacción tipo Fenton, con la cual se producen otras especies de oxígeno reactivas como el radical hidroxilo (ver Ecuación 16 y Ecuación 17). Dado el aumento de la cantidad de ROS en el interior de la célula, ocurre un desgaste del pool de antioxidantes y la catálisis mediada por enzimas de tipo catalasa y peroxidasa, para eliminar las especies de oxígeno reactivas, también se encuentra sobrepasada. Finalmente, el balance redox se inclina hacia el lado de los oxidantes. Por otro lado, se propone también una interacción directa del complejo con el GSH, donde el glutatión ingresa a formar parte de la esfera de coordinación del complejo lo que de igual manera induce una disminución en la cantidad del tripéptido disponible para hacer frente al ataque oxidativo [287–289]



*Ecuación 16 Reacción de reducción de cobre al interior de la célula*



*Ecuación 17 Reacción tipo Fenton de re-oxidación del cobre.*

Para dilucidar si el incremento de los ROS intracelulares tiene relación con los efectos sobre la viabilidad de las células MG-63 expuestas a los complejos Cu-sac, Cu-gln y Cu-sac-gln, se adicionaron en simultáneo con los complejos dos conocidos scavengers de ROS, como lo son la vitamina C (ácido ascórbico) y la vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol) y las células se incubaron durante 24 horas. [290]. Al final del experimento se pudo observar (ver Figura 5.2-5) que, en general, para todos los complejos hay una recuperación significativa de la viabilidad celular ( $p < 0.05$ ). En la Tabla 5.2-2 se resumen los valores de  $\text{IC}_{50}$  obtenidos.

Se puede notar que los complejos que tienen como ligando la glutamina, Cu-gln y Cu-sac-gln, mostraron un aumento estadísticamente significativo ( $p < 0.001$ ) de la viabilidad, e incluso en el caso del complejo Cu-gln esta variable se mantuvo aproximadamente en un 25% por encima de los valores basales en todo el rango de concentración estudiados. En el caso del complejo ternario, dicho fenómeno sólo se observó en las concentraciones de 50 y 100  $\mu\text{M}$ . Se puede hipotetizar que este fenómeno se debe a la presencia de las vitaminas que entran a formar parte del pool antioxidante celular y que, adicionalmente, las células están siendo provistas de una cantidad adicional de glutamina la cual puede ser posiblemente utilizada como sustrato metabólico [291].



Tabla 5.2-2 Resumen de los valores de IC50 ( $\mu\text{M}$ ) obtenidos al exponer las células MG-63 a los complejos Cu-sac, Cu-gln, Cu-sac-gln y vitaminas C y E durante 24 horas y evaluar su viabilidad a través del ensayo de cristal violeta.

Línea celular	Cu-sac	Cu-gln	Cu-sac-gln
MG-63	>500	>500	412.1 $\pm$ 19.5

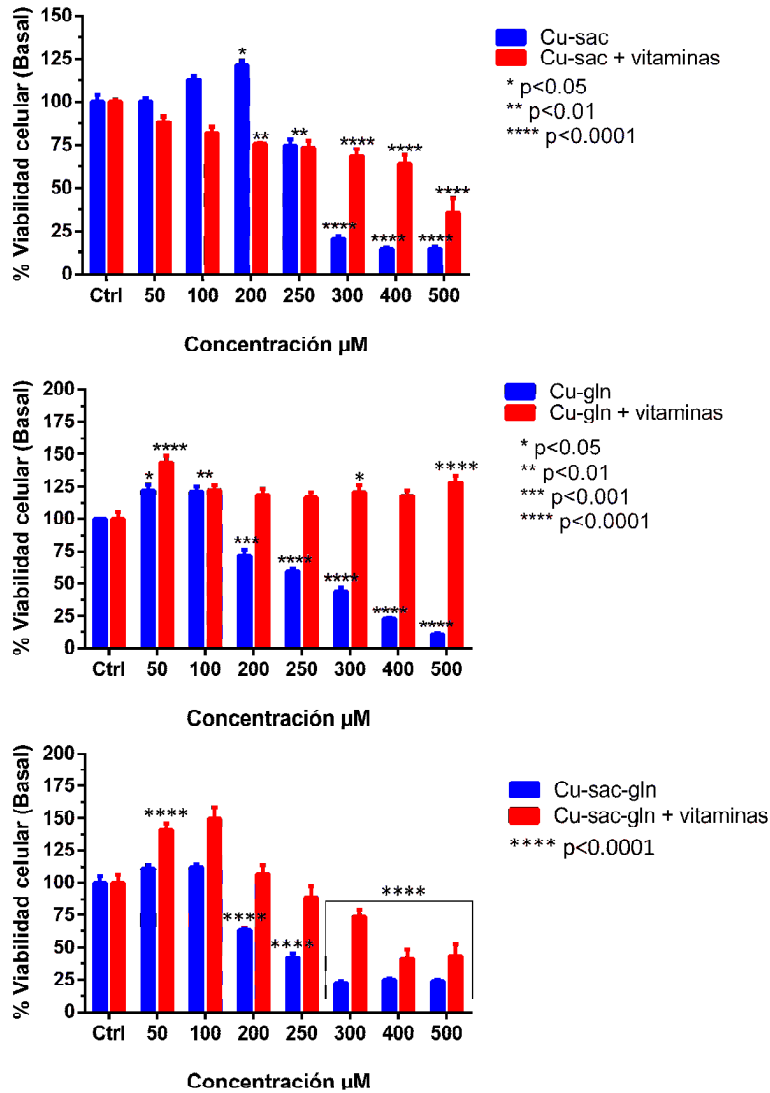


Figura 5.2-5 Efecto en la viabilidad celular de los complejos Cu-gln, Cu-sac y Cu-sac-gln y el co-tratamiento con vitaminas C y E en células MG-63. \* p<0.001 diferencia significativa con respecto a los controles (0  $\mu\text{M}$ ). Los gráficos se presentan como la media  $\pm$  SEM con un n=12.

#### 5.2.4. Efectos sobre el ADN celular de los complejos Cu-sac, Cu-gln y Cu-sac-gln

El daño en el ADN ha sido observado casi invariablemente en una gran cantidad de células de mamífero bajo estrés oxidativo, estos daños están estrictamente relacionados con la presencia de peróxido de hidrógeno y radical hidroxilo en el interior de la célula [129].

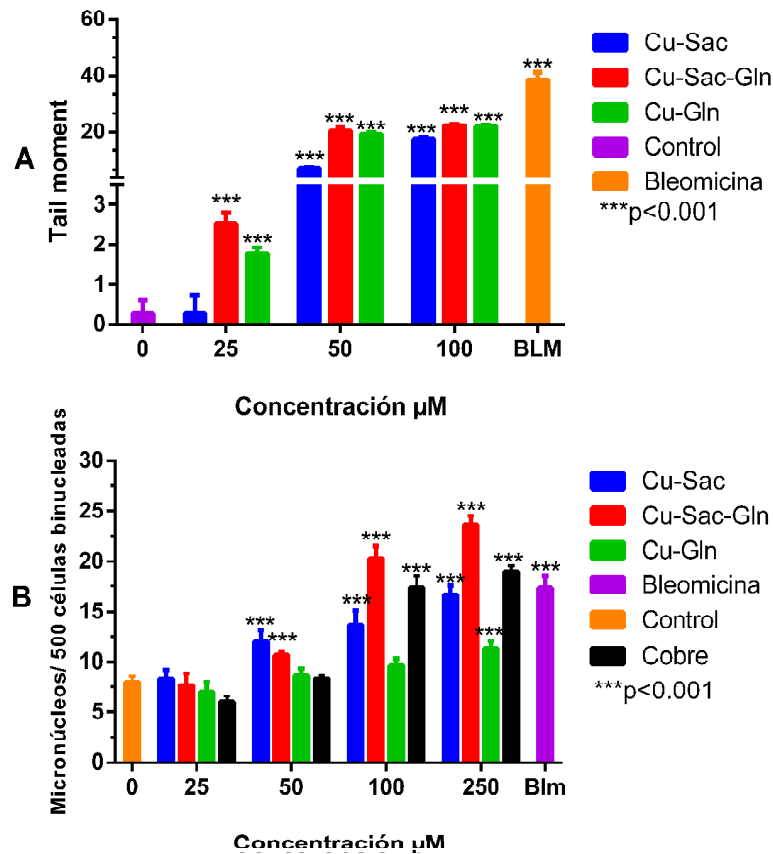


Figura 5.2-6 Efectos a nivel genotóxico de los complejos de cobre con sacarina y glutamina en células MG-63 tratadas durante 24 horas. (A) Ensayo cometa o electroforesis de una única célula, un pulso de 20 minutos con  $10 \mu\text{g/mL}$  de bleomicina se usó como control positivo. (B) Inducción de micronúcleos por cada 500 en células MG-63 binucleadas. \*\*\* diferencia significativa con respecto al control negativo (DMSO 0.5%). Los gráficos se presentan como la media  $\pm$  SEM con un  $n=150$ .

Como se puede ver en la Figura 5.2-6 panel A, se aplicó la técnica de cometa o electroforesis de una única célula en las células MG-63, con el fin de evaluar si los complejos tratados en esta sección tienen la capacidad de inducir cortes en las hebras de ADN. Las células fueron tratadas con bajas concentraciones de los complejos y a baja densidad de siembra con la finalidad de asegurar que las células se encuentren viables y en condiciones de proliferar.

Se encontró que los complejos indujeron quiebres en las hebras de ADN de manera dosis dependiente, siendo Cu-sac-gln y Cu-gln activos en todo el rango de concentración ( $p < 0.001$  al ser comparado con los controles negativos), mientras que Cu-sac sólo indujo quiebres desde  $50 \mu\text{M}$  y en menor proporción que sus análogos. Dichos resultados guardan correlación con la producción de ROS en el interior de la célula analizada en el apartado 5.2.3 (Figura 5.2-4), donde se muestra que el complejo ternario tiene la capacidad de inducir mayor cantidad de especies de oxígeno reactivas en el rango inferior de concentración, seguido por el complejo Cu-gln y finalmente el complejo Cu-sac, cuyo efecto no mostró diferencia significativa con los controles negativos en la menor concentración evaluada.

Es importante mencionar, que algunos complejos de cobre, como las casiopeinas®, las cuales son una familia de complejos de cobre ampliamente estudiadas, han demostrado

inducir la muerte celular a través de la apoptosis (dependiente o independiente de la activación de caspasas). Aunque estos complejos fueron sinterizados y caracterizados desde la década de 1980, su mecanismo de acción no ha sido completamente dilucidado. Sin embargo, a lo largo de los años se han propuesto posibles desencadenantes de la apoptosis como la producción de especies de oxígeno reactivas (ROS), toxicidad mitocondrial o interacción directa con el ADN [84,292,293]. De igual manera, otros complejos han demostrado inducir quiebres en las hebras del ADN relacionados con el incremento del estrés oxidativo [294,295]

Por otro lado, el ensayo de micronúcleo muestra que los complejos Cu-sac-gln y Cu-sac, incrementaron la frecuencia de micronúcleos desde 50  $\mu\text{M}$ , con respecto a las células no tratadas ( $p < 0.001$ ) con una tendencia de tipo concentración dependiente ( $p < 0.05$ ). Sin embargo, al comparar ambos complejos con el ion cobre libre, sólo se presenta una diferencia significativa entre el complejo ternario en las concentraciones de 50, 100 y 250  $\mu\text{M}$  ( $p < 0.05$ ), mientras que el complejo Cu-sac no muestra diferencias significativas en la inducción de micronúcleos al ser comparado con el cobre libre. Por su parte el complejo Cu-gln, solamente indujo la formación de micronúcleos a la concentración de 250  $\mu\text{M}$ , pero con una frecuencia significativamente menor ( $p < 0.05$ ) que los otros complejos y el cobre libre. También cabe destacar que el complejo ternario fue el único que mostró un efecto superior al mostrado por el control positivo de bleomicina, cuando las células fueron expuestas a concentraciones de 100 y 250  $\mu\text{M}$ .

El incremento de los quiebres en el ADN y la formación de micronúcleos tienen una correlación positiva entre ambas variables, donde el aumento de la cantidad de quiebres en el ADN, aumentará proporcionalmente la frecuencia de micronúcleos observada [296] y la presencia de este tipo de daños a nivel celular puede conducir a dos tipos de muerte celular ya sea la catástrofe mitótica o la apoptosis [297]

Al analizar ambas técnicas de genotoxicidad (cometa y micronúcleo), se puede ver que el complejo Cu-sac-gln es más activo en comparación con los binarios, lo cual se puede correlacionar con el hecho de que este complejo ha demostrado ser el más citotóxico de la familia y con mayor capacidad de inducir estrés oxidativo. Desde el punto de vista molecular la combinación de ambos ligandos en el complejo confiere posiblemente una mayor lipofilicidad por lo tanto facilita su ingreso al interior de la célula.

Dado que los complejos de Cu(II) generan daño genotóxico en bacterias y células de mamíferos [86,298], se puede atribuir el daño genético al incremento del estrés oxidativo ocasionado por los complejos descritos en esta sección. La generación de los daños a nivel genético pueden ser causados por una elevada producción de ROS o por interacción directa con el ADN [299,300] Estudios in vitro de la unión del ion sacarinato y su complejo de cobre (Cu-sac) con el ADN, demostraron que el sacarinato se une de manera no covalente en el surco menor, mientras que el complejo, Cu-sac, se intercala directamente en el ADN [301].

Aunque la glutamina no es considerada un intercalante del ADN, su presencia en el complejo ternario, Cu-sac-gln, reemplazando las cuatro moléculas de agua que se

encuentran en posición ecuatorial del complejo Cu-sac, y además agregando dos cadenas alifáticas de cinco carbonos a cada molécula del complejo, posiblemente incrementa la lipofilidad del complejo facilitando el ingreso de éste al interior de la célula [302]. Recientemente se ha demostrado que la capacidad para intercalarse e interactuar con el ADN se ve favorecida en complejos más hidrofóbicos [288,303].

#### **5.2.5. Resumen sección 5.2 Complejos ternarios de cobre con sacarina y glutamina**

Los complejos Cu-gln, Cu-sac y Cu-sac-gln, demostraron tener un efecto deletéreo en la viabilidad de células de osteosarcoma humano (MG-63), donde el complejo ternario fue el más activo en comparación con sus homólogos. Con base en los cálculos de IC50 obtenidos al evaluar la viabilidad en una línea de fenotipo normal, MC3T3-E1, se observó que hay diferencia a este nivel de efecto entre las líneas de tipo tumoral y normal. El mecanismo de acción propuesto para esta serie de complejos se relaciona con la capacidad de inducir la producción de especies de oxígeno reactivas y el consecuente desgaste de las defensas antioxidantes, ya que al agregar compuestos scavengers de ROS se logró disminuir el estrés oxidativo y recuperar la viabilidad de las células de forma significativa. Finalmente, a través de los ensayos de electroforesis de una única célula y formación de micronúcleos se demostró que el ADN fue uno de los blancos moleculares afectados cuando las células se expusieron a los complejos.

### 5.3. Complejos de 6-metoxiquinolona con cobre, zinc, cobalto y plata

#### 5.3.1. Introducción

En esta sección se presentan y discuten los resultados relacionados con los complejos de 6-metoxiquinolona (6MQ) con cobre (II), zinc (II), plata (I) y cobalto (II), nombrados de forma general de aquí en adelante como Cu6MQ, Zn6MQ, Ag6MQ y Co6MQ, respectivamente. Los complejos de  $\text{Cu}^{2+}$  y  $\text{Zn}^{2+}$  se pueden describir bajo la fórmula general  $\text{M}(\text{6MQ})_2\text{Cl}_2$ , mientras que los complejos de  $\text{Ag}^+$  y  $\text{Co}^{2+}$  son iónicos y presentan la fórmula química  $[\text{Ag}(\text{6MQ})_2]\text{NO}_3$  y  $\text{H}(\text{6MQ})[\text{Co}(\text{6MQ})\text{Cl}_3]$ , donde  $\text{H}(\text{6MQ})$  es el ligando en su forma protonada.

La síntesis química y la caracterización fisicoquímica de estos complejos ha sido reportada por Villa-Pérez y colaboradores [213] y será explicada brevemente en la sección 4.1.2 de este manuscrito. Las estructuras químicas de estos compuestos están representadas en la Figura 5.3-1.

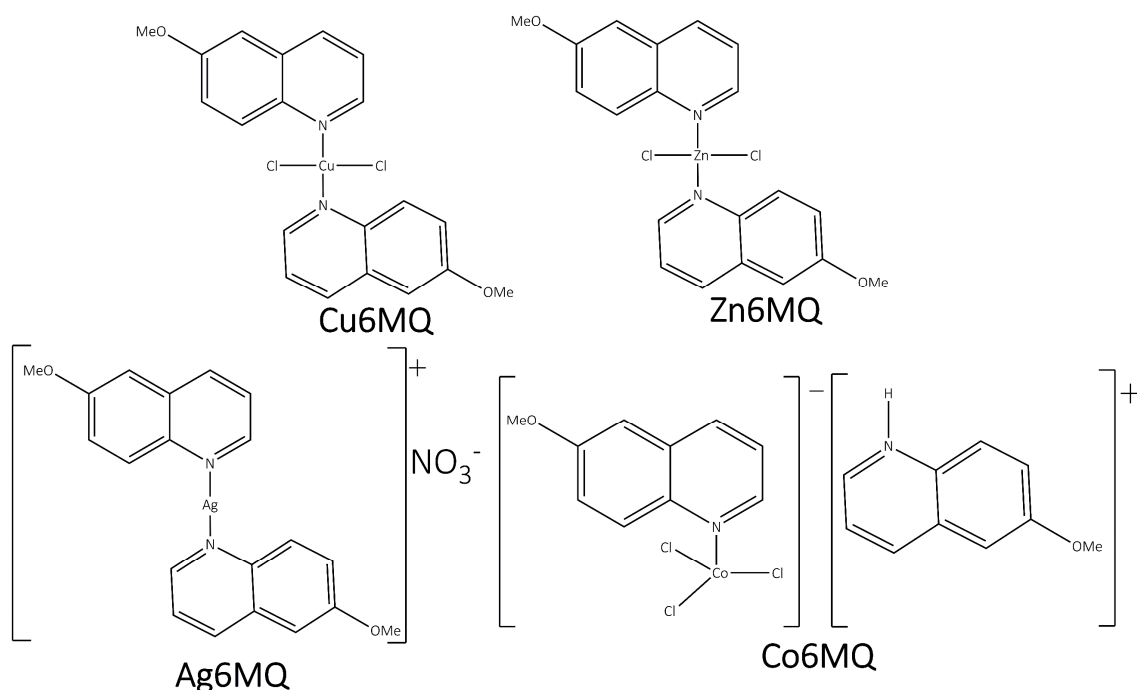


Figura 5.3-1 Estructura química complejos derivados de 6-metoxiquinolona.

El ligando 6MQ, cuya estructura está representada en la Figura 4.1-2 pertenece a la familia de las quinolinas, las cuales son heterociclos nitrogenados aromáticos de dos miembros, (ver sección 1.12.1), las cuales son susceptibles a ser funcionalizadas a través de diferentes reacciones de sustitución nucleofílica y electrofílica. Adicionalmente el núcleo quinolina se encuentra en diferentes metabolitos secundarios de plantas [153].

La 6-metoxiquinolona, es una quinolina sustituida en el carbono 6 con un grupo metoxilo, ha sido empleada como precursor de colorantes, pesticidas y herbicidas, entre otros [153]. También fue aprobada por parte de la organización mundial de la salud y la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura para ser empleado como aditivo alimentario en su informe técnico 974 [304]. Cabe destacar que

el núcleo 6-metoxiquinolina se encuentra presente en varios medicamentos empleados para el tratamiento de la malaria como la primaquina, la quinina y la bulaquina (Figura 5.3-2).

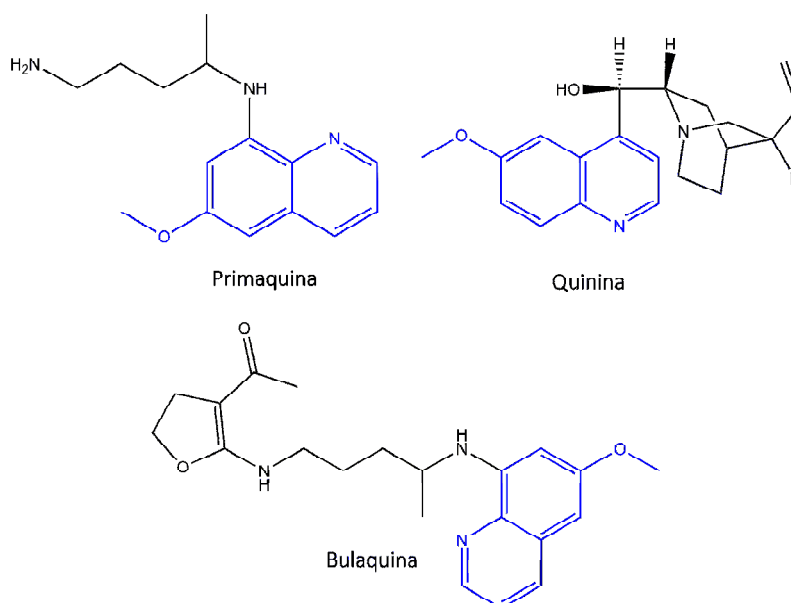


Figura 5.3-2 Estructura química de varios medicamentos antimaláricos que contienen el grupo 6-metoxiquinolina (selección azul).

Estudios de la actividad antibacteriana de los complejos de 6-metoxiquinolina con cobalto (II), níquel (II), cobre (II), zinc (II), plata (I) y mercurio (II) han sido previamente publicados por Villa-Pérez y colaboradores [213,305] quienes demostraron que el complejo de mercurio tuvo actividad bactericida en la cepa *E. coli* de una manera dosis dependiente. Mientras que los complejos de Co (II), Ni (II), Cu (II), Zn (II) y Ag (I) se probaron ante las cepas bacterianas *B. cereus*, *S. aureus*, *E. coli* y *S. typhimurium*, siendo su efecto en general dependiente de la concentración y destacando que el complejo más activo fue el complejo de cobalto, seguido en orden **descendente** por el de cobre, níquel, zinc y plata, donde estos dos últimos complejos tuvieron actividad comparable.

### 5.3.2. Estabilidad en solución de los complejos derivados de 6-metoxiquinolina

La estabilidad acuosa de soluciones  $1 \times 10^{-5}$  M fue determinada en buffer fosfato pH 7.4 para los cuatro complejos, midiendo su espectro electrónico en el rango de 200 a 400 nm durante 24 horas. Se analizó el área bajo la curva de cada espectro y se comparó con el área obtenida en el tiempo cero. Como se puede ver en la Figura 5.3-3, la estabilidad de los complejos se mantuvo por encima del 90% en las primeras 24 horas, no obstante, el complejo de cobalto presentó una mayor tendencia a degradarse seguido por el complejo de zinc, mientras que los complejos de cobre y plata mostraron similar estabilidad.

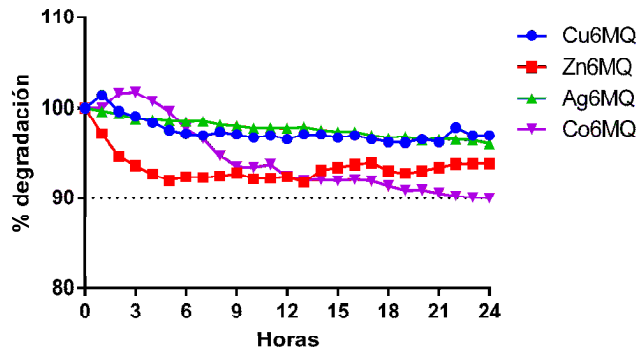


Figura 5.3-3 Estabilidad en solución acuosa de los complejos de 6MQ evaluada durante 24 horas.

### 5.3.3. Alteraciones en la proliferación y en la viabilidad celular inducidas por los complejos de 6-metoxiquinolina

El efecto citotóxico de los cuatro complejos de 6-metoxiquinolina (6MQ) fue evaluado en las células de tipo tumoral MG-63 y A549 y los resultados de las curvas de viabilidad celular determinadas a través de la técnica del MTT, se encuentran representadas en la Figura 5.3-4 y la Figura 5.3-5 respectivamente. Para ambas líneas celulares el ranking de actividad antitumoral observado fue  $\text{Ag6MQ} > \text{Cu6MQ} > \text{Zn6MQ}$ , mientras que el complejo de cobalto fue el menos activo de la familia e indujo una leve alteración en la viabilidad de las células A549 en el rango superior de concentraciones estudiadas (76% células viables).

En el caso de los metales empleados se pudo observar que el nitrato de plata indujo una alteración apreciable en la viabilidad celular equivalente a la observada por el complejo en ambas líneas celulares. El cloruro de cobalto indujo una leve reducción de la viabilidad celular en ambas líneas celulares

Los complejos de Cu(II) y Zn(II) provocaron una disminución de la viabilidad celular que se diferencia claramente de la inducida por los iones metálicos libres o por el ligando 6MQ. El complejo de plata(I) se encontró que al ser comparado con el nitrato de plata no había diferencia en el efecto citotóxico. En la Tabla 5.3-1 se resumen los valores de  $\text{IC}_{50}$  obtenidos para los complejos, el ligando y los metales estudiados en este apartado.

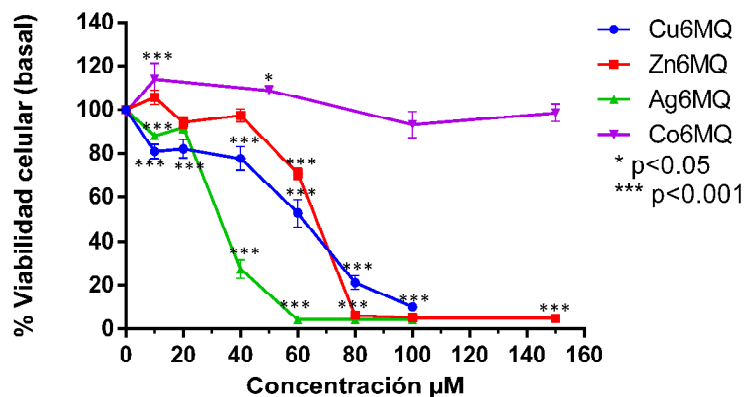


Figura 5.3-4 Efectos sobre la viabilidad celular de los complejos de 6-metoxiquinolina evaluado en células MG-63 durante 24 horas. Los asteriscos representan una diferencia estadísticamente significativa con respecto a las células control ( $0 \mu\text{M}$ ). \*  $p < 0.05$  y \*\*\*  $p < 0.001$ . Los datos se representan como la media  $\pm$  SEM con un  $n = 9$ .

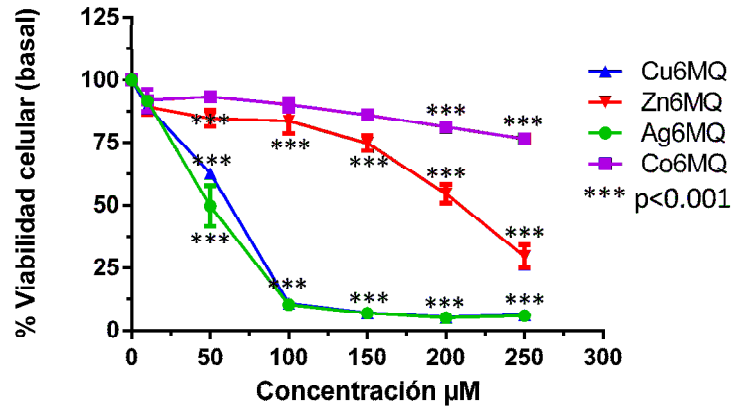


Figura 5.3-5 Efectos sobre la viabilidad celular de los complejos de 6-metoxiquinolina evaluado en células A549 durante 24 horas de incubación. Los asteriscos (\*\*\*) representan una diferencia significativa con respecto a controles (0 µM). Los datos se representan como la media ± SEM con un n=9.

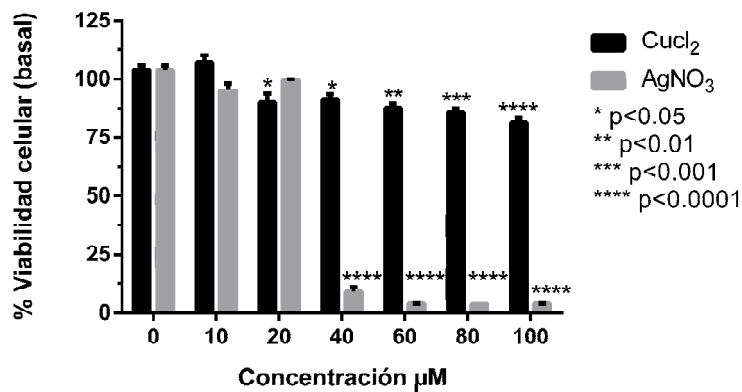
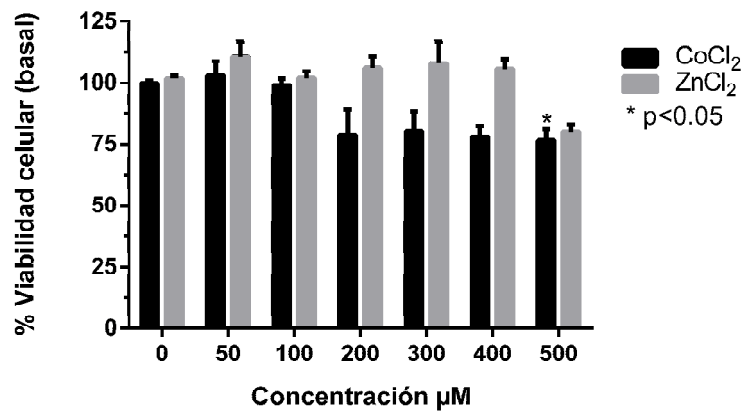


Figura 5.3-6 Evaluación del efecto citotóxico en la línea MG-63 de las sales metálicas empleadas para la síntesis de los complejos Co6MQ, Zn6MQ, Cu6MQ y Ag6MQ. Los asteriscos representan una diferencia significativa con respecto a los controles (0 µM) para cada uno de los compuestos. se representan los valores de la media ± SEM con un n=9.



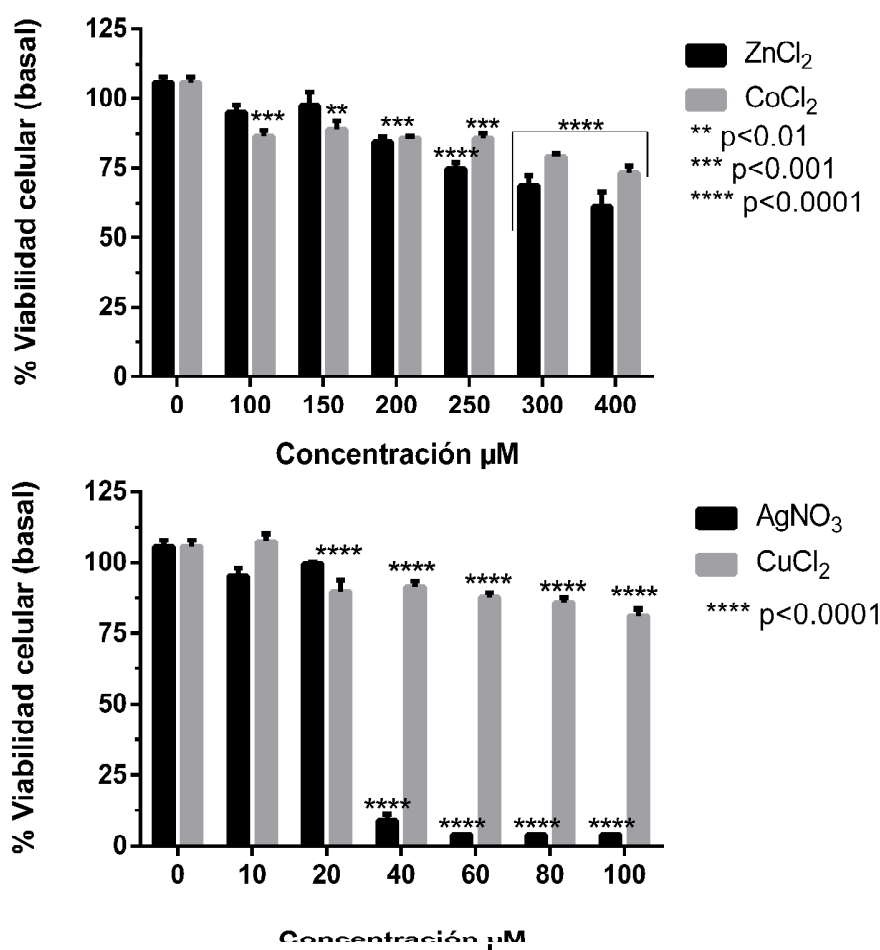


Figura 5.3-7 Evaluación del efecto citotóxico en la línea **A549** de las sales metálicas empleadas para la síntesis de los complejos **Co6MQ**, **Zn6MQ**, **Cu6MQ** y **Ag6MQ**. Los asteriscos representan una diferencia significativa con respecto a los controles (0  $\mu\text{M}$ ) para cada uno de los compuestos. Se representan los valores de la media  $\pm$  SEM con un  $n=9$ .

Tabla 5.3-1 Resumen de los valores de  $IC_{50}$  para los complejos de 6-metoxiquinolina, ligando y sal metálica (expresado en  $\mu\text{M} \pm$  desviación estándar).

	Co6MQ	CoCl <sub>2</sub>	Ag6MQ	AgNO <sub>3</sub>	Cu6MQ	CuCl <sub>2</sub>	Zn6MQ	ZnCl <sub>2</sub>	6MQ
<b>MG-63</b>	>150	>250	32.5 $\pm$ 2.7	31.9 $\pm$ 5.7	57.2 $\pm$ 1.0	>150	64.5 $\pm$ 1.00	>150	>200
<b>A549</b>	>250	>250	26.1 $\pm$ 2.7	22.5 $\pm$ 10.1	57.9 $\pm$ 5.8	>100	202.3 $\pm$ 12.2	>400	>300

En ambas líneas celulares se observó que el complejo derivado de cobalto (**Co6MQ**) no indujo un efecto nocivo en las células. Lo cual posiblemente puede ser explicado por la marcada diferencia estructural con respecto a los otros complejos de la familia, ya que **Co6MQ** está conformado por una molécula de 6MQ y tres átomos de cloro en la esfera de coordinación, mientras que **Cu6MQ**, **Zn6MQ** y **Ag6MQ** poseen dos moléculas de 6-metoxiquinolina en la esfera de coordinación. La presencia de la molécula adicional del ligando en estos últimos los hace más lipofílicos lo que puede facilitar su paso a través de la membrana celular [294]. Por otro lado, en la mayoría de los complejos de cobalto reportados como antitumorales, el metal presenta un estado de oxidación III y su mecanismo de acción se fundamenta en la reducción de  $\text{Co}^{+3}$  a  $\text{Co}^{+2}$  y la producción intracelular de ROS como señal desencadenante de la apoptosis, y puesto que en el caso

del complejo Co6MQ el metal presenta un estado de oxidación II, no es factible que se dé la iniciación del mecanismo enunciado [306].

Los complejos derivados de cobre (Cu6MQ) y zinc (Zn6MQ) fueron activos en las líneas celulares MG-63 y A549. Dado que estos complejos demostraron un efecto diferencial en la viabilidad celular al ser comparados con el ligando y los metales, se procedió a estudiar en mayor profundidad el mecanismo de acción por el cual inducen la muerte celular.

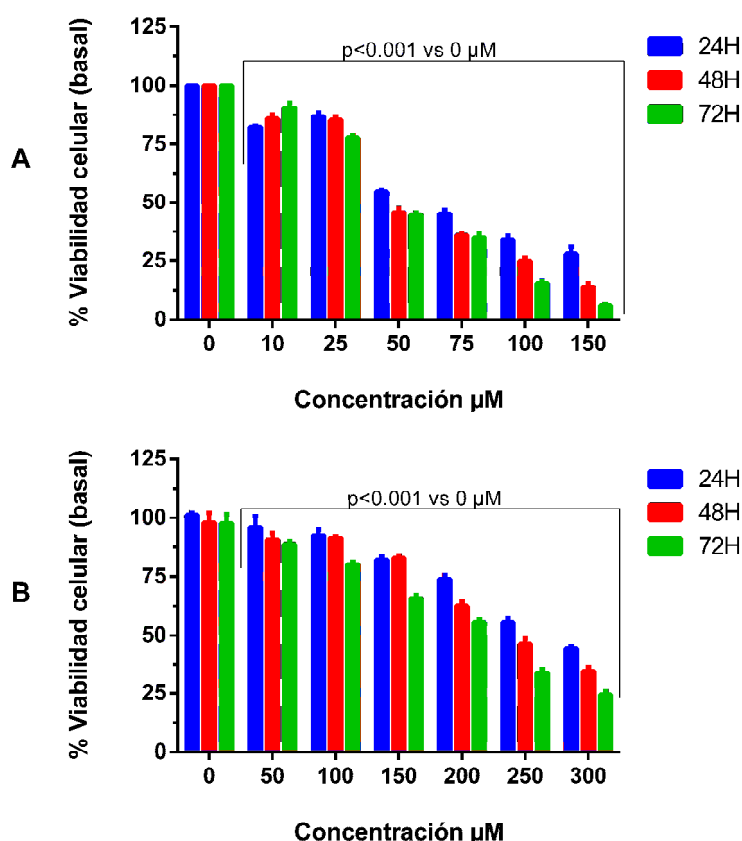


Figura 5.3-8 Viabilidad de células A549 al ser expuestas a los complejos (A) Cu6MQ y (B) Zn6MQ, durante 24, 48 y 72 horas. Las barras de datos agrupadas se compararon cada una con su respectivo control (0 µM) usando la prueba de Tukey. Los datos corresponden a la media ± SEM con n=9.

Tabla 5.3-2 Resultados prueba de Tukey al comparar la media de la viabilidad en células A549 expuestas a al complejo Cu6MQ durante diferentes periodos de tiempo.

Concentración	Comparación	n	Valor P	Significancia
10 µM	24H vs. 48H	9	0.176	ns
	24H vs. 72H	9	0.0003	***
	48H vs. 72H	9	0.0696	ns
25 µM	24H vs. 48H	9	0.7581	ns
	24H vs. 72H	9	< 0.0001	****
	48H vs. 72H	9	0.0008	***
50 µM	24H vs. 48H	9	< 0.0001	****
	24H vs. 72H	9	< 0.0001	****
	48H vs. 72H	9	0.8458	ns

<b>75 <math>\mu</math>M</b>	24H vs. 48H	9	< 0.0001	****
	24H vs. 72H	9	< 0.0001	****
	48H vs. 72H	9	0.9072	ns
<b>100 <math>\mu</math>M</b>	24H vs. 48H	9	< 0.0001	****
	24H vs. 72H	9	< 0.0001	****
	48H vs. 72H	9	< 0.0001	****
<b>150 <math>\mu</math>M</b>	24H vs. 48H	9	< 0.0001	****
	24H vs. 72H	9	< 0.0001	****
	48H vs. 72H	9	0.0005	***

Tabla 5.3-3 Resultados prueba de Tukey al comparar la media de la viabilidad en células A549 expuestas a al complejo Zn6MQ durante diferentes periodos de tiempo.

Concentración	Comparación	n	Valor P	Significancia
<b>50 <math>\mu</math>M</b>	24H vs. 48H	9	0.0953	ns
	24H vs. 72H	9	0.0157	*
	48H vs. 72H	9	0.7214	ns
<b>100 <math>\mu</math>M</b>	24H vs. 48H	9	0.8898	ns
	24H vs. 72H	9	< 0.0001	****
	48H vs. 72H	9	0.0002	***
<b>150 <math>\mu</math>M</b>	24H vs. 48H	9	0.9503	ns
	24H vs. 72H	9	< 0.0001	****
	48H vs. 72H	9	< 0.0001	****
<b>200 <math>\mu</math>M</b>	24H vs. 48H	9	0.0002	***
	24H vs. 72H	9	< 0.0001	****
	48H vs. 72H	9	0.0199	*
<b>250 <math>\mu</math>M</b>	24H vs. 48H	9	0.0027	**
	24H vs. 72H	9	< 0.0001	****
	48H vs. 72H	9	< 0.0001	****
<b>300 <math>\mu</math>M</b>	24H vs. 48H	9	0.0017	**
	24H vs. 72H	9	< 0.0001	****
	48H vs. 72H	9	0.0005	***

La viabilidad celular en la línea A549 también fue evaluada tras el tratamiento con los complejos Cu6MQ y Zn6MQ durante 24, 48 y 72 horas, como se puede ver en la Figura 5.3-8. Se demostró que ambos complejos son citotóxicos para las células en función del tiempo, puesto que se encontraron diferencias significativas entre el porcentaje de células vivas a la misma concentración de complejo principalmente al comparar los resultados obtenidos a las 24 y a las 72 horas, de igual manera se pudo observar que el complejo Cu6MQ presentó efectos citotóxicos más marcados que el complejo de zinc.

Con fines comparativos, las células A549 también fueron tratadas con cisplatino, éste metalofármaco es un compuesto ampliamente usado en el tratamiento de diferentes tipos de cáncer. Los tratamientos con este complejo de Pt(II) se llevaron a cabo durante 24, 48 y 72 horas (las curvas de viabilidad celular se presentan en la Figura 5.3-9), al igual

que los complejos Cu6MQ y Zn6MQ el cisplatino tiene un efecto dependiente del tiempo, causando mayor muerte celular a las 72 horas de tratamiento. Cabe destacar que el complejo de cobre (IC<sub>50</sub>: 57.9 ± 5.8 μM) y el de zinc (IC<sub>50</sub>: 202.3 ± 12.2 μM) reducen en mayor proporción la viabilidad de las células A549 tras 24 horas de exposición al ser comparado con el cisplatino (IC<sub>50</sub>: 266.0 ± 40.1 μM) en el mismo periodo de tiempo. Sin embargo, a periodos de incubación más prolongados el cisplatino presenta valores de IC<sub>50</sub> inferiores a los obtenidos para los complejos con 6MQ.

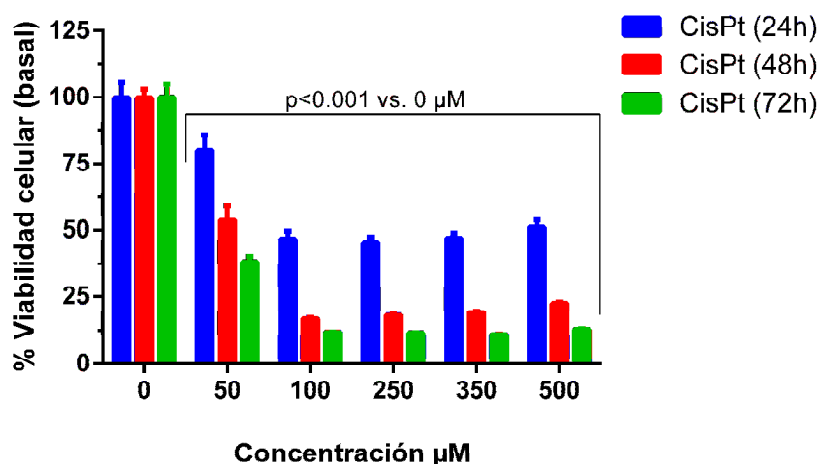


Figura 5.3-9 Efecto del cisplatino (CisPt) sobre la viabilidad de células A549, tratadas a diferentes periodos de tiempo.

Tabla 5.3-4 Resultados de la prueba de Tukey al comparar la media de la viabilidad en células A549 expuestas a al cisplatino durante diferentes periodos de tiempo.

Concentración	Comparación	n	Valor P	Significancia
0 μM	24H vs. 48H	9	> 0.9999	ns
	24H vs. 72H	9	> 0.9999	ns
	48H Vs.72H	9	> 0.9999	ns
50 μM	24H vs. 48H	9	< 0.0001	****
	24H vs. 72H	9	< 0.0001	****
	48H Vs.72H	9	0.0014	**
100 μM	24H vs. 48H	9	< 0.0001	****
	24H vs. 72H	9	< 0.0001	****
	48H Vs.72H	9	0.4801	ns
250 μM	24H vs. 48H	9	< 0.0001	****
	24H vs. 72H	9	< 0.0001	****
	48H Vs.72H	9	0.2805	ns
350 μM	24H vs. 48H	9	< 0.0001	****
	24H vs. 72H	9	< 0.0001	****
	48H Vs.72H	9	0.1314	ns
500 μM	24H vs. 48H	9	< 0.0001	****
	24H vs. 72H	9	< 0.0001	****
	48H Vs.72H	9	0.0655	ns

Una de las propiedades necesarias para que un medicamento pueda ser utilizado en el tratamiento del cáncer es la selectividad, es decir, ser capaces de presentar efectos citotóxicos diferenciales entre las células normales y las tumorales. En este trabajo se empleó para tal fin, la línea fibroblástica de fenotipo normal MRC-5. En la Figura 5.3-10 se presentan las curvas de viabilidad celular, en las cuales se compara el efecto de los complejos en ambas líneas celulares. Zn6MQ no mostró un efecto diferencial estadísticamente significativo entre ambas líneas celulares ( $IC_{50}$  MRC-5 213.6  $\mu$ M). Por el contrario, el complejo de cobre mostró ser más lesivo sobre las células tumorales y al calcular el índice de selectividad empleando la Ecuación 18 se obtiene un valor de 1.8. lo cual indica que se requiere casi el doble de la concentración de Cu6MQ para inhibir el 50% de las células normales en comparación con la concentración necesaria para la línea tumoral.

$$\text{Índice de selectividad} = \frac{IC_{50}(\text{MRC} - 5)}{IC_{50}(\text{A549})}$$

Ecuación 18 Cálculo de índice de selectividad.

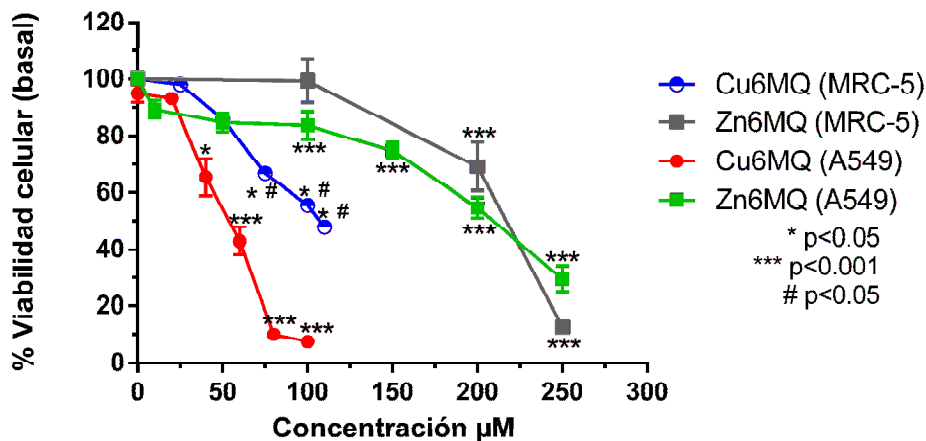


Figura 5.3-10 Comparación del efecto de los complejos Cu6MQ y Zn6MQ en células de fenotipo tumoral (A549) y fibroblastos de fenotipo normal (MRC-5), después de 24 horas de tratamiento. Los asteriscos representan diferencia significativa con respecto a los controles (0  $\mu$ M) \*  $p < 0.05$ , \*\*\*  $p < 0.001$ . El símbolo numera (#) representa una diferencia significativa en la viabilidad celular a la misma concentración de complejo (Cu6MQ y Zn6MQ) entre las líneas celulares MRC-5 y A549 ( $p < 0.05$ ). Los resultados se presentan como la media  $\pm$  SEM con un  $n=9$ .

#### 5.3.4. Alteraciones en la morfología celular en presencia de Cu6MQ y Zn6MQ

En la Figura 5.3-11, se pueden observar los cambios inducidos por los complejos derivados de 6-metoxiquinolina en la morfología de las células A549 teñidas con Giemsa. En el panel superior de la figura se presentan fotografías de las células tratadas con concentraciones ascendentes de Cu6MQ y se pudo observar que a concentraciones inferiores a 50  $\mu$ M no hay una alteración notable en la morfología de las células, mientras que a concentraciones superiores se observa que hay un encogimiento citoplasmático y una reducción de la cantidad de células por campo con un comportamiento dosis

dependiente. Previamente, se reportó que la reducción del volumen celular está vinculada con la activación de procesos apoptóticos y disminución de la viabilidad celular [307].

En el caso del complejo Zn6MQ, las alteraciones a nivel morfológico solo se pudieron observar a partir de 250  $\mu$ M, donde se encontró una reducción del número de células por campo, reducción en el volumen celular y contracción nuclear. A 350  $\mu$ M se acentuó el efecto con una reducción significativa de la población celular y del volumen celular.

Los cambios morfológicos presentados por las células A549 al ser expuestas a los complejos Cu6MQ y Zn6MQ muestran estrecha correlación con los resultados obtenidos en los ensayos de viabilidad celular (Figura 5.3-5).

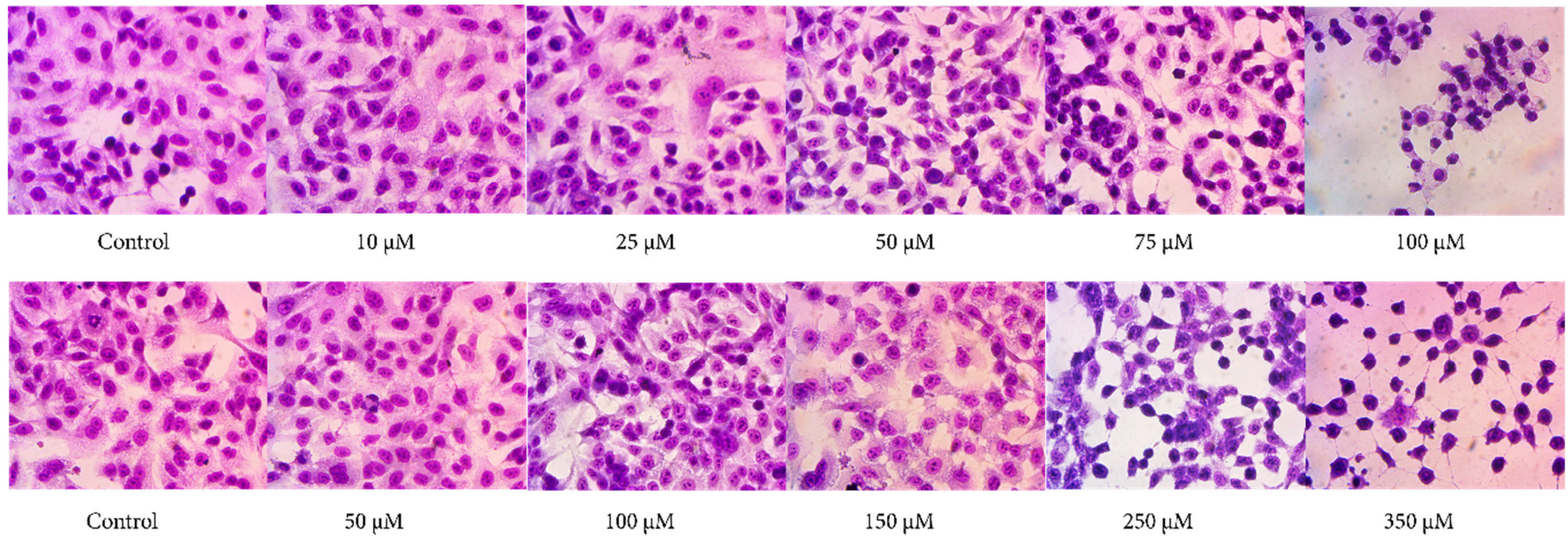


Figura 5.3-11 Evaluación de los cambios morfológicos en células A549 al ser tratadas con Cu6MQ (panel superior) y Zn6MQ (panel inferior) durante 24 horas (microscopía en campo claro, objetivo 10X, tinción con Giemsa).



Con el fin de determinar si los efectos citotóxicos causados por los complejos Cu6MQ y Zn6MQ en las células A549 desencadenan alteraciones en el crecimiento y división celular se llevó a cabo el ensayo clonogénico. Como se puede ver en la Figura 5.3-12, las células tratadas con el complejo de zinc conservaron la capacidad reproductiva en casi todo el rango de concentraciones estudiadas; la proliferación celular sólo se vio afectada a partir de 250  $\mu\text{M}$ .

El complejo Cu6MQ mostró un efecto bifásico sobre la proliferación celular en el cual las células tratadas con bajas concentraciones del complejo mostraron su capacidad reproductiva aumentada con respecto a los controles, pero a partir de 60  $\mu\text{M}$  se observó un descenso dependiente de la concentración en la fracción de células aptas para reproducirse y formar colonias. Previamente se ha demostrado que algunos compuestos de cobre a bajas concentraciones actúan como promotores del crecimiento y la proliferación celular, sin embargo, a concentraciones superiores inducen efectos antiproliferativos [308–310].

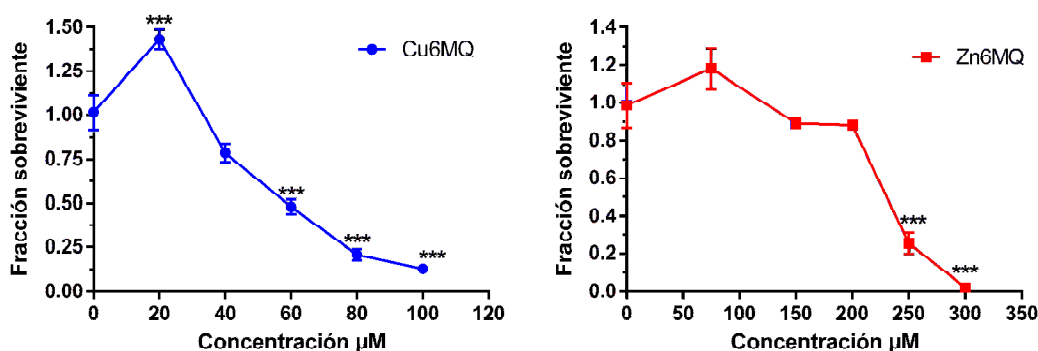


Figura 5.3-12 Resultados del ensayo clonogénico células A549 tratadas durante 24 horas con los complejos Cu6MQ y Zn6MQ. Los símbolos asterisco (\*\*\*) representan una diferencia significativa con respecto a los controles (0  $\mu\text{M}$ )  $p < 0.001$ . los datos se representan como la media  $\pm$  SEM con  $n = 9$ .

### 5.3.5. Determinación de las especies de oxígeno reactivas y su efecto en la viabilidad de las células A549

Tal como se ha expuesto en secciones previas, una de las principales vías mediante la cual los compuestos que involucran metales de transición afectan la viabilidad de las células tumorales es a través de la generación de especies de oxígeno reactivas (ROS). Con el objetivo de evaluar si los compuestos Cu6MQ y Zn6MQ producen dichas sustancias a nivel intracelular en las células A549, éstas se incubaron durante 24 horas con diferentes concentraciones de los complejos y se emplearon las sondas fluorimétrica DHE y H<sub>2</sub>DCFDA para detectar la presencia principalmente de superóxido y peróxido respectivamente, usando citometría de flujo.

En la Figura 5.3-13 se presentan los resultados de dichos experimentos. En el caso de la detección del anión radical superóxido (panel A), los complejos no mostraron inducir una



cantidad significativa de esta especie en las células A549 en el periodo evaluado. Por el contrario, en la determinación de peróxido (panel B) se observó que el complejo de cobre a una concentración de 40  $\mu\text{M}$  incrementó más de 10 veces la cantidad basal de esta especie a nivel intracelular, mientras que el complejo de zinc la duplicó a las concentraciones de 200 y 250  $\mu\text{M}$ .

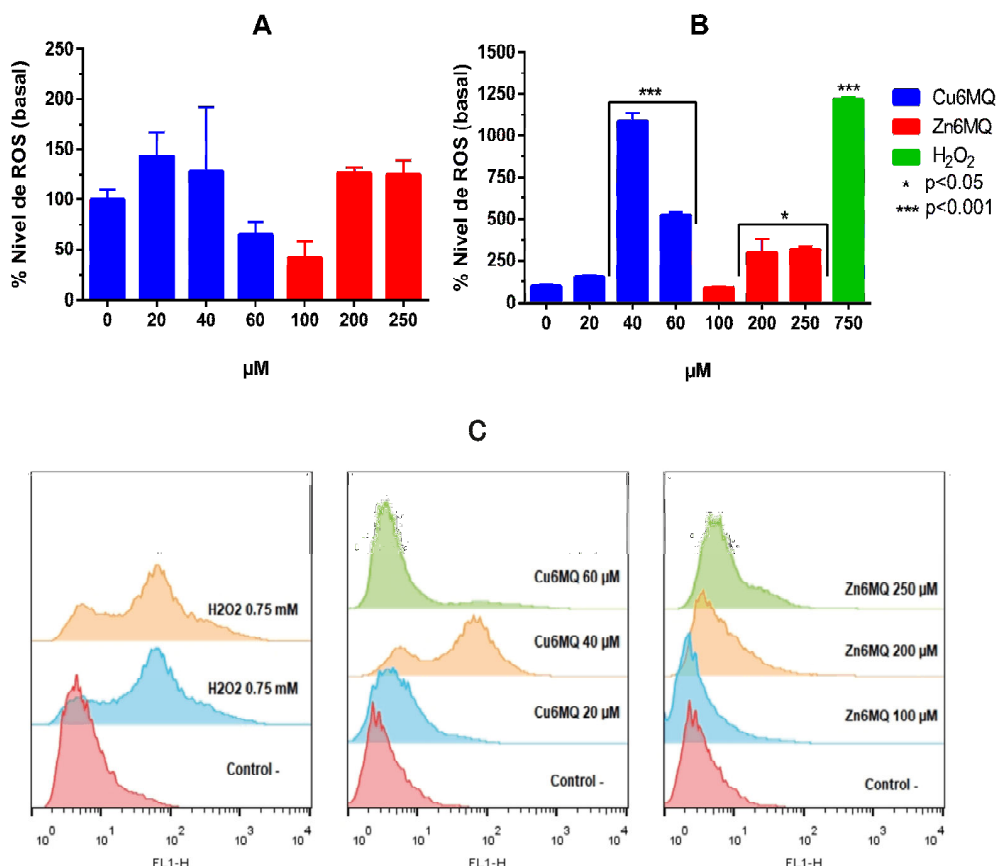


Figura 5.3-13 (A) determinación de superóxido en células A549, marcadas con DHE. (B) Determinación de peróxido en células A549 marcadas con H<sub>2</sub>DCFDA. (C) Histogramas población celular derivada de citometría de flujo para la determinación de peróxido. Los asteriscos representan diferencia significativa con respecto a los controles basales (0  $\mu\text{M}$ ). los gráficos se representan como la media  $\pm$  SEM con un  $n = 10$ .

En el panel C de la Figura 5.3-13, se presentan los histogramas de frecuencia derivados del análisis por citometría de flujo en la determinación de peróxido intracelular. Como se puede observar, a las concentraciones que causaron un aumento significativo de la fluorescencia a causa de peróxido intracelular, aparece una población celular desplazada hacia la derecha, es decir, a valores superiores de fluorescencia. Cabe destacar que Cu6MQ a 40  $\mu\text{M}$  produjo una población muy importante de células positivas para peróxido, sin embargo, a 60  $\mu\text{M}$  la población positiva disminuyó. Este efecto puede estar asociado a cierto grado de muerte celular, el cual es del 50 al 60% aproximadamente, según el ensayo de viabilidad (ver Figura 5.3-8), la cual compromete la integridad de la membrana celular. Por otro lado, es un hecho conocido que la sonda H<sub>2</sub>DCFDA se acumula a nivel citoplasmático, con lo cual cuando la membrana plasmática se vuelva más permeable, H<sub>2</sub>DCFDA no será retenida por la célula.

Se ha reportado que las células tumorales pueden adaptarse a entornos con considerable cantidad de especies oxidantes, mediante la activación de las enzimas de defensa antioxidante, así como con la participación de componentes no enzimáticos como el GSH para contrarrestar el aumento de la generación de ROS. Éste parece ser un mecanismo importante por el cual las células cancerosas mantienen la homeostasis redox. La supresión de este mecanismo de adaptación podría ser una estrategia atractiva para afectar de manera preferencial a las células cancerosas y, por lo tanto, puede tener importantes implicaciones terapéuticas [311].

El agotamiento del glutatión debido a un incremento en la cantidad de ROS intracelular es uno de los marcadores más conocidos de estrés oxidativo y considerando que ambos complejos demostraron incrementar la cantidad de peróxido a nivel intracelular, se decidió determinar la relación GSH/GSSG. Teniendo en cuenta que estos compuestos mostraron una reducción de la viabilidad celular significativa tras 24 horas de tratamiento se evaluó, la relación GSH/GSSG después de ese tiempo de exposición. Asimismo, se midió la relación GSH/GSSG a 6 horas con el fin de establecer si el estrés oxidativo produce un descenso en los niveles de GSH de forma temprana ya que este cumple un rol fundamental en la primera línea de defensa enzimática asociada a las enzimas glutatión peroxidasa y glutatión reductasa, además de ser uno de los componentes no enzimáticos mayoritarios [127].

Los resultados que se presentan en la Figura 5.3-14, muestran que el complejo Cu6MQ fue el que demostró ocasionar una oxidación del glutatión dependiente de la concentración del complejo en los periodos de tiempo estudiados en todo el rango de concentraciones, al realizar las pruebas estadísticas de diferencia de medias, se obtuvo que no hay una diferencia significativa entre concentraciones a los dos tiempos evaluados. Mientras que el complejo de zinc afectó la proporción GSH/GSSG únicamente después de 24 horas de exposición a partir de 200  $\mu\text{M}$ . Los resultados de ambos compuestos presentan coherencia con la producción intracelular de la especie peróxido demostrada previamente y se puede proponer que estos complejos inducen estrés oxidativo en las células A549 [312].

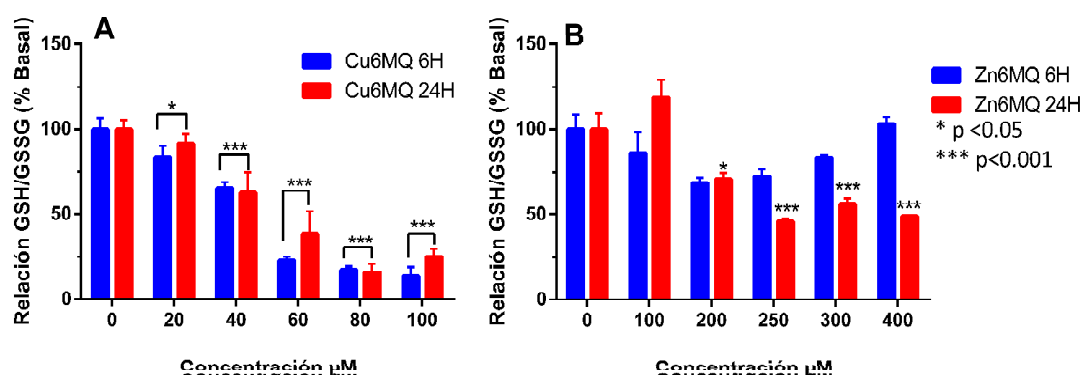


Figura 5.3-14 Determinación de la relación GSH/GSSG en células A549 tratadas con (A) Cu6MQ y (B) Zn6MQ. Los asteriscos representan diferencia significativa con respecto a los controles negativos (células no tratadas, 0  $\mu\text{M}$ ) \*  $p < 0.05$  y \*\*\*  $p < 0.001$ , respectivamente. Los datos se presentan como la media  $\pm$  SEM con un  $n=12$ .

Para confirmar la implicancia de la generación intracelular de peróxido y la inducción de estrés oxidativo por parte de los complejos Cu6MQ y Zn6MQ en la disminución de la viabilidad celular, las células A549 fueron tratadas con diferentes concentraciones de los complejos y en simultáneo se agregó una mezcla de vitaminas, 50  $\mu$ M de vitamina C y vitamina E, las cuales actúan como scavengers de ROS y son una fuente exógena de antioxidantes. Se determinó la viabilidad de las células luego de 24 horas de exposición a través de la técnica del MTT. Los resultados ilustrados en la Figura 5.3-15 demuestran que la adición de las vitaminas provocó una recuperación general de la viabilidad celular, elevando la población viable, cuando se usan las máximas concentraciones de ambos complejos por encima del 60% con respecto al basal.

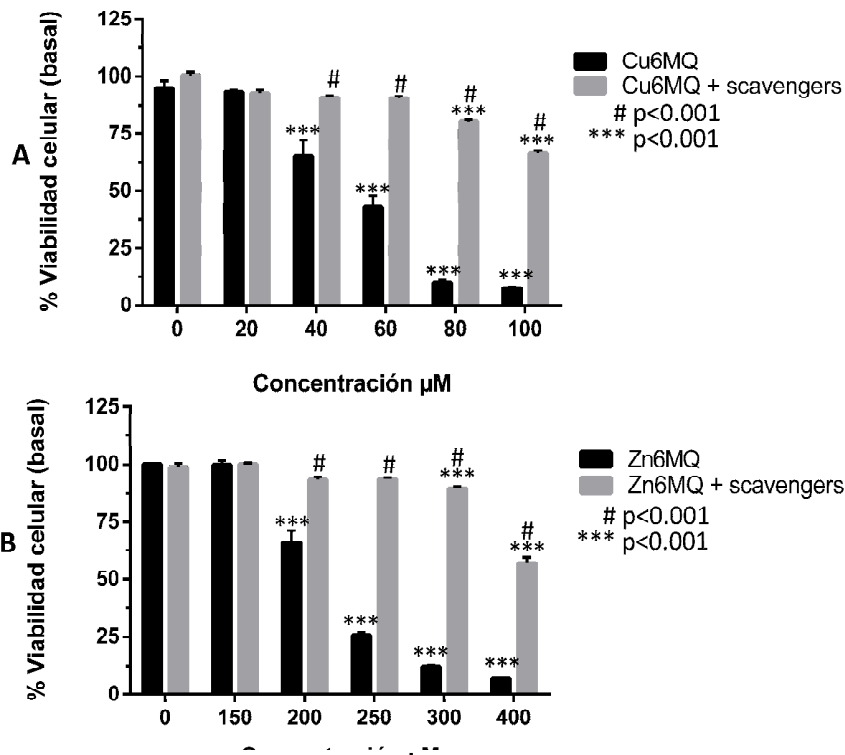


Figura 5.3-15 Efecto de la adición de scavengers de especies reactivas de oxígeno sobre la viabilidad de células A549 (24 horas). Los asteriscos (\*\*\*) indican una diferencia significativa con respecto a los controles (0  $\mu$ M)  $p < 0.001$  y el símbolo numeral (#) indica una diferencia entre el efecto citotóxico de los complejos a la misma concentración cuando se adicionan las vitaminas C y E ( $p < 0.001$ ). Los datos se presentan como la media  $\pm$  SEM con un  $n=12$ .

### 5.3.6. Inducción de apoptosis y alteraciones en el ciclo celular

La evaluación de la inducción de procesos apoptóticos en células A549 tratadas con los compuestos Cu6MQ y Zn6MQ durante 24 horas, se determinó a través citometría de flujo, empleando como sondas Anexina V-FITC y yoduro de propidio (IP).

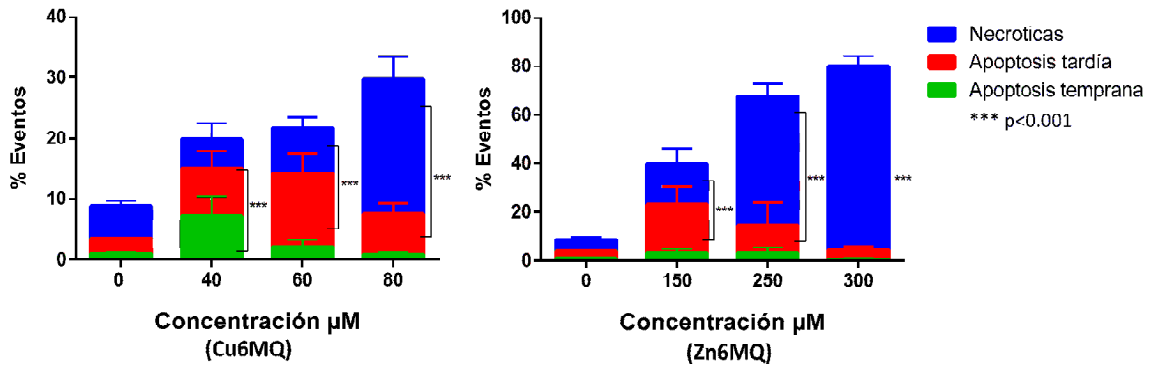


Figura 5.3-16 Evaluación de apoptosis en células A549 tratadas con Cu6MQ y Zn6MQ durante 24 horas. El símbolo asterisco (\*\*\*) representa una diferencia significativa  $p < 0.001$  con respecto a las células control (0  $\mu\text{M}$ ). Los datos se presentan como la media  $\pm$  SEM con un  $n=9$ .

Los resultados para el complejo de cobre (Cu6MQ) se presentan en la Figura 5.3-16(A). Se pudo apreciar que a la concentración de 40  $\mu\text{M}$  hubo un incremento de la población positiva para anexina (7.2%), lo que indica un proceso de exposición de la fosfatidilserina en la cara externa de la membrana celular, lo que está asociado con procesos apoptóticos tempranos. También aumentó la población doble positiva (7.6%), señalando procesos de apoptosis tardía. Al aumentar la concentración hasta 60  $\mu\text{M}$  se obtuvo un aumento y desplazamiento de la población a procesos de apoptosis tardía (marcación doble positiva) con un 12.6 % de eventos y células positivas para IP que está asociado a células muertas (7.4%). Finalmente, a 80  $\mu\text{M}$  se observó que la mayoría de la población celular estaba muerta (22%), seguido por una población en apoptosis tardía (6.6%). De lo cual se puede concluir que el complejo Cu6MQ indujo procesos apoptóticos y muerte celular de manera dosis dependiente, de forma consistente con lo observado en los ensayos previos de viabilidad celular.

En los resultados del complejo Zn6MQ (Figura 5.3-16B) se observó que a 150  $\mu\text{M}$  había un 20 % de la población en apoptosis tardía (doble positiva para anexina/IP) y también una cantidad apreciable en estado de muerte celular, 16.8 % (IP positivas). Al aumentar la concentración de complejo a 250 y 300  $\mu\text{M}$ , gran parte de la población celular estaba muerta (IP positiva) 53 % y 76 % respectivamente.

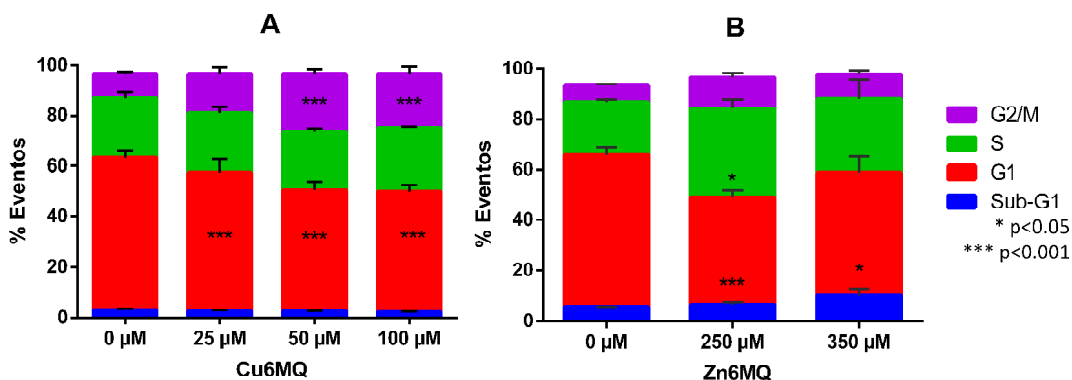


Figura 5.3-17 Evaluación de las alteraciones en el ciclo celular de células A549 tratadas con (A) Cu6MQ y (B) Zn6MQ durante 24 horas. Los asteriscos representan diferencia significativa con respecto a los controles con \*  $p < 0.05$  y \*\*\*  $p < 0.001$ . Los datos se presentan como la media  $\pm$  SEM con un  $n=9$ .

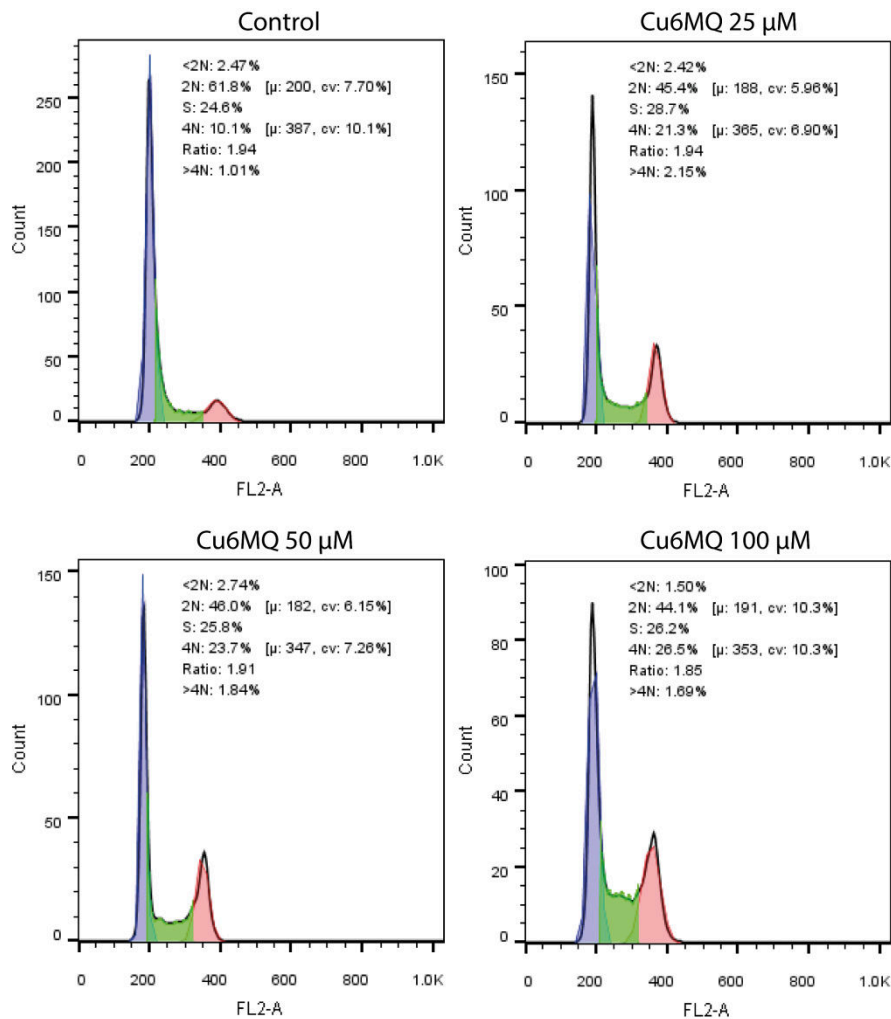


Figura 5.3-18 Histograma de frecuencia derivado del análisis del ciclo celular (células A549) tratadas durante 24 horas con el complejo Cu6QM y marcadas con yoduro de propidio.

Al analizar los resultados relacionados con la distribución de las células A549 en las diferentes etapas del ciclo celular, después de ser expuestas a los complejos Cu6MQ y Zn6MQ durante 24 horas, se obtuvieron los siguientes resultados.

El complejo de cobre a 25  $\mu\text{M}$  ocasionó una disminución de la población en fase G1 con respecto a los controles con un moderado aumento en la población G2/M. Este tipo de comportamiento fue observado en las concentraciones superiores donde se pudo ver que la población celular en la fase G2/M se encontraba incrementada aproximadamente un 10 % con respecto a los controles. La acumulación en esta etapa se dio a expensas de la población G1 la cual se vio disminuida en la misma proporción, mientras que las células en la fase S del ciclo no se vieron alteradas con respecto a los controles. En la Figura 5.3-18, se pueden observar histogramas representativos de la población celular analizados para el ciclo celular y los cambios inducidos por el complejo a las distintas concentraciones empleadas.

El arresto de las células en la fase G2/M del ciclo celular inducido por diferentes agentes ha sido relacionado con el daño directo en el ADN, inhibición de la topoisomerasa y la presencia de agentes estabilizantes de los microtúbulos. Finalmente el arresto en ésta

etapa del ciclo celular, se correlaciona con la inducción de muerte celular a través de la activación de la cascada apoptótica [313,314].

Por otro lado, el complejo Zn6MQ en las células A549 a la concentración de 250  $\mu\text{M}$  causó un incremento en la población celular en la fase S del ciclo (34 %), con la consecuente reducción de la población en fase G1 (42.5 %) aproximadamente un 18 % menos que en las células control. Al aumentar la concentración de complejo hasta 350  $\mu\text{M}$ , las poblaciones en G1 y S encontraron levemente disminuidas y aumentadas en relación con los controles, respectivamente; No obstante, a esta concentración se encontró un aumento significativo de la población Sub-G1 (10.5%) la cual es un indicador de células con fragmentación en el ADN, que se encuentran sufriendo procesos apoptóticos. En la Figura 5.3-19 se encuentran representados los histogramas de frecuencia del análisis del ciclo celular de este complejo.

El arresto celular en fase S señala un proceso en el cual hay síntesis de ADN, pero no logra superar el punto de revisión en esta etapa, principalmente debido a la presencia de defectos en el ADN. Diversas sustancias como pemetrexed y camptotecina inducen arresto en este punto y conducen a la muerte celular vía apoptosis, lo cual coincide con los hallazgos reportados para este complejo [315–318].

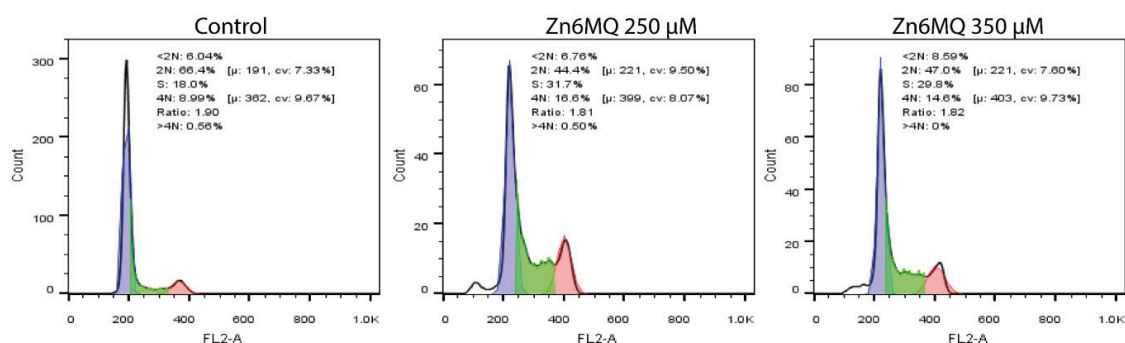


Figura 5.3-19 Histograma de frecuencia derivado del análisis del ciclo celular (células A549) tratadas durante 24 horas con el complejo Zn6QM y marcadas con yoduro de propidio.

### 5.3.7. Daños a nivel genético inducidos por Cu6MQ y Zn6MQ

Las alteraciones en el ADN como mecanismo de acción de diferentes complejos con capacidad oxidante han sido revisadas en la literatura ampliamente [23,319,320].

Con el objetivo de dilucidar si los complejos Cu6MQ y Zn6MQ inducen alteraciones en el ADN de las células A549, se aplicó el ensayo cometa o electroforesis de una única célula. Los resultados se presentan en la Figura 5.3-20.

Las células tratadas con concentraciones sub-IC50 del complejo Cu6MQ mostraron inducir roturas en las hebras del ADN a 25  $\mu\text{M}$  (tail moment 2.5), es de destacar que, a la misma concentración de complejo, cuando las células fueron incubadas con la enzima Endo III la cantidad de cortes en el ADN se triplicó indicando la presencia de bases pirimidínicas oxidadas, lo que se puede correlacionar con la inducción de estrés oxidativo intracelular previamente demostrado [321].

El complejo Zn6MQ sólo demostró inducir cortes en el ADN a una concentración de 50  $\mu\text{M}$  en presencia de la enzima Endo III y en menor proporción que su análogo de cobre. Esta respuesta es consistente con la menor capacidad del complejo de zinc de producir peróxido señalada en el apartado 5.3.5 en la Figura 5.3-13.

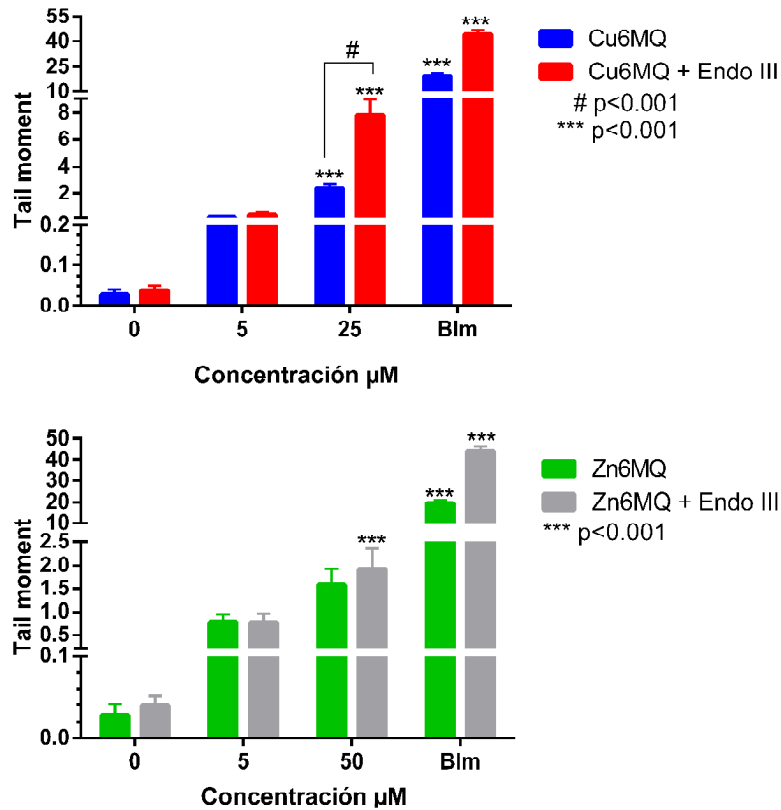


Figura 5.3-20 Resultados del ensayo cometa en células A549 expuestas a los complejos Cu6MQ y Zn6MQ durante 24 horas. El asterisco representa una diferencia significativa con respecto a los controles ( $p < 0.001$ ), el símbolo numeral, #, representa una diferencia entre las células incubadas con la enzima Endo III ( $p < 0.001$ ). Los datos se presentan como la media  $\pm$  SEM con un  $n = 150$ .

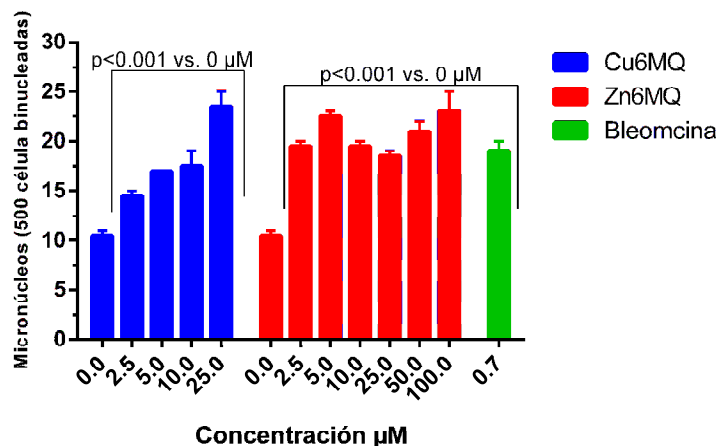


Figura 5.3-21 Evaluación inducción de micronúcleos en células A549 tratadas con los complejos Cu6MQ y Zn6MQ durante 24 horas. Los datos se representan como la media  $\pm$  SEM con un  $n = 5$ . La bleomicina (barra en color verde) se empleó como control positivo (0.7  $\mu\text{M}$ )

En la Figura 5.3-21, se presentan los resultados de la formación de micronúcleos en células A549 tratadas durante 24 horas con los complejos Cu6MQ y Zn6MQ. Como se

puede ver en la figura en el panel izquierdo se observa que el complejo de cobre induce la formación de micronúcleos de una manera dependiente de la concentración desde 2.5  $\mu\text{M}$  e incluso a la máxima concentración supera la cantidad de micronúcleos inducida con respecto al control positivo de bleomicina (0.7  $\mu\text{M}$ ). La formación de micronúcleos es congruente con la inducción de cortes en el ADN demostrado a través del ensayo cometa [322]. Singh y colaboradores han demostrado que complejos de cobre II, tienen la capacidad de inducir micronúcleos en células en cultivo y que hay una correlación entre la frecuencia de los micronúcleos y la muerte por apoptosis [297].

El complejo Zn6MQ por su parte, también incrementó la frecuencia de micronúcleos en las células A549 en todas las concentraciones evaluadas (2.5 – 100  $\mu\text{M}$ ). Sin embargo, en este caso la respuesta fue independiente de la concentración. De igual manera, se puede ver una relación entre la tendencia incremental en los quiebres de ADN inducidos por el complejo (Figura 5.3-20) y la formación micronúcleos. Khabour et al., demostraron que complejos de zinc con bases de Schiff con 8-aminoquinolina indujeron efectos genotóxicos en linfocitos humanos y en pruebas en ratones [323].

#### **5.3.8. Efecto de los complejos Cu6MQ y Zn6MQ en la viabilidad y proliferación de esferoides multicelulares derivados de la línea celular A549**

Los esferoides multicelulares derivados de la línea A549 fueron expuestos a los complejos Cu6MQ y Zn6MQ durante 24 y 48 horas, posteriormente se evaluó la viabilidad celular usando la sonda resazurina.



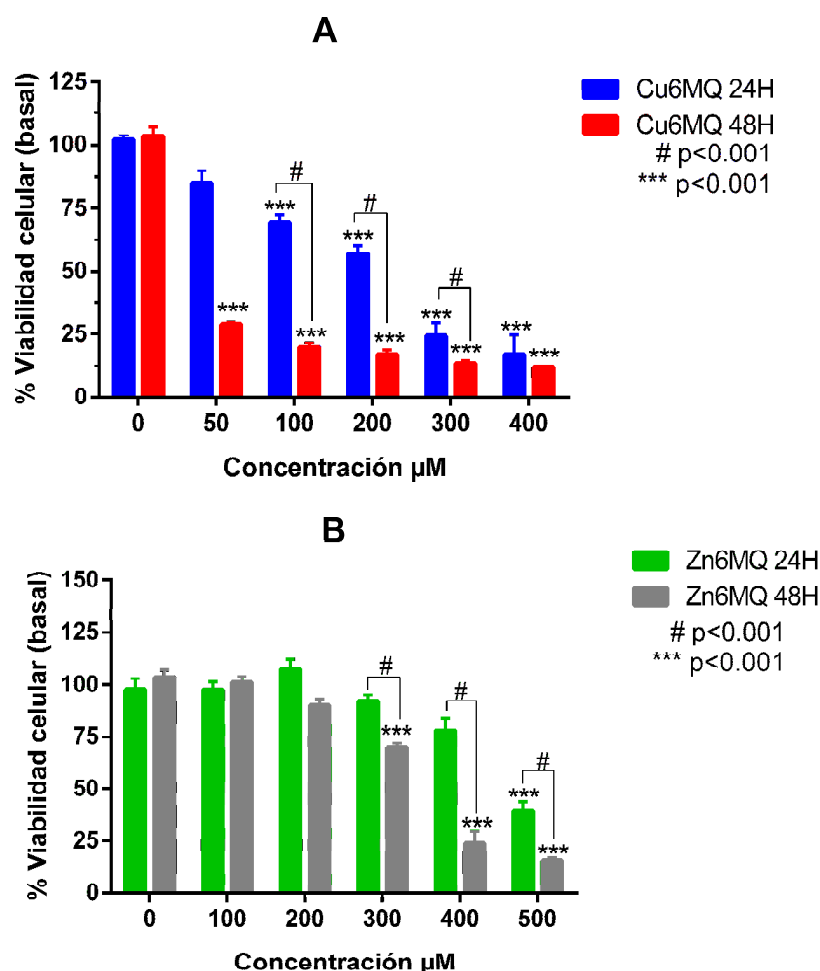


Figura 5.3-22 Evaluación de la viabilidad celular de esferoides de A549 tratados con (A) Cu6MQ (B) Zn6MQ durante 24 y 48 horas. El símbolo asterisco (\*\*\*) representa una diferencia significativa con respecto al control (0  $\mu\text{M}$ ) con un valor  $p < 0.001$ . El símbolo numeral representa una diferencia entre los tratamientos realizados durante 24 y 48 horas a la misma concentración con un valor de  $p < 0.001$ . Los datos se representan como la media  $\pm$  SEM con  $n=20$

Los resultados mostrados en la Figura 5.3-22 muestran una vez más que en este sistema existe una diferencia entre el nivel de actividad citotóxica de ambos complejos. Cu6MQ demostró ser el más activo y su efecto fue dependiente de la concentración tanto a 24 como a 48 horas. También se encontró que en los esferoides el valor de IC50 a 24 horas se triplicó (176.4  $\mu\text{M}$ ) con respecto al valor obtenido en los ensayos en el modelo bidimensional (ver apartado 5.3.3). A las 48 horas se encontró un descenso significativo en la viabilidad de los esferoides desde 50  $\mu\text{M}$  ( $\approx$  30% con respecto a los controles) y una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) entre las mismas concentraciones utilizadas a 24 y 48 horas.

El complejo de zinc tras ser incubado con los esferoides tras 24 horas indujo efectos en la viabilidad celular únicamente a la máxima concentración empleada (500  $\mu\text{M}$ ) con un IC50 calculado de 469.4  $\mu\text{M}$ , el cual corresponde a aproximadamente al doble del obtenido en los ensayos en monocapa. Al incrementar el tiempo de incubación a 48 horas se encontró un efecto en la viabilidad celular dependiente de la concentración desde 200

$\mu\text{M}$  y un valor de 339.2 para el  $\text{IC}_{50}$ . Estos resultados muestran una reducción de 1.4 veces con respecto al obtenido a las 24 horas, señalando que el efecto de este complejo también depende del tiempo.

La resistencia mostrada por los esferoides al ser expuestos a los complejos ya ha sido reportada previamente para diversos agentes terapéuticos. Por ejemplo, en el caso del cisplatino varios autores reportan incrementos del orden de 100 veces en comparación con lo observado en monocapa. Este tipo de resistencia se encuentra asociada a la adhesión celular que se presenta en estos modelos de cultivo y es conocida como resistencia a la apoptosis mediada por la adhesión. Este tipo de resistencia es comparable a la mostrada por los tejidos tumorales in vivo [324–326] Debido a estas diferencias en la respuesta celular a agentes citotóxicos, el uso de esferoides multicelulares es considerado una herramienta fundamental en el desarrollo y la investigación in vitro de nuevas drogas antitumorales.

Los esferoides multicelulares presentan tres zonas principales clasificadas según la morfología de las células que la integran: el núcleo necrótico en el centro del esferoide, una capa intermedia de células quiescentes y la capa más externa en la cual se ubican las células proliferantes. Estas últimas hacen que el esferoide crezca, por lo que la inducción de muerte celular a las células de estas dos últimas zonas es fundamental para evitar procesos de migración, invasión y metástasis [150,151]

Para determinar el efecto de los complejos sobre las diferentes capas del esferoide se empleó una doble tinción con fluoresceína diacetato (FDA) y yoduro de propidio (IP), la primera marca las células vivas y activas metabólicamente y la segunda las células muertas o con alteraciones en la integridad de la membrana celular.

En la Figura 5.3-23 (panel superior) se muestran las fotografías -adquiridas a través de un microscopio de epifluorescencia- de esferoides tratados durante 24 horas con el complejo Cu6MQ y marcadas con FDA e IP. Como se puede apreciar en la fotografía del control la población de células viables (verde) se encuentra en la parte más externa del esferoide envolviendo de forma casi continua el centro de células necróticas (positivas para IP).

Se puede ver que al incrementar la concentración del complejo Cu6MQ la población celular viable empieza a disminuir y a partir de 100  $\mu\text{M}$  la mayoría de las células son positivas para yoduro de propidio indicando que hay muerte celular. Otra característica relevante que se puede observar es la pérdida de compactación del esferoide y la definición del borde externo del mismo.

En los paneles inferiores de la figura se pueden observar fotografías de esferoides expuestos a diferentes concentraciones de Cu6MQ durante 24 horas que fueron transferidos a placas de cultivo adherentes y cultivados durante 24 y 72 horas con medio de cultivo completo (DMEM + 10% SFB). Este experimento presenta una analogía con los ensayos de proliferación celular ya que se evalúa la capacidad de las células para reproducirse después del tratamiento con los complejos.

Se puede observar que en las primeras 24 horas de incubación en los controles y las concentraciones de 10 y 50  $\mu\text{M}$  hay proyecciones de invadopodios hacia la superficie de la placa, mientras que en las concentraciones superiores no se aprecian dichas protrusiones. Por el contrario, a las 72 horas post-exposición a concentraciones inferiores de los complejos, los esferoides muestran una proliferación celular importante sobre la superficie de la placa de cultivo, mientras que en las concentraciones superiores no hubo proliferación celular. Dichos resultados son congruentes con los ensayos de viabilidad y la tinción con FDA/IP, demostrando que los esferoides que conservaron células viables en la capa proliferante fueron aquellos que lograron crecer en la superficie de la placa.

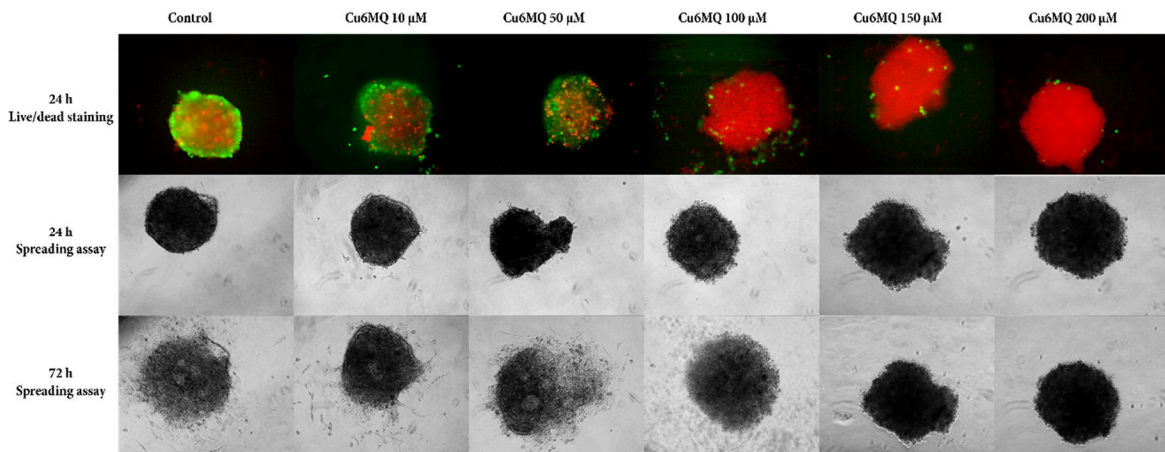


Figura 5.3-23 Fotografías tinción live-dead para esferoides multicelulares tratados con el complejo Cu6MQ fluoresceína (verde) yoduro de propidio (rojo). En los paneles inferiores microscopía de contraste de fase (10X) para evaluar el efecto de la proliferación celular después del tratamiento con el complejo.

Los esferoides expuestos al complejo Zn6MQ durante 24 horas y teñidos con FDA/IP, se presentan en la Figura 5.3-24 (panel superior). Se puede observar que los esferoides expuestos a las concentraciones evaluadas conservaron viabilidad de la capa proliferante con un leve incremento en la cantidad de células positivas para IP. El resultado es consistente con los resultados obtenidos en el ensayo de proliferación de los esferoides (paneles inferiores Figura 5.3-24) donde se advierte que a las 24 horas de incubación había protrusiones celulares en la superficie de la placa en todo el rango de concentraciones estudiado y a 72 horas se encontró una proliferación celular significativa sobre la superficie de la placa.

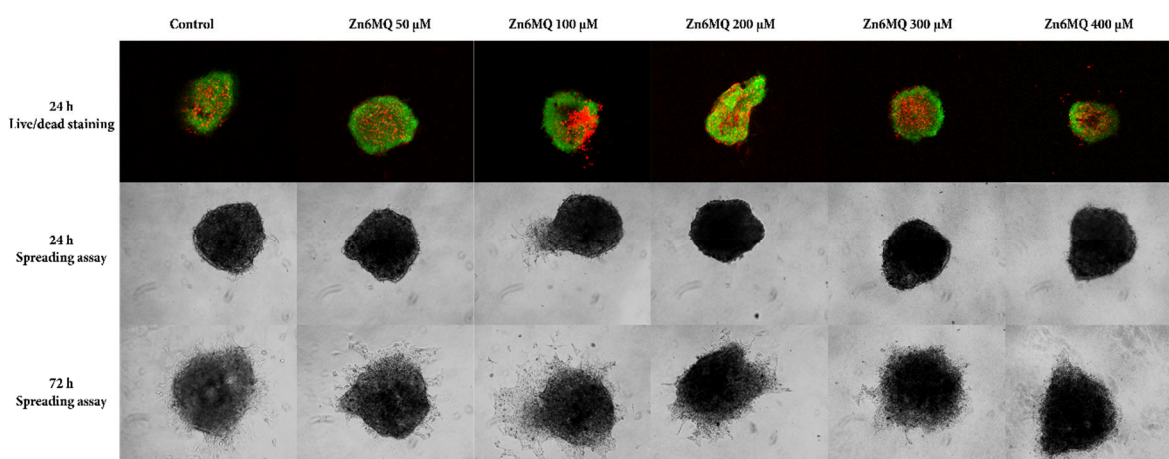


Figura 5.3-24 Fotografías tinción live-dead para esferoides multicelulares tratados con el complejo Zn6MQ fluoresceína (verde) yoduro de propidio (rojo). En los paneles inferiores microscopía de contraste de fase (10X) para evaluar el efecto de la proliferación celular después del tratamiento con el complejo.

### 5.3.9. Evaluación de sinergismo entre los complejos Cu6MQ y Zn6MQ

En vista de la diferencia de la potencia de los complejos Cu6MQ y Zn6MQ, se evaluó la posible interacción sinérgica entre ambos complejos empleado el método de Chou – Talalay, bajo el modelo de índice de combinación [255,256]. A partir de datos de viabilidad celular obtenidos a través del ensayo MTT para el modelo 2D y de resazurina para los esferoides y su posterior análisis en el programa Compusyn® se obtuvieron los datos resumidos en la Tabla 5.3-5.

Tabla 5.3-5 Resumen de los valores del índice de combinación de los complejos Cu6MQ y Zn6MQ para los niveles de efecto 0.5, 0.75 y 0.90 en células A549.

<b>Combinación de complejos</b>					
<b>Complejos</b>	<b>Dm (μM)</b>	<b>r<sup>2</sup></b>	<b>CI/fracción afectada</b>		
			<b>0.50</b>	<b>0.75</b>	<b>0.90</b>
<i>Cu6MQ</i>	52.6	0.955			
<i>Zn6MQ</i>	245.9	0.990			
<i>Cu6MQ:Zn6MQ (1:1)</i>	65.7	0.962	0.7583 ++	0.7739 ++	0.7948 ++
<i>Cu6MQ:Zn6MQ (1:3)</i>	115.6	0.951	0.9010 Aditivo	0.9043 Aditivo	0.9157 Aditivo
<i>Cu6MQ:Zn6MQ (1:4)</i>	129.9	0.958	0.8519 Aditivo	0.9484 Aditivo	1.0653 -
<b>Esferoides multicelulares</b>					
<i>Cu6MQ</i>	176.4	0.974			
<i>Zn6MQ</i>	469.4	0.991			
<i>Cu6MQ:Zn6MQ (1:1)</i>	135.3	0.955	0.5275 +++	0.5519 +++	0.6324 +++

+++ Sinergismo, ++ Sinergismo moderado, - Antagonismo moderado.

Para los experimentos en monocapa, se usaron tres combinaciones de los complejos Cu6MQ:Zn6MQ en relación fija, 1:1, 1:3 y 1:4. Los resultados indican que la relación 1:1 presentó los mejores valores del índice de combinación mostrando un efecto moderadamente sinérgico entre ambos complejos. En las relaciones 1:3 y 1:4 se observó una reducción de la interacción sinérgica y un aumento de los valores del índice de combinación, de lo cual se deduce que al aumentar la concentración del complejo Zn6MQ se presenta una competencia entre ambos compuestos desplazando el comportamiento de la mezcla hacia el antagonismo a medida que aumenta la fracción afectada, es decir, la cantidad de células muertas. En la relación de combinación 1:1, los valores de IC50 se redujeron 1.6 veces (Cu6MQ) y 7.5 veces (Zn6MQ) en relación con los IC50 de cada complejo individualmente.

Al combinar ambos complejos y probarlos en el modelo de esferoides se encontró también una interacción sinérgica en la relación 1:1, reduciendo la dosis media (IC50) a una concentración total de 135.3  $\mu$ M (Cu6MQ + Zn6MQ) lo que representa una reducción de casi 7 veces la concentración de Zn6MQ y 2.6 veces la de Cu6MQ.

En definitiva, la combinación de los complejos en una relación 1:1 permite reducir la concentración necesaria de estos para causar un efecto citotóxico sobre las células A549.

#### **5.3.10. Resumen sección 5.3 Complejos de 6-metoxiquinolina con cobre, zinc, cobalto y plata**

En esta sección se inició el estudio con cuatro complejos de 6-metoxiquinolina con cobre, zinc, cobalto y plata. El complejo de plata fue el más citotóxico de la familia. Sin embargo, a pesar de mejorar las propiedades antitumorales del ligando, no se pudo observar diferencia con el catión Ag(I). El complejo iónico Co6MQ, que mostró ser estructuralmente diferente a los otros complejos miembros de la familia, no ejerció efectos nocivos sobre las células A549 ni sobre las MG-63. Mientras que los complejos Cu6MQ y Zn6MQ demostraron ser efectivos en ambas líneas celulares, siendo el complejo de cobre más potente y que además mostró selectividad frente a células no tumorales.

Dada la actividad de los complejos de cobre y zinc, se decidió estudiar su mecanismo de acción en las células A549. Se logró demostrar que ambos complejos inducen la formación de peróxido a nivel intracelular, siendo el complejo de cobre el más activo. Además, se encontró la inducción de estrés oxidativo con una alteración de la dupla GSH/GSSG.

Ambos complejos desencadenaron procesos apoptóticos relacionados con daños de tipo oxidativo a nivel del ADN, el complejo de cobre indujo alteración en el ciclo celular con un arresto en la fase G2/M, mientras que el Zn6MQ arrestó el ciclo en la fase S.

El complejo Cu6MQ produjo efectos citotóxicos en esferoides de células A549 de una manera dependiente de la concentración y del tiempo, mientras que Zn6MQ sólo afectó la de manera dependiente de la concentración después de 48 horas del tratamiento.

Cu6MQ también ocasionó alteraciones a nivel de la proliferación celular en los modelos de monocapa y esferoides, mientras que Zn6MQ sólo afectó la proliferación en el modelo bidimensional en el rango de concentraciones evaluadas.

Finalmente, se pudo comprobar que al combinar los complejos Cu6MQ y Zn6MQ en una relación uno a uno hay un efecto sinérgico entre ambos complejos y adicionalmente las concentraciones de ambos complejos pueden ser reducidas en varios órdenes de magnitud para lograr el mismo efecto que los compuestos de forma individual.

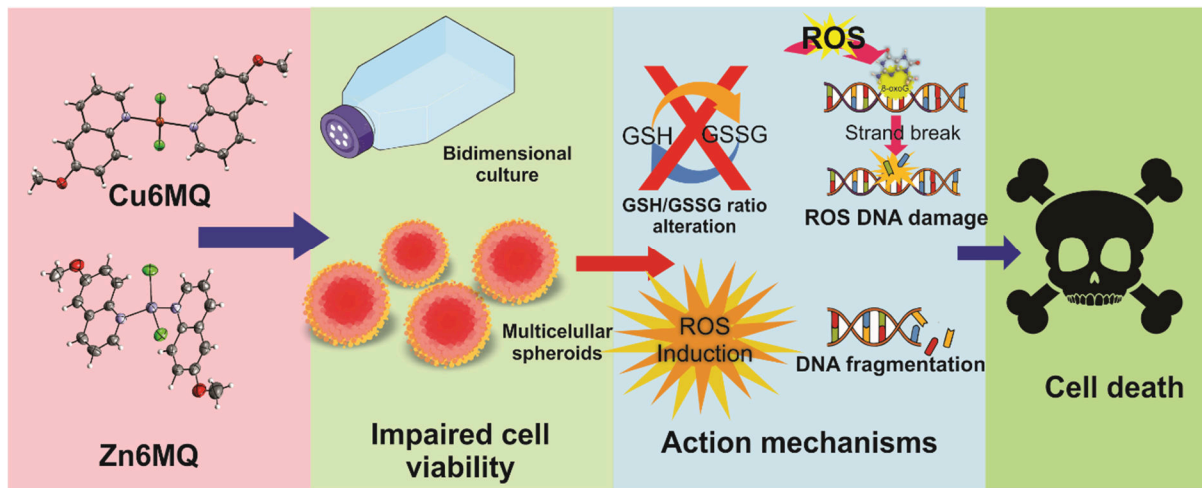


Figura 5.3-25 Resumen gráfico resultados obtenidos para los complejos Cu6MQ y Cu6MQ.

## 5.4. Estudios realizados con complejos ternarios de 2,2'-biquinolina con sulfametazina y sulfaquinoxalina

### 5.4.1. Introducción

En esta sección del manuscrito se analizarán los efectos de los complejos ternarios de 2,2'-biquinolina con sulfaquinoxalina ( $\text{Cu}(\text{SDQ})(\text{BQ})\text{Cl}$ ) y con sulfametazina ( $\text{Cu}(\text{SMT})(\text{BQ})\text{Cl}$ ), nombrados de ahora en adelante SDQCu y SMTCu, respectivamente. Además, con propósitos comparativos se sintetizaron los complejos binarios de cobre con sulfametazina (SMTCu binario), sulfaquinoxalina (SDQCu binario) y con el heterociclo 2,2'-biquinolina con fórmula  $\text{CuBQ}_2\text{Cl}_2$  ( $\text{CuBQ}$ ).

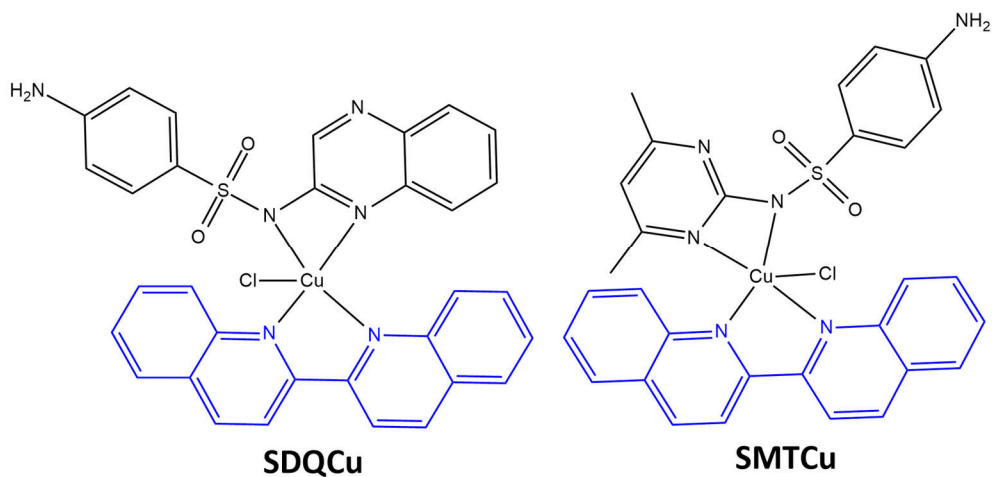


Figura 5.4-1 Estructura química de los complejos ternarios de Sulfaquinoxalina (SDQCu), Sulfametazina (SMTCu) y Biquinolina.

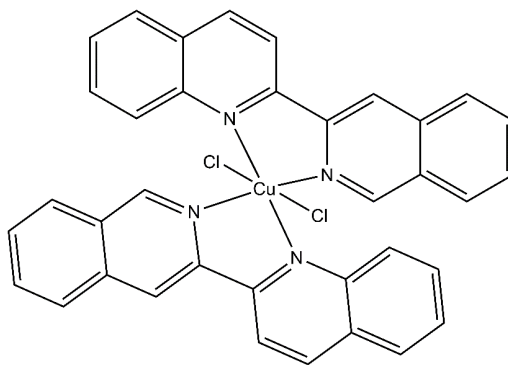


Figura 5.4-2 Estructura química del complejo  $\text{CuBQ}_2\text{Cl}_2$  ( $\text{CuBQ}$ ).

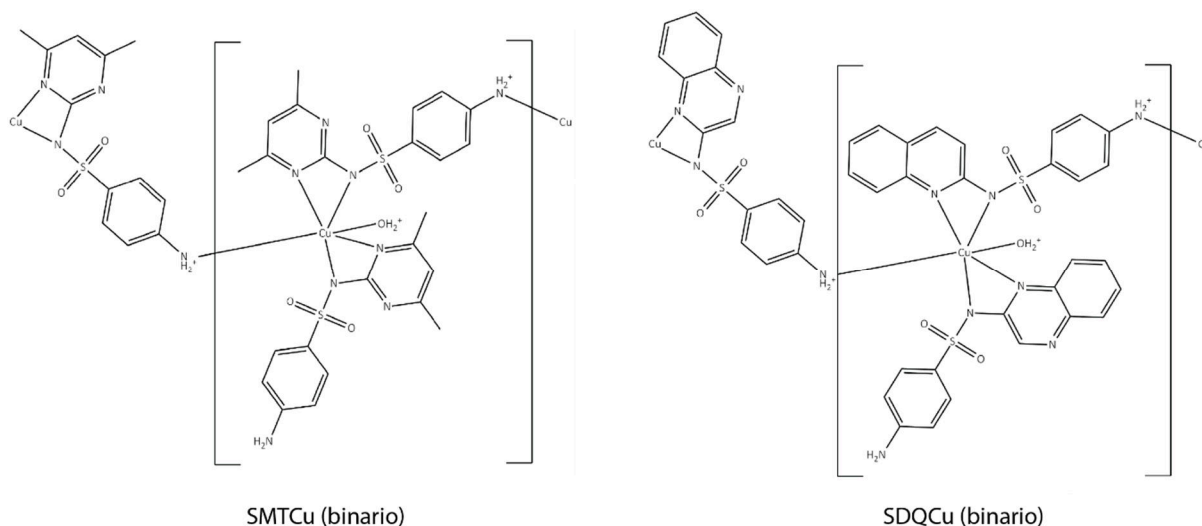


Figura 5.4-3 Estructura química de los complejos binarios de sulfametazina (SMT) y sulfaquinolaxina (SDQ) con cobre.

Las sulfonamidas son una clase de agentes terapéuticos usados en el tratamiento de un amplio espectro de infecciones bacterianas causadas tanto por microorganismos gram-positivos como gram-negativos y actúan, principalmente, como bacteriostáticos a través de la inhibición de la síntesis del ácido fólico y afectando la síntesis de ADN [327].

Una gran variedad de complejos de coordinación derivados de sulfonamidas ha sido estudiada por poseer propiedades relacionadas con su capacidad para estabilizar polímeros, comportamiento magnético, electroquímica, emisión luminiscente y actividad biológica [220]. A nivel farmacológico, el complejo más conocido es la sulfadiazina de plata, ampliamente empleada en el tratamiento de heridas cutáneas y quemaduras. Además, se han reportado complejos de cobre con capacidad antibacterial [33,328].

El ligando 2,2'-biquinolina es un compuesto heterocíclico perteneciente a la familia de las quinolinas, formada por dos unidades de quinolina unidas a través del carbono 2 del anillo nitrogenado. Diversos complejos de este ligando han sido reportados y estudiados por sus potenciales aplicaciones fisicoquímicas y terapéuticas [329], entre los que se pueden nombrar complejos de plata, cobre, cobalto, platino, vanadio, rutenio, paladio, entre otros [330–332].

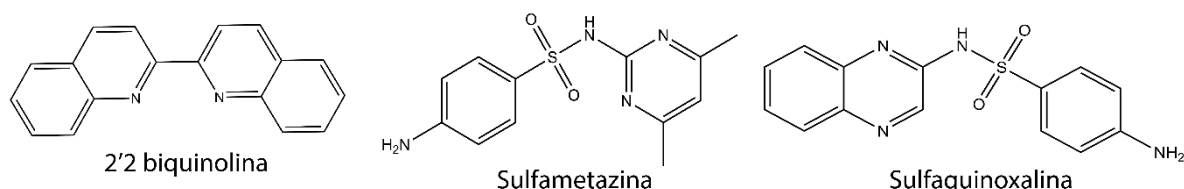


Figura 5.4-4 Estructura química de los ligandos 2,2' biquinolona, sulfametazina y sulfaquinolaxina.



#### 5.4.2. Síntesis de los complejos ternarios SDQCu y SMTCu

Estos compuestos fueron sintetizados y caracterizados en el laboratorio de la doctora Beatriz Soria, en el centro de química inorgánica (CEQUINOR) por el Ing. Cristian Villa. La síntesis y caracterización ha sido previamente reportada [220] y se describen brevemente en el apartado 4.1.3.

Esta familia de complejos comprende dos complejos ternarios cuyas estructuras químicas se encuentran representadas en la Figura 5.4-1 (SMTCu y SDQCu). En la Figura 5.4-2 se encuentra la estructura química del complejo binario de cobre y biquinolina (BQ<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) y la estructura de los complejos binarios de tipo polimérico de sulfaquinoxalina y sulfametazina se encuentran en la Figura 5.4-3 (SMTCu binario y SDQCu binario).

#### 5.4.3. Efectos en la viabilidad celular

Las células A549 derivadas de cáncer humano de pulmón tal como se expuso en el apartado 4.4.1 representan un modelo incluido en el panel del NIH para el estudio de potenciales fármacos antitumorales, por lo que la exploración de compuestos en esta línea celular aporta información relevante y comparable con diversos estudios publicados. Las células fueron expuestas a diferentes concentraciones de los complejos durante 24 horas y la viabilidad fue determinada aplicando la técnica del MTT (ver sección 4.7.3).

En la Figura 5.4-5, se puede observar que los complejos SMTCu y SDQCu al ser incubados durante 24 horas con las células indujeron un efecto citotóxico desde 2  $\mu$ M reduciendo la viabilidad celular 63.1% y 76.9% respectivamente. Al comparar el complejo binario de 2,2'-biquinolina con los ternarios, se puede observar que estos últimos son más citotóxicos para las células. También es posible observar en la Figura 5.4-5 que los tres complejos ejercen un efecto dependiente de la concentración, siendo sus valores de IC<sub>50</sub> CuBQ ( $3.8 \pm 0.53 \mu\text{M}$ ), SMTCu ( $1.79 \pm 0.17 \mu\text{M}$ ) y SDQCu ( $1.59 \pm 0.14 \mu\text{M}$ ).

En experiencias previas, se demostró que el cloruro de cobre, y los ligandos libres biquinolina, sulfametazina y sulfaquinoxalina no indujeron alteraciones en la viabilidad celular hasta una concentración de 300  $\mu$ M (datos no presentados), lo cual corrobora preliminarmente la hipótesis de este trabajo de tesis doctoral, que los complejos de coordinación mejoran las propiedades biológicas presentadas por el metal y los ligandos libres.

El efecto de los complejos binarios de cobre con sulfametazina y sulfaquinoxalina sobre la viabilidad de las células A549 también fue evaluado durante 24 horas, y los resultados se presentan en la Figura 5.4-6. Se puede analizar de dicho gráfico que, a pesar de ampliar el rango de concentración utilizado de estos complejos hasta 100  $\mu$ M, no se logró reducir la viabilidad de manera considerable, siendo el complejo más activo en este caso el SMTCu binario que a la máxima concentración redujo la viabilidad celular cerca de un 40% mientras que SDQCu binario 19% aproximadamente.

La diferencia entre los complejos y su efecto sobre la viabilidad celular está asociada con las propiedades fisicoquímicas de los ligandos seleccionados. Se ha demostrado que los complejos activos a nivel biológico tienen ligandos orgánicos con la capacidad de neutralizar la carga del ion cobre, incrementar la lipofilidad general de la molécula para facilitar el transporte a través de la membrana celular y tener la capacidad de interactuar con el ADN o con otras proteínas [33]. En el caso de los complejos estudiados en este apartado, se puede indicar que la presencia de la biquinolina y la sulfonamida como ligandos ofrece un sistema de deslocalización de la carga del cobre, a través de resonancia por medio de los dobles enlaces presentes en los complejos, lo cual incrementa la hidrofobicidad del complejo. Adicionalmente, la configuración planar de la biquinolina ofrece a los complejos la capacidad de actuar como intercalantes en las hebras de ADN por medio de interacciones del tipo de  $\pi$ -stacking [288], incluso complejos ternarios de sulfonamidas con ligandos N,N heterocíclicos similares a los expuestos en esta sección demostraron efectos lesivos en células Jurkat y Caco-2, actividad endonucleasa e inducción de apoptosis [77].

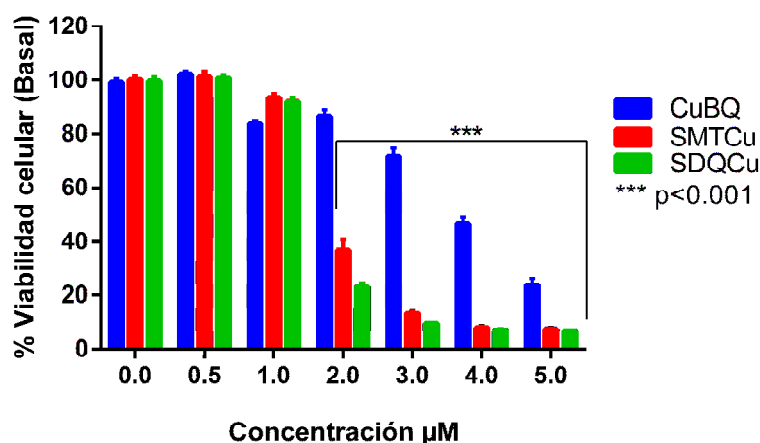


Figura 5.4-5 Efecto citotóxico de los complejos SDQcCu, SMTcCu y CuBQ en células A549 tratadas durante 24 horas. Los asteriscos (\*\*\*) representan una diferencia significativa con respecto a los controles basales (0 µM) con  $p < 0.001$ . Los datos se presentan como la media  $\pm$  SEM con un  $n=12$ .

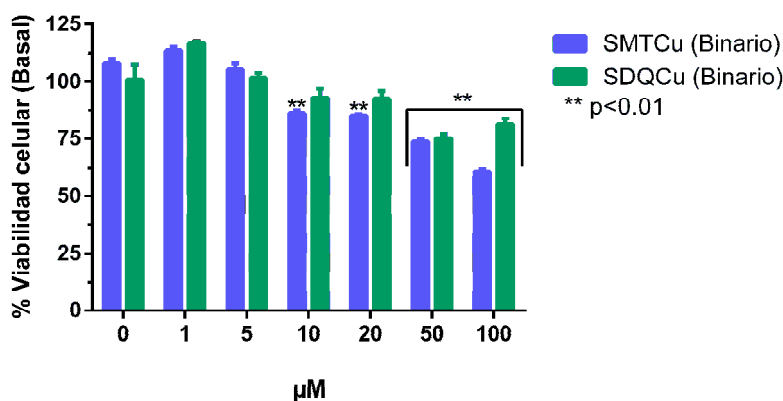


Figura 5.4-6 Efecto en la viabilidad celular de los complejos Binarios SMTcCu y SDQcCu en células A549. Los asterisco representa una diferencia significativa con respecto a los controles basales (0 µM) ( $p < 0.01$ ).

Al comparar el efecto de los complejos en las células fibroblásticas de fenotipo normal MRC-5, se encontró que los complejos ejercieron un efecto nocivo comparable al obtenido en las células de fenotipo tumoral A549. Las curvas de viabilidad celular se encuentran en la Figura 5.4-7.

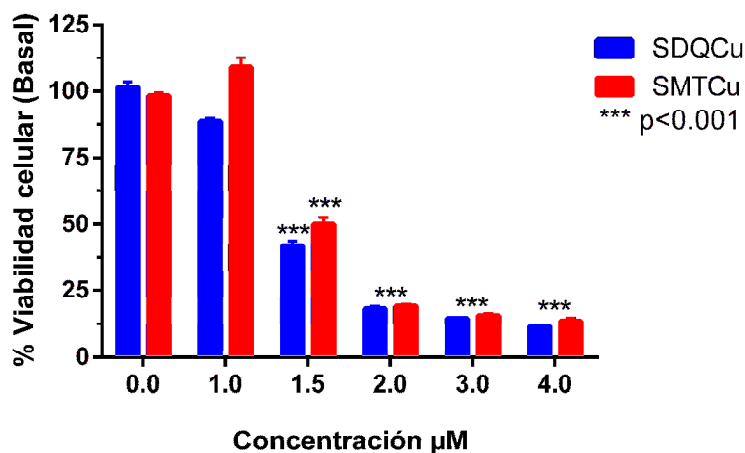


Figura 5.4-7 Efecto de los complejos SDQCu y SMTCu en la viabilidad de células MRC-5 después de una exposición de 24 horas. Los asteriscos (\*\*\*) representan una diferencia significativa con respecto al control basal (0  $\mu\text{M}$ ) con un valor de  $p < 0.001$ . Los datos se presentan como la media  $\pm$  SEM con un  $n=9$ .

Un complejo de cobre con un metabolito del disulfiram (dietilditiocarbamato),  $\text{Cu}(\text{DDC})_2$ , demostró ejercer efectos citotóxicos en las líneas celulares U251, MDA-231-BR y A549 con valores de  $\text{IC}_{50}$  alrededor de 1  $\mu\text{M}$  y un efecto selectivo al ser probadas en fibroblastos normales HBEpC ( $\text{IC}_{50} > 10 \mu\text{M}$ ) [333]. De igual manera Mahendiran y colaboradores sintetizaron una familia de cuatro complejos de cobre (II) con tiosemicarbazonas y los evaluaron en las líneas de fenotipo normal, como NHDF y miotubos L6. Nuevamente los complejos tuvieron un efecto diferencial entre ligandos y complejos y fueron más citotóxicos sobre las células MCF-7, HeLa, Hep2 y EAC [334].

Estas investigaciones demostraron la relevancia de la exploración de familias de ligandos relacionados para obtener selectividad en el efecto citotóxico, como Rajalakshmi y colaboradores quienes presentaron una familia de tres complejos polipiridílicos de cobre (II) con el mismo ligando principal, pero variando el ligando secundario cada vez y demostraron que dos de tres fueron selectivos por las células MG-63, en comparación con las normales [335,336]. En el caso de los complejos estudiados en esta sección es posible realizar optimizaciones futuras del complejo SMTCu, el cual demostró una leve diferencia en la citotoxicidad ( $p < 0.05$ ) con respecto a SDQCu.

#### 5.4.4. Determinación de la producción de ROS a nivel intracelular

En múltiples reportes bibliográficos, en los que se estudia el mecanismo de acción asociado a la inducción de muerte celular empleando complejos de cobre (II), se ha demostrado una relación directa entre el aumento de especies reactivas de oxígeno, el incremento de estrés oxidativo y la muerte celular, principalmente apoptosis [337,338].

La alteración del estrés oxidativo como estrategia terapéutica se basa en dos aproximaciones, la primera es la generación de ROS a nivel intracelular y la segunda es ocasionar una deficiencia en los sistemas de defensa antioxidantes de la célula [49]. El glutatión, un tripéptido no proteico que constituye la principal defensa antioxidante no enzimática en la célula, se encuentra en concentraciones en el rango milimolar dentro de los tejidos [339,340], por tanto, la depleción de éste es un blanco terapéutico estudiado durante varios años por un número significativo de investigadores [341,342]. La L-butionina sulfoximina (BSO) reduce los niveles de glutatión intracelular, ya que inhibe la enzima ligasa glutamato-cisteína, responsable del primer paso en la síntesis de éste [343].

Estudios clínicos y preclínicos relacionados con el desarrollo de agentes para terapia antitumoral han buscado maximizar o sinergizar el efecto de drogas cuyo mecanismo de acción se relaciona con la producción de especies de oxígeno reactivas incorporando BSO como coadyuvante [125,130,344–346].

Con el objetivo de intentar reducir la cantidad de complejo necesaria para ejercer un efecto citotóxico en las células en cultivo, SMTCu y SDQCu se emplearon de manera combinada con BSO 100  $\mu\text{M}$ .

Las células de fenotipo tumoral A549 fueron incubadas durante 24 horas con los complejos SDQCu y SMTCu, solos o en combinación con BSO 100  $\mu\text{M}$ , con el objetivo de evaluar la producción de ROS, a través de citometría de flujo empleando la sonda  $\text{H}_2\text{CDFDA}$ . Los resultados se presentan en la Figura 5.4-8.

Se puede observar que cuando las células fueron tratadas con concentraciones por debajo del valor  $\text{IC}_{50}$  del complejo SDQCu, hubo un incremento significativo de la cantidad de ROS a partir de 0.5  $\mu\text{M}$ , 92 % por encima de los valores basales. El comportamiento en las subsiguientes concentraciones fue incremental, alcanzando valores cercanos al 700 % con respecto al basal. Entre tanto el co-tratamiento con BSO también indujo un aumento relevante en la cantidad de ROS intracelulares, alcanzando concentraciones de hasta 1096 % con respecto a los controles, no obstante, el BSO per se, también ocasionó un aumento significativo de estas especies (784%) en concordancia con lo demostrado previamente por otros investigadores [125,347,348].

Asimismo, la combinación del complejo SDQCu con 100  $\mu\text{M}$  de BSO produjo una disminución significativa del valor de  $\text{IC}_{50}$  obtenido ( $0.96 \pm 0.11 \mu\text{M}$ ) con respecto al efecto que induce solo el complejo (Figura 5.4-9).

El estudio de las células por citometría de flujo con marcación de yoduro de propidio, mostró que la adición de 100  $\mu\text{M}$  de BSO (en combinación con el complejo SDQCu) aumentó de manera significativa la cantidad de células positivas para yoduro (muertas) con respecto a las células tratadas solo con el complejo y los controles (Figura 5.4-10).

El complejo SMTCu también causó un aumento de los niveles de ROS dependiente de la concentración, de manera significativa desde 1.0  $\mu\text{M}$  ( $p < 0.001$ ), incrementando hasta 223 % la cantidad de ROS a nivel intracelular. Sin embargo, es importante destacar que tanto para el complejo SMTCu como para SDQCu, al usar concentraciones altamente

lesivas para las células la intensidad de la fluorescencia disminuyó con respecto a concentraciones inferiores. Este fenómeno puede ser explicado a raíz de que las células al iniciar los procesos de muerte pierden integridad en su membrana celular, por lo tanto, la sonda empleada no puede ser retenida en el citoplasma celular y los niveles de ROS detectados descienden por esta razón.

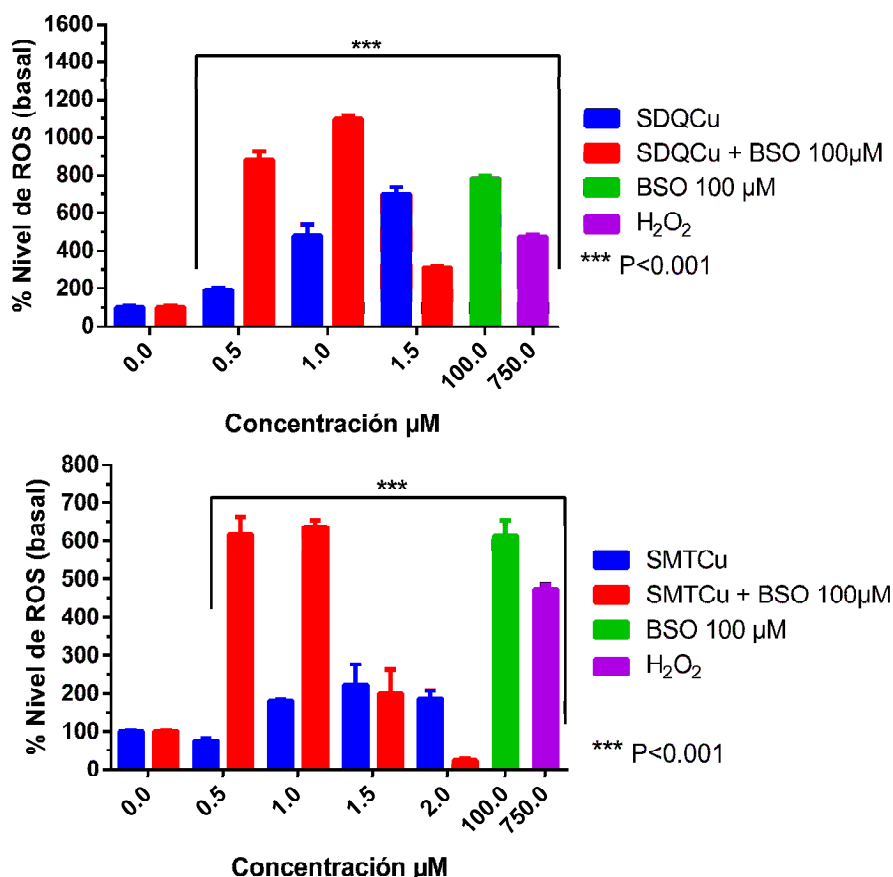


Figura 5.4-8 Efecto de la inducción de especies reactivas de oxígeno (ROS) por los compuestos SDQCu (panel superior), SMTCu (panel inferior) y su combinación con BSO 100 μM en células A549. Se empleó como control positivo 750 μM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Los asteriscos representan una diferencia significativa con respecto al basal (0 μM) con (\*\*\*)  $p < 0.001$ .

Al incubar las células con SMTCu y BSO de forma simultánea, se observó que la cantidad de ROS aumentó de manera significativa desde 0.5 μM (618 %), probablemente asociado al efecto individual del BSO. A 1.0 μM hubo un aumento comparable (636 %) y mayor con respecto al complejo individual, pero equivalente a la cantidad de ROS producida por el BSO solo (614 %). A concentraciones superiores (1.5 y 2.0 μM), donde la cantidad de células muertas aumentó (ver Figura 5.4-9 y Figura 5.4-12) la intensidad de los ROS se vio disminuida por la reducción de la actividad metabólica propia de la muerte celular y la pérdida de integridad celular evitando mantener la sonda fluorescente a nivel intracelular. Por otro lado, la combinación de SMTCu con BSO también redujo la viabilidad de las células tumorales y el valor obtenido de IC<sub>50</sub> en las células A549 ( $0.98 \pm 0.10 \mu\text{M}$ ), con respecto a la exposición con solamente SMTCu.

El compuesto SMTCu demostró inducir la producción intracelular de ROS en menor proporción que su complejo análogo SDQCu.

En la Figura 5.4-10 y la Figura 5.4-12 se presentan las gráficas de dot plot derivadas de los experimentos de citometría de flujo, en los cuales las células se marcaron con H2CDFDA para determinar los ROS y con yoduro de propidio para definir la población de células cuya integridad de membrana ha sido comprometida.

Como se puede ver en la Figura 5.4-10, al emplear de manera combinada los compuestos SDQCu y BSO la cantidad de células muertas marcadas con yoduro de propidio presentan un incremento de 10 % y 25 % en las concentraciones de 1.0 y 1.5  $\mu\text{M}$  al ser comparados con las muestras tratadas únicamente con el complejo.

En la Figura 5.4-12 se muestran los resultados de citometría de flujo de células tratadas con el complejo SMTCu y marcadas con la sonda para ROS (H2CDFDA) y la sonda yoduro de propidio con la cual se determinaron las células muertas. Se encontró que la combinación del complejo a la concentración de 1.5  $\mu\text{M}$  con BSO indujo un aumento cercano al 37 % de células muertas, en comparación con las células tratadas únicamente con el complejo. En general el uso del BSO desplazó la población celular a valores mayores de intensidad de fluorescencia, asociada al yoduro de propidio.

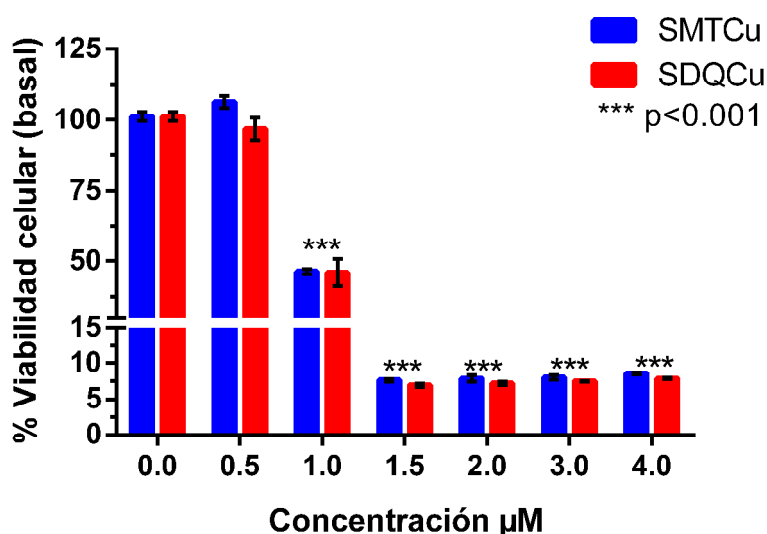


Figura 5.4-9 Efecto de la combinación de los complejos SDQCu, SMTCu y BSO 100  $\mu\text{M}$ , en la viabilidad de células A549 tratadas durante 24 horas. El asterisco representa diferencia significativa con respecto al control,  $p < 0.001$ . Los datos se presentan como la media  $\pm$  SEM con un  $n=9$ .

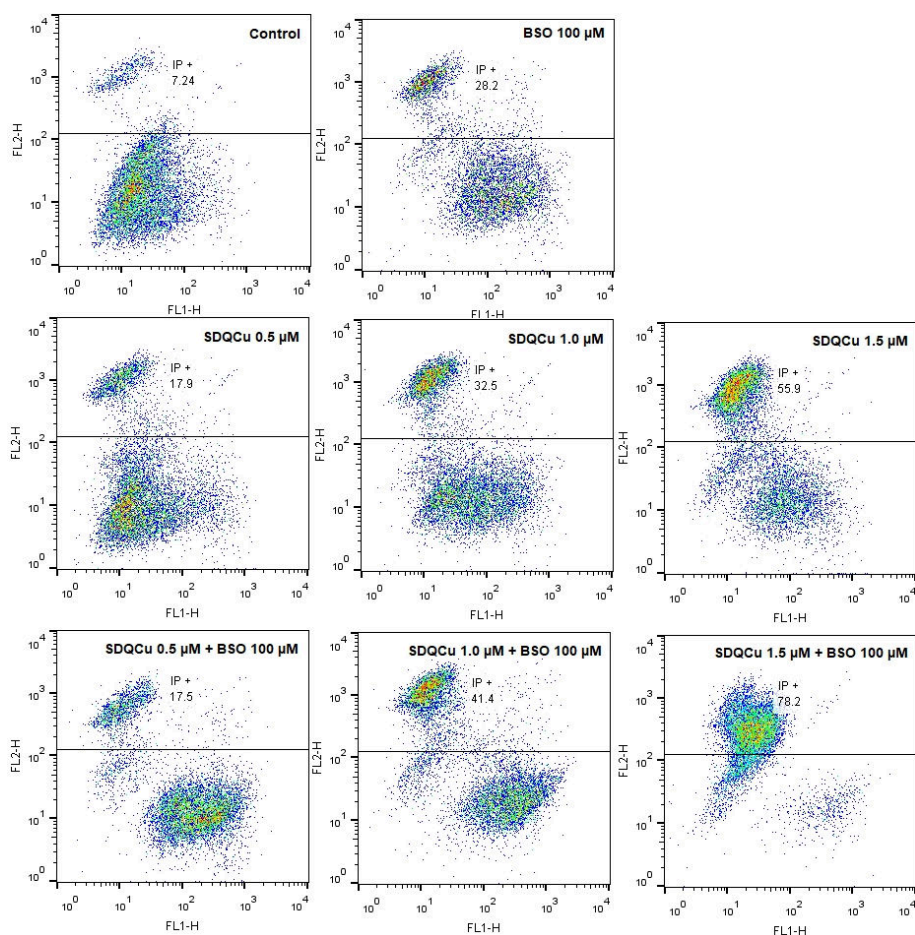


Figura 5.4-10 Gráficas dot plot para células tratadas con SDQCu y SDQCu + BSO en células A549. En el canal FL2 (eje Y) células marcadas positivamente con yoduro de propidio y en el canal FL1 (eje X) células marcadas con H<sub>2</sub>DCFDA.

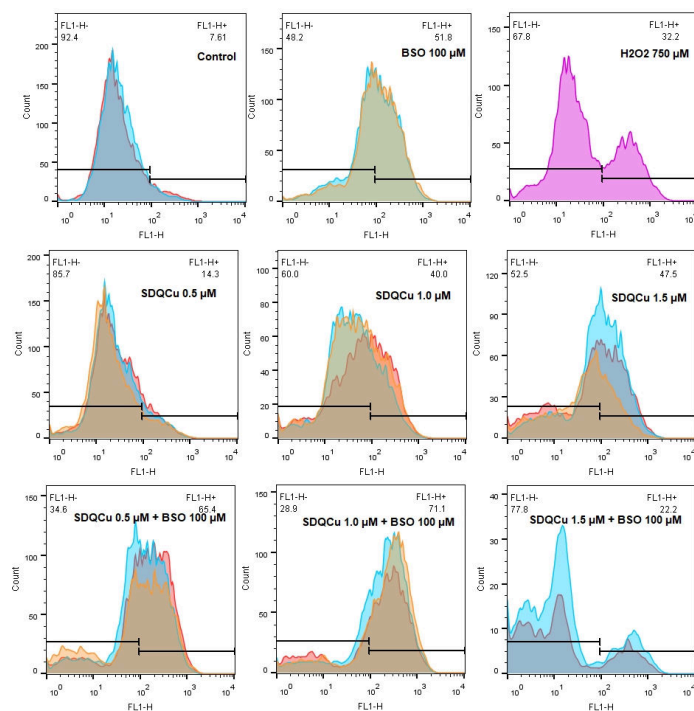


Figura 5.4-11 Histogramas de frecuencia de células viables marcadas con H<sub>2</sub>DCFDA, tratadas con el compuesto SDQCu y su combinación con BSO 100 $\mu$ M



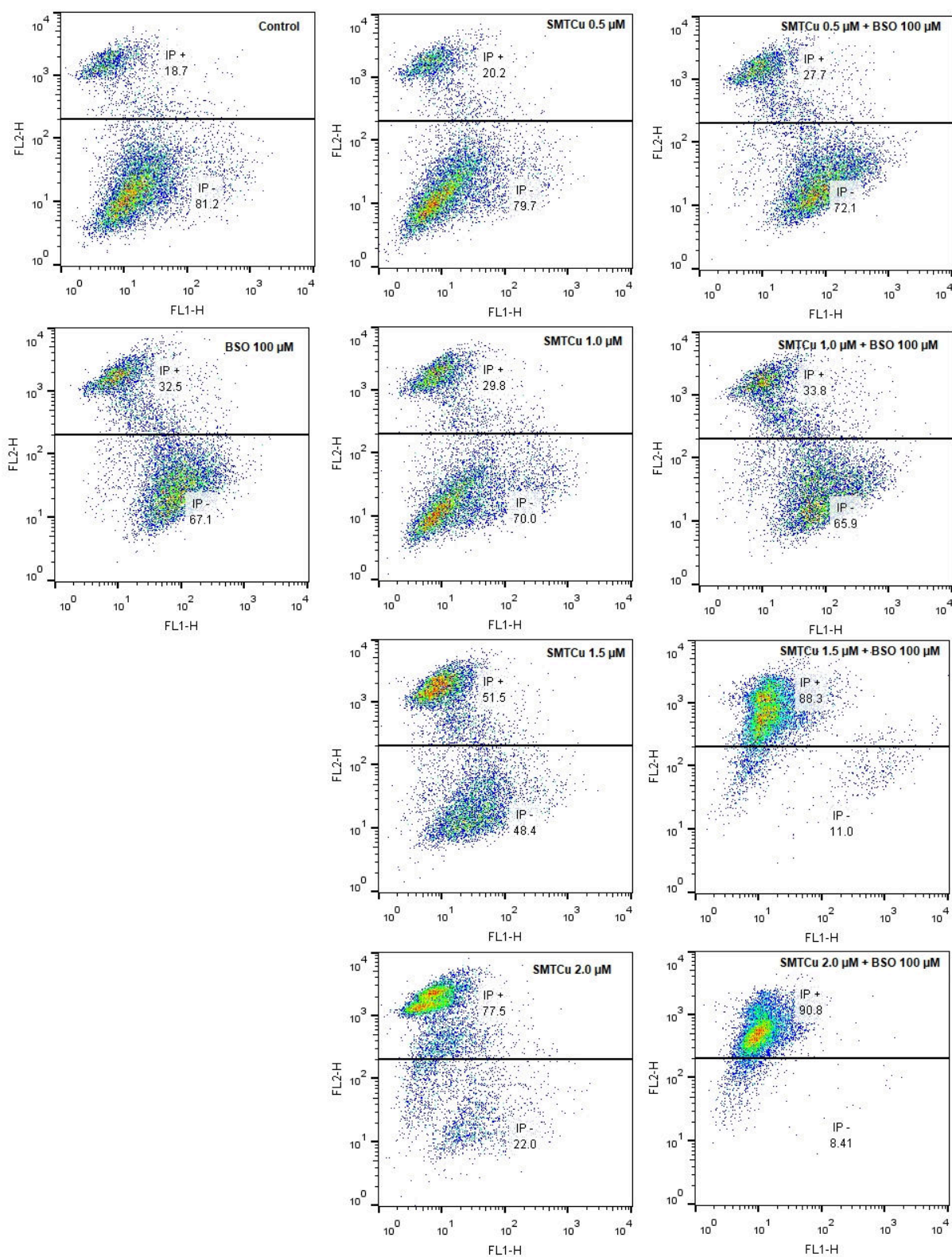


Figura 5.4-12 Gráficas dot plot para células tratadas con SMTCu y SMTCu + BSO en células A549. En el canal FL2 (eje Y) células marcadas positivamente con yoduro de propidio y en el canal FL1 (eje X) células marcadas con H<sub>2</sub>DCFDA.



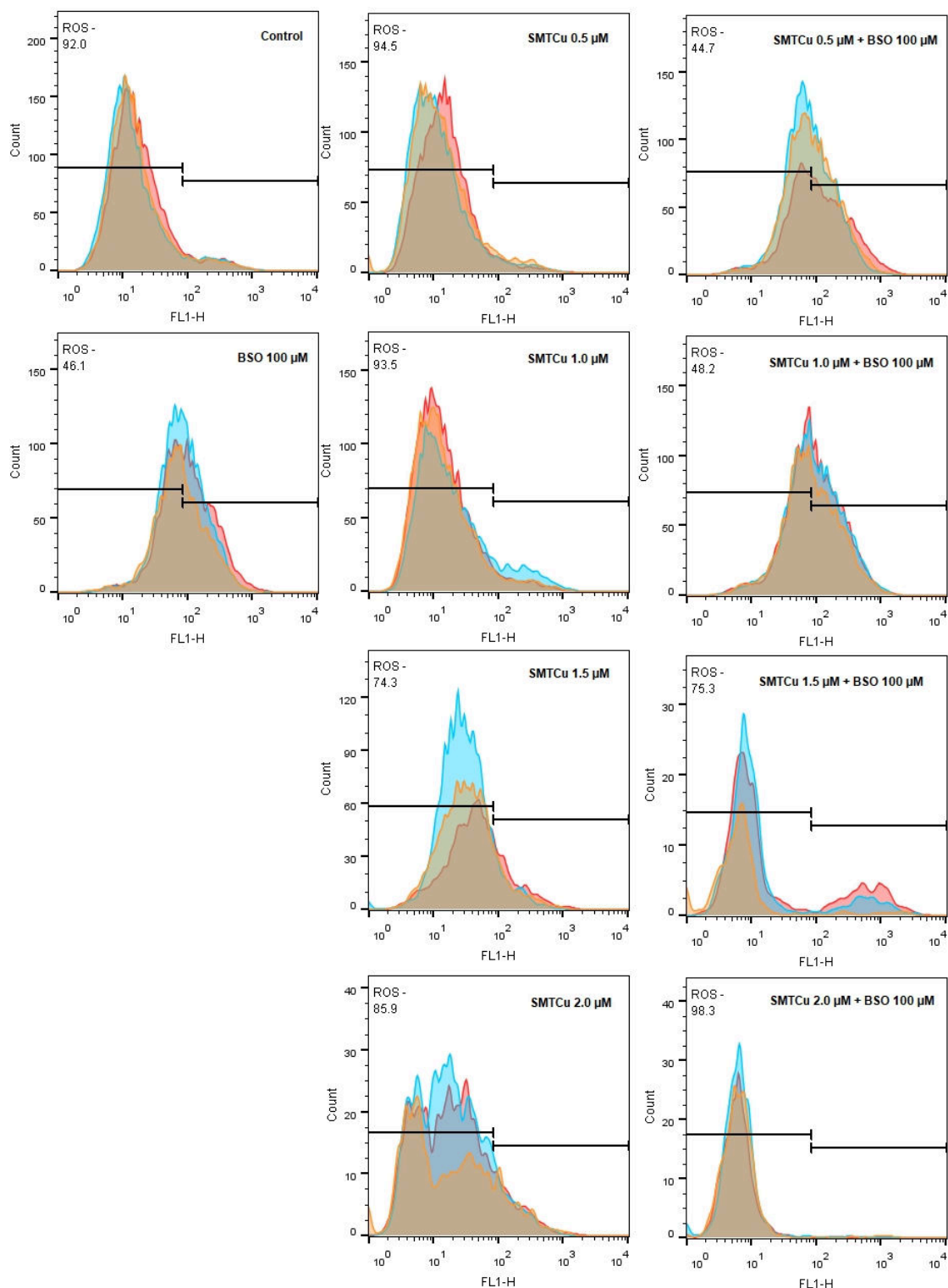


Figura 5.4-13 Histogramas de frecuencia células viables marcadas con  $H_2DCFDA$ , tratadas con el compuesto SMTCu y su combinación con BSO  $100\mu M$ .

Con el fin de comprobar que los altos niveles de ROS inducidos por SDQCu y SMTCu en las células A549 son los responsables del rol deletéreo sobre la viabilidad celular, se realizó un experimento en el cual las células A549 fueron incubadas simultáneamente

con los complejos y 50  $\mu\text{M}$  de vitaminas C y E, conocidas por su capacidad antioxidante, para posteriormente determinar si hubo una recuperación de la viabilidad celular.

Los resultados presentados en la Figura 5.4-14 demostraron que, para el complejo SMTCu la viabilidad de las células se recuperó en promedio 10% en las concentraciones de 2.0, 3.0 y 4.0  $\mu\text{M}$  al incluir las vitaminas. Para el complejo SDQCu, en la concentración de 2.0  $\mu\text{M}$  la viabilidad se recuperó 22%, a 3.0  $\mu\text{M}$  10.4% y finalmente a 4.0  $\mu\text{M}$  6.9%. La recuperación de la viabilidad puede ser asociada a la neutralización de los ROS por parte de las vitaminas [349,350]. Lo que podría explicar parcialmente el mecanismo de muerte que ejercen los complejos SMTCu y SDQCu. En la Tabla 5.4-1 se resumen los valores de IC<sub>50</sub> obtenidos al tratar las células con los complejos solos y en combinación con vitaminas C y E.

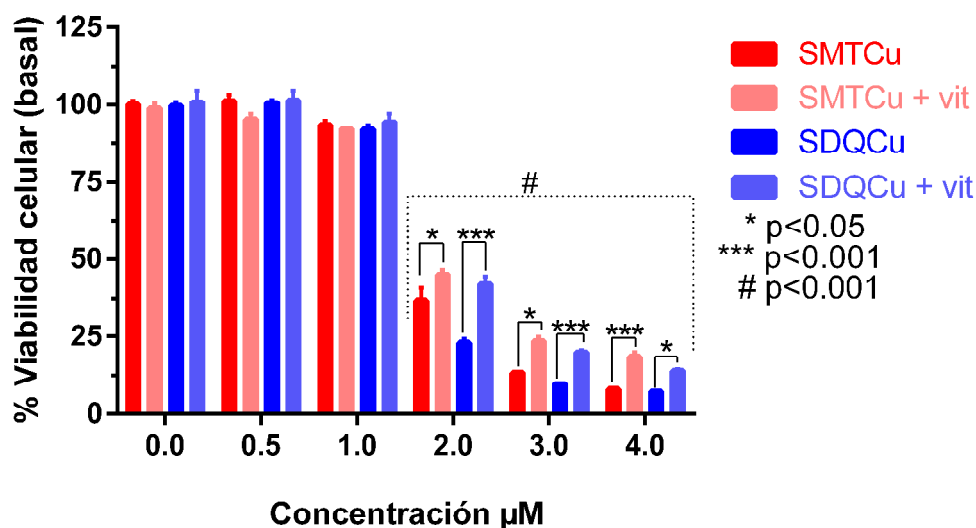


Figura 5.4-14 Efecto de los complejos SDQCu y SMTCu sobre la viabilidad de células A549 al ser combinados con scavengers generales de especies de oxígeno reactivas como las vitaminas C y E. Los asteriscos representan una diferencia significativa de las células expuestas a los complejos con y sin vitaminas (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.001$ ). El símbolo numeral representa diferencia con respecto a los controles basales (0  $\mu\text{M}$ ) con valores de  $p$  menores que 0.001. Los datos se presentan como la media  $\pm$  SEM con un  $n=12$ .

Tabla 5.4-1 Valores de IC<sub>50</sub> calculados para las células A549 tratadas con los complejos SDQCu, SMTCu solos y en combinación con las vitaminas C y E durante 24 horas. Los datos se presentan como la media  $\pm$  la desviación estándar

	SMTCu + Vit.	SDQCu + Vit.	SMTCu	SDQCu
IC <sub>50</sub>	1.962 $\pm$ 0.216	1.919 $\pm$ 0.227	1.790 $\pm$ 0.173	1.593 $\pm$ 0.137

#### 5.4.5. Estudios de la relación GSH/GSSG en células A549

Como se presenta en la Figura 5.4-15, se determinó la producción de estrés oxidativo, evaluando la relación glutatión reducido y glutatión oxidado (GSH/GSSG). Se encontró que ambos complejos SMTCu y SDQCu indujeron un desgaste en la cantidad de glutatión reducido a nivel intracelular desde 1.5  $\mu\text{M}$  de una manera dependiente de la concentración, que correlaciona con el incremento de especies de oxígeno reactivas descrito en el apartado 5.4.4. Complejos como la auronofina y las casiopéinas inducen muerte celular actuando de este mismo modo, a través del incremento de ROS y la depleción de las reservas de GSH [351,352].

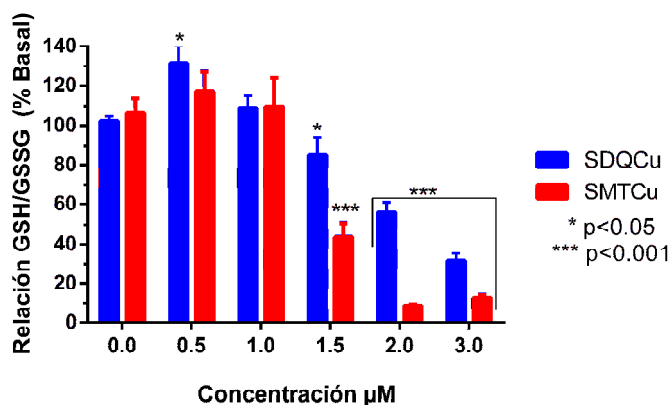


Figura 5.4-15 Determinación de la relación GSH/GSSG en células tratadas con los compuestos SMTCu y SDQCu. Los asteriscos representan diferencia significativa con respecto a los controles basales (0  $\mu\text{M}$ ) \* $p < 0.05$  y \*\*\*  $p < 0.001$ . Los datos se presentan como la media  $\pm$  SEM con un  $n = 12$ .

#### 5.4.6. Determinación del potencial estándar ( $E_{hc}$ ) de reducción de la dupla glutatión oxidado y reducido

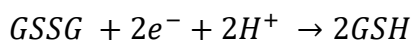
El valor  $E_{hc}$  proporciona una expresión cuantitativa de la tendencia de una pareja redox a aceptar o donar electrones. El potencial de reducción redox tiol-tioldisulfuro a nivel intracelular ha demostrado ser una característica importante en el crecimiento celular y puede actuar en el control de procesos celulares fundamentales, incluido el control de la expresión génica, la proliferación celular y la ejecución de la apoptosis [285,353].

se determinó a través de la ecuación de Nernst considerando un pH de 7.0 y una temperatura de 25°C (Ecuación 5.4-1).

$$E_{hc} = -240 \text{ mV} - \frac{59.1}{2} \times \text{Log} \frac{[\text{GSH}]^2}{[\text{GSSG}]}$$

Ecuación 5.4-1 Determinación del potencial estándar de reducción de la dupla GSH/GSSG.

Cabe aclarar que, en el caso de este experimento, se debe plantear la reacción en el sentido de la reducción del glutatión con el fin de poder aplicar el concepto de potencial de reducción.



*Ecuación 5.4-2 Ecuación de reducción del glutatión.*

La determinación del potencial de reducción de esta reacción permite establecer, de una manera general, el estado redox de un sistema biológico [354]. La concentración de glutatión reducido y oxidado se determinaron en lisados celulares como se ha descrito en la sección 4.8.2 y la intensidad de fluorescencia de cada muestra ha sido interpolada en una curva de calibración obtenida para ambos analitos. Las células A549 fueron cultivadas y tratadas durante 24 horas con los complejos SMTCu y SDQCu, solos o en combinación con BSO (100  $\mu$ M). Los resultados de esta experiencia son presentados en la Tabla 5.4-2.

De los resultados se puede observar que ambos complejos inducen una alteración en el potencial de reducción GSSG/GSH a partir de la concentración 1.0  $\mu$ M de SMTCu y de 1.5  $\mu$ M de SDQCu, llegando a potenciales de -214 mV en la máxima concentración. En ambos casos se presenta un efecto dependiente de la concentración ( $p < 0.01$ ). Cuando las células fueron expuestas a la combinación de los complejos de cobre y 100  $\mu$ M de BSO, se observó que el potencial de reducción, a la mayor concentración, aumenta a valores de -186.5 mV y -197.2 mV para SDQCu y SMTCu respectivamente. Es importante mencionar que el BSO per se también induce un aumento en el potencial de reducción en las células (-210.0 mV), sin embargo, el aumento del potencial al combinar SDQCu (1.0  $\mu$ M) y el BSO presenta una diferencia significativa con respecto al BSO solo ( $p < 0.001$ ), dicha diferencia también se vio para la combinación SMTCu + BSO en las concentraciones de 1.0 y 1.5  $\mu$ M. En la Figura 5.4-16 se presentan de manera gráfica los resultados de este ensayo.

*Tabla 5.4-2 Valores de potencial de reducción de la dupla GSSG/GSH en células A549 después de ser tratadas con los compuestos SDQCu, SMTCu y su combinación BSO 100 $\mu$ M. El asterisco representa una diferencia significativa con respecto a los controles ( $p < 0.001$ ).*

Compuesto	Ehc (GSSG/ GSH <sup>2</sup> ) (mV $\pm$ desviación estándar)				
	0 $\mu$ M	0.5 $\mu$ M	1.0 $\mu$ M	1.5 $\mu$ M	100 $\mu$ M
Basal	-232.4 $\pm$ 2.5				
SDQCu		-235.1 $\pm$ 1.2	-228.0 $\pm$ 3.6	-214.0 $\pm$ 1.7*	
SDQCu + BSO 100 $\mu$ M		-209.9 $\pm$ 2.9*	-208.2 $\pm$ 1.9*	-186.5 $\pm$ 2.1*	
SMTCu		-232.4 $\pm$ 1.2	-225.8 $\pm$ 1.2*	-213.8 $\pm$ 0.4*	
SMTCu + BSO 100 $\mu$ M		-213.7 $\pm$ 5.0*	-200.6 $\pm$ 0.7*	-197.2 $\pm$ 0.7*	
BSO					-210.0 $\pm$ 1.5*

Como concepto general se considera que el bienestar celular aumentará mientras más negativo (menor) sea el valor del potencial de reducción GSSG/GSH, por tanto, el aumento de este valor señalará una alteración en el metabolismo y en el balance redox intracelular. Cuando este valor es cercano a -170 mV se ha señalado como indicador de que la célula está bajo un proceso apoptótico asociado a eventos oxidativos [354,355].

Los resultados obtenidos en este experimento tienen una relación con lo observado en las pruebas de viabilidad celular en las cuales se pudo observar que bajas concentraciones (0.5 y 1.0  $\mu\text{M}$ ) de los complejos SMTCu y SDQCu no causaron efectos dañinos en las células A549 (Figura 5.4-5), mientras que a concentraciones superiores, la población de células viables disminuyó de forma significativa. De igual manera, se encontró que al combinar los complejos de cobre con el inhibidor de la síntesis de GSH, la viabilidad de las células A549 se vio afectada a partir de 1.0  $\mu\text{M}$  (ver Figura 5.4-9).

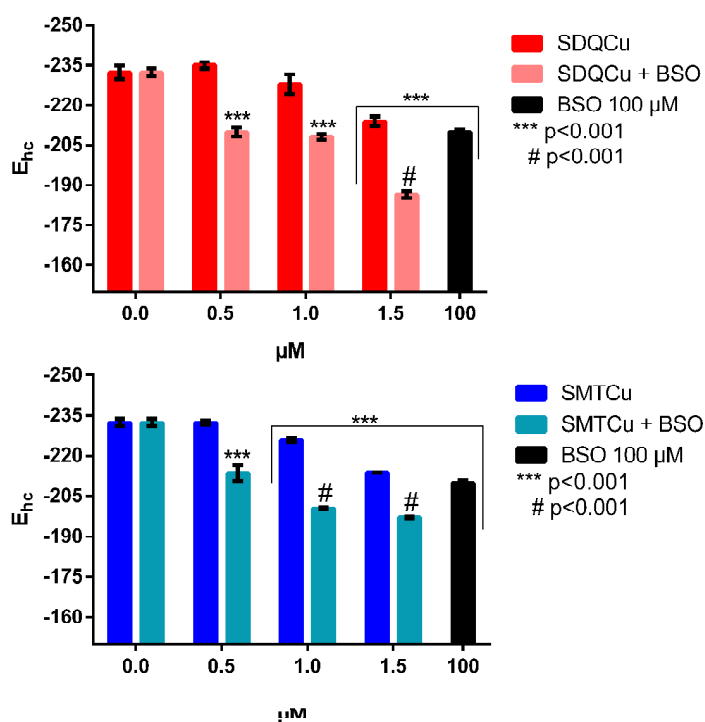


Figura 5.4-16 Potencial de reducción de la dupla GSSG/GSH<sup>2</sup> en células A549 tratadas con los compuestos SMTCu, SDQCu y su combinación con BSO 100 $\mu\text{M}$ . El asterisco representa una diferencia significativa con respecto a los controles basales (0  $\mu\text{M}$ ) con valores de  $p$  menores que 0.001, el símbolo numeral (#) representa una diferencia entre la combinación complejo + BSO y el BSO sólo ( $p < 0.001$ ). Los datos se presentan como la media  $\pm$  la desviación estándar.

Si bien ambos complejos alteran la relación de GSH/GSSG e incrementan el potencial de reducción, cuando se agrega BSO, solo SDQCu genera algún tipo de estrés oxidativo que no puede ser contrarrestado con la síntesis de GSH (ver niveles de ROS, Figura 5.4-8)

#### 5.4.7. Efectos genotóxicos de los complejos SMTCu y SDQCu

Como se ha discutido en secciones anteriores uno de los blancos terapéuticos de los complejos de cobre es su interacción directa o indirecta con el ADN [287,356]. El ensayo de electroforesis de una única célula (ensayo cometa) para determinar quiebres dobles y simples en las hebras de ADN fue realizado sobre células A549 tratadas con los complejos SMTCu y SDQCu durante 24 horas, los resultados se presentan en la Figura 5.4-17.

El complejo SMTCu indujo quiebres en las hebras de ADN a las concentraciones de 1.0 y 1.5  $\mu\text{M}$ ; los valores obtenidos del tail moment con el complejo son similares a los obtenidos con el control positivo de bleomicina (8.4). Dado el aumento de las especies de oxígeno reactivas, la depleción del glutatión y la disminución del potencial de reducción asociado a la cupla (GSSG/GSH<sub>2</sub>), se decidió evaluar si el ADN fue dañado a causa de este entorno prooxidante, para lo cual los portaobjetos con las células fueron incubados con la enzima EndoIII, una endonucleasa que causa cortes en el ADN en presencia de bases pirimidínicas oxidadas [321]. Como se puede ver en la Figura 5.4-17, el complejo SMTCu causó una oxidación en el ADN de una manera dependiente de la concentración a todas las concentraciones estudiadas.

El complejo SDQCu también fue estudiado y se pudo determinar que el complejo indujo quiebres en el ADN de manera significativa a concentración de 1.5  $\mu\text{M}$ , por otro lado, mediante la incubación con la endonucleasa se encontró un aumento significativo de los cortes en el ADN en todo el rango de concentración, este incremento se dio de una manera dependiente de la concentración.

Los resultados obtenidos en esta experiencia están de acuerdo con los reportados en la literatura. Donde se señala que los complejos de cobre (II) con fenantrolina, pirimidina y otros ligandos heterocíclicos de tipo aromático tienen la capacidad de inducir clivaje de los ácidos nucleicos [357–359]. También se puede establecer que el incremento de los ROS intracelulares y la depleción de GSH causado por los complejos SMTCu y SDQCu produjo daños oxidativos en el ADN (ver sección 5.4.4 y la Figura 5.4-8).

Ha sido ampliamente discutido por varios autores que el aumento de los ROS produce daños en el ADN nuclear y mitocondrial, los cuales desencadenan en procesos de muerte celular [360–362].

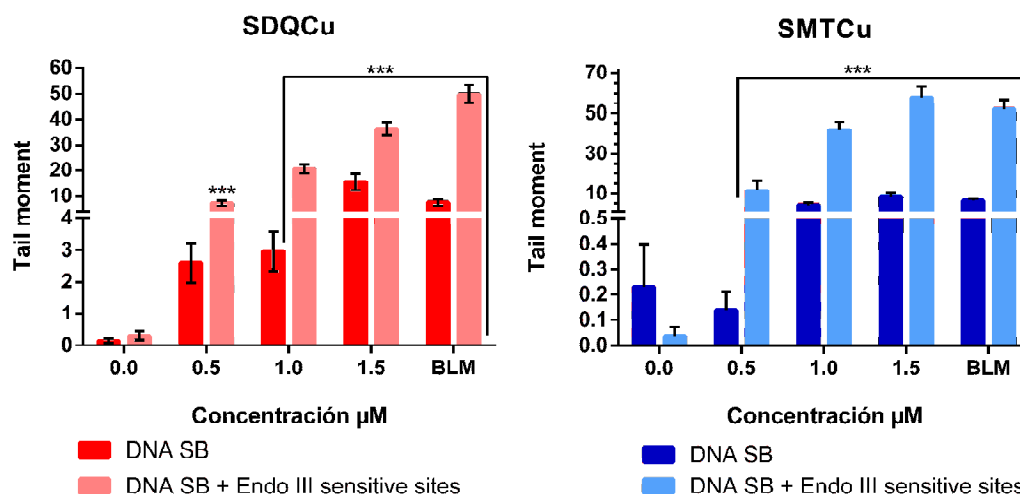


Figura 5.4-17 Resultados del ensayo cometa en células A549, tratadas con los compuestos SMTCu y SDQCu durante 24 horas. Los asteriscos (\*\*\*) representan una diferencia significativa de las células tratadas respecto a los controles basales (0 μM) ( $p < 0.001$ ).

#### 5.4.8. Determinación de caspasa 3 activa

La familia de las caspasas está conformada por más de una docena de enzimas de tipo proteasa, las cuales son los últimos efectores o ejecutores de la muerte celular programada, desencadenando los eventos asociados a la apoptosis [363]. La caspasa 3 es una proteína de tipo efectora que se activa al final de la cascada de señalización de apoptosis, tanto intrínseca como extrínseca. Dado el rol señalizador de esta enzima, se decidió determinar si los complejos SDQCu y SMTCu solos y en combinación con BSO tienen un efecto proapoptótico en las células A549.

Dado que esta enzima actúa al final de la ruta de señalización apoptótica, las células fueron tratadas con los complejos SDQCu y SMTCu durante 12 horas, con el fin de observar los cambios en la activación de esta caspasa antes de que ocurra la muerte celular.

Como se puede ver en la Figura 5.4-18, ambos complejos causaron un incremento significativo en la activación de la caspasa, SMTCu indujo un aumento dependiente de la concentración a las concentraciones de 1.0 y 1.5 μM, duplicando y cuadruplicando los valores basales de la enzima. Al combinar el complejo SMTCu con BSO, se encontró que ambas sustancias indujeron un aumento de la activación en todo el rango de concentraciones utilizado. Sin embargo, sólo se observó dependencia directa con la concentración de complejo a 1.0 y 1.5 μM. También se determinó que el BSO por se induce activación de la caspasa, no obstante, se encontró que el efecto en la activación de la caspasa aumenta de manera significativa ( $p < 0.05$ ) cuando las células son tratadas con el BSO y SMTCu a 0.5 y 1.0 μM.

La aparente disminución en la activación de caspasa 3 al tratar las células con el complejo SMTCu + BSO a la concentración de 1.5 μM, podría ser explicado por la inducción de

muerte celular ya que, al morir la célula, la actividad caspasa se ve reducida, pues la enzima en el caso de cultivos celulares es liberada y/o inactivada.

El complejo SDQCu también causó un incremento en la activación de caspasa 3 con respecto al nivel basal de una manera dependiente de la concentración a partir de 1.0  $\mu\text{M}$ . Los aumentos corresponden a 2.0 y 2.6 veces los valores basales de activación. La combinación SDQCu con BSO no mostró diferencia significativa con respecto a las células tratadas únicamente con el complejo y solo se pudo observar diferencia entre la activación de caspasa por el BSO y la mezcla SDQCu + BSO a la concentración de 1.5  $\mu\text{M}$ .

La activación de la caspasa 3 señala que ambos complejos, SMTCu y SDQCu, inducen al menos parcialmente, sus efectos deletéreos en las células A549 a través de apoptosis, lo cual se correlaciona con los resultados previamente obtenidos para distintos complejos de cobre los cuales demostraron inducir apoptosis en líneas celulares tumorales, como HT-29, SK-OV-3, BEL-7404, HeLa, Hep-G2 y MGC80-3, a través del incremento de ROS intracelulares, clivaje del ADN y activación de caspasas 3, 7 y 9 [130,364,365].

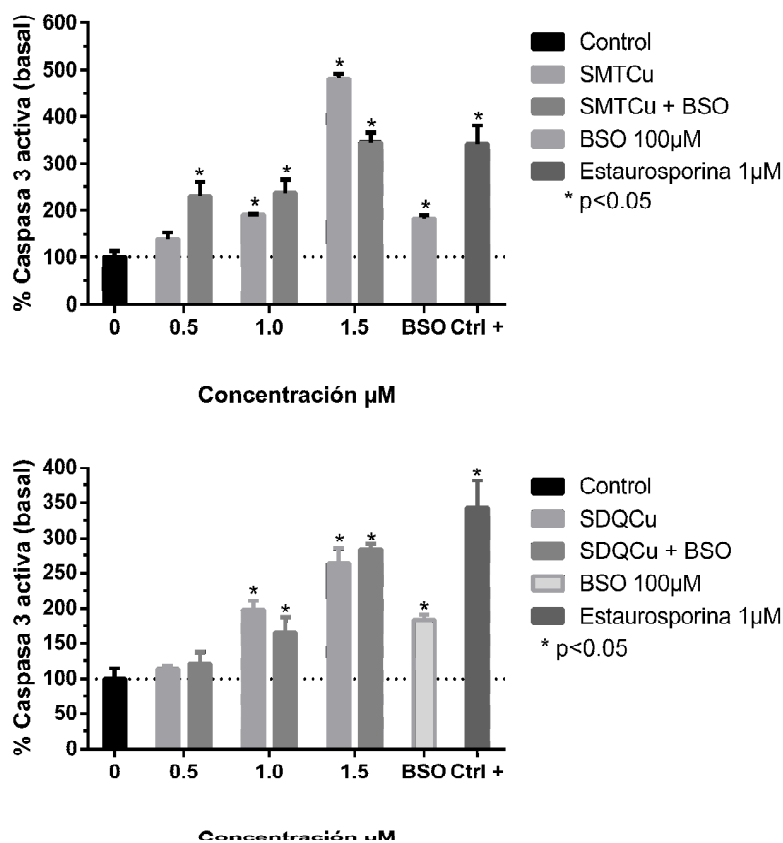


Figura 5.4-18 Estudio de la activación de la caspasa 3 en células A549 después de 12 horas de incubación. El símbolo asterisco representa diferencias significativas con respecto a los controles (0  $\mu\text{M}$ ), \* $p < 0.05$ . Los datos se presentan como la media  $\pm$  SEM con  $n=9$ .

#### 5.4.9. Inducción de apoptosis y alteraciones en el ciclo celular

Las células tumorales A549 fueron tratadas con los complejos SDQCu y SMTCu solos y en combinación con BSO durante 24 horas. Con el objetivo de determinar si estos compuestos inducen sus efectos deletéreos a través de procesos apoptóticos, se



determinaron la externalización de la fosfatidilserina y la pérdida de la integridad celular en la membrana celular, usando anexina V conjugada con el fluorocromo FITC y yoduro de propidio, respectivamente.

Los resultados para el complejo SDQCu se presentan en la Figura 5.4-19(A), en la que puede observarse que el complejo indujo apoptosis en las células A549 tratadas con concentraciones de 1.0  $\mu\text{M}$  (11.6%) y 1.5  $\mu\text{M}$  (20.3%) de una manera dependiente de la concentración. Al combinar SDQCu y BSO (100  $\mu\text{M}$ ) se encontró que la población apoptótica aumento de manera significativa, con respecto a los controles y al complejo de manera individual (Figura 5.4-19(B)), sin embargo, se encontró diferencia estadísticamente significativa entre el efecto de la mezcla de SDQCu + BSO solamente a la concentración de 1.5  $\mu\text{M}$ , ya que en las concentraciones inferiores la cantidad de células apoptóticas fue equivalente al inducido por el BSO solo.

Tanto el complejo SDQCu y su combinación con BSO no ocasionaron aumento en la cantidad de células necróticas con respecto al control.

En la Figura 5.4-20 se presentan las gráficas dot plot de las células analizadas a través de citometría de flujo: en el eje X (canal FL1) se representa la intensidad de fluorescencia asociado a la anexina unida a la fosfatidilserina y conjugada con FITC; mientras que el eje Y (canal FL2) corresponde a la intensidad de fluorescencia del yoduro de propidio unido al ADN.

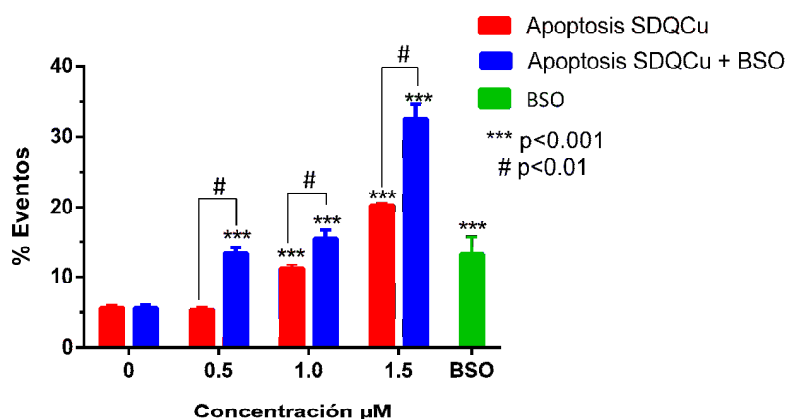


Figura 5.4-19 Determinación de apoptosis por medio de tinción con Anexina V-FITC y Yoduro de propidio en células A549 tratadas con (A) complejo SDQCu (B) Complejo SDQCu + BSO 100  $\mu\text{M}$  durante 24 horas. Los asteriscos (\*\*\*) representan diferencia significativa con respecto al control,  $p < 0.001$ .

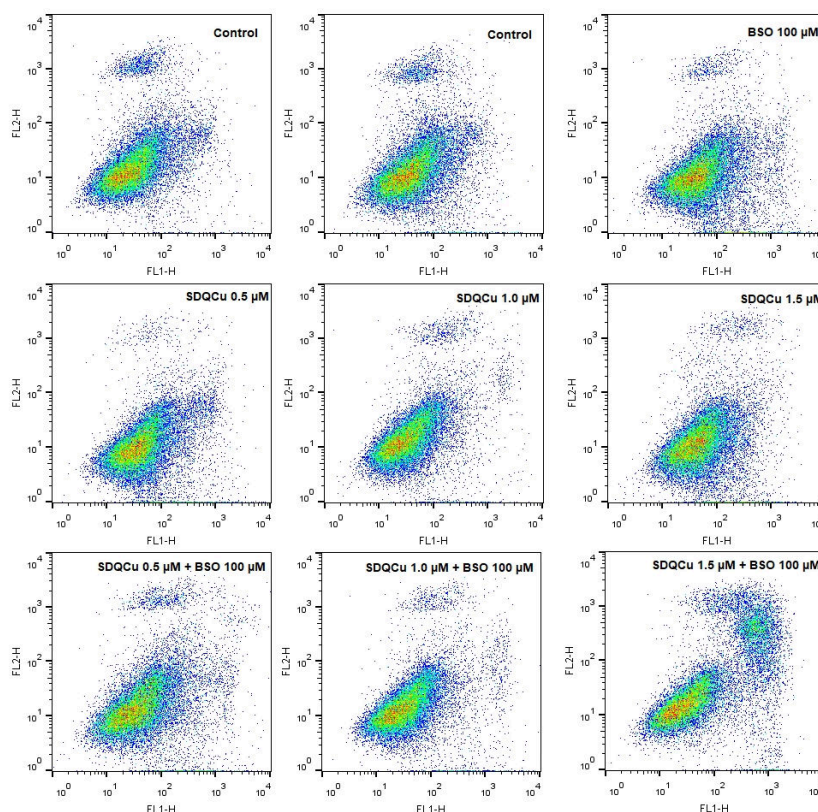


Figura 5.4-20 Diagrama Dot Plot del análisis por citometría de flujo de las células A549 tratadas durante 24 horas con SDQCu solo y en combinación con BSO. El eje x (FL1) corresponde a la marcación con anexina V-FITC y en el eje Y (FL2) se relaciona la población celular marcada con yoduro de propidio.

El análisis de inducción de apoptosis para el complejo SMTCu se presenta en la Figura 5.4-21. Se observó que el complejo ocasionó un aumento en el porcentaje de células apoptóticas a las concentraciones de 1.0 y 1.5  $\mu\text{M}$  (12.2 % y 14.1%). La combinación SMTCu + BSO también aumentó la población apoptótica de células A549 a las concentraciones de 1.0 y 1.5  $\mu\text{M}$  (25% y 67%), es decir que el efecto proapoptótico fue dependiente de la concentración. Cabe destacar que para esta combinación se obtuvo una diferencia significativa con respecto al efecto del BSO individual.

Los diagramas dot plot para este complejo se presentan en la Figura 5.4-22.

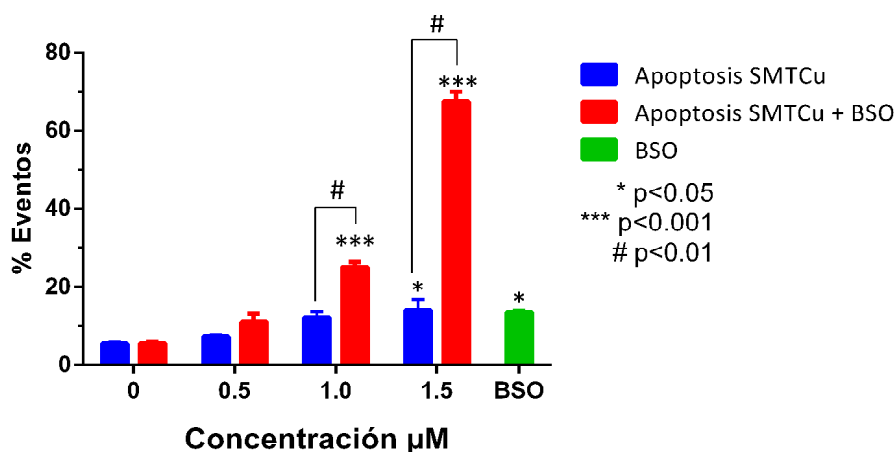


Figura 5.4-21 Determinación de apoptosis por medio de tinción con Anexina V-FITC y Yoduro de propidio en células A549 tratadas con complejo SMTCu solo y en combinación con BSO 100 μM durante 24 horas. Los asteriscos representan diferencia significativa con respecto al control basal (0 μM), \* p<0.05 y \*\* p<0.001.

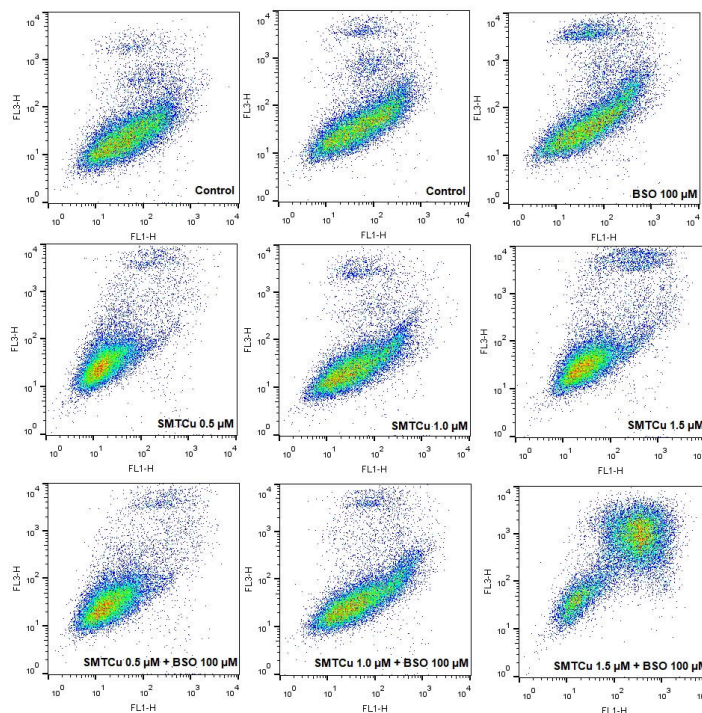


Figura 5.4-22 Diagrama Dot Plot del análisis por citometría de flujo de las células A549 tratadas durante 24 horas con SMTCu solo y en combinación con BSO. El eje x (FL1) corresponde a la marcación con anexina V-FITC y en el eje Y (FL2) se relaciona la población celular marcada con yoduro de propidio.

#### 5.4.9.1. Alteraciones del ciclo celular en células A549

Las células A549 fueron tratadas durante 24 horas con diferentes concentraciones de los complejos SMTCu y SDQCu y posteriormente su contenido relativo de ADN fue determinado a través de citometría de flujo, usando la sonda yoduro de propidio. Los resultados de estos experimentos se presentan a continuación.

En la Figura 5.4-23, se presenta la distribución de las células A549 en las diferentes etapas del ciclo celular en función del contenido de ADN luego de ser tratadas con el compuesto **SMTCu**. Se pudo observar que el complejo a las concentraciones de 1.0 y 1.5  $\mu\text{M}$  ocasionó un arresto del ciclo celular en la fase G2/M a expensas de la población G1, la cual disminuyó de forma dependiente de la concentración en todo el rango estudiado, mientras que las células en fase S no se vieron afectadas ni tampoco se encontró una población sub-G1 significativa.

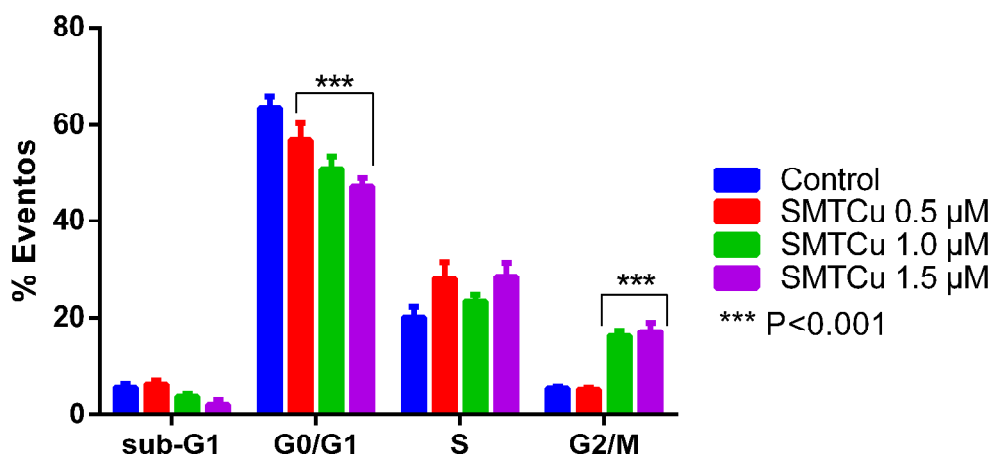


Figura 5.4-23 Distribución de las células A549 en función de la cantidad de ADN dentro de las etapas del ciclo celular al ser tratadas con el complejo SMTCu durante 24 horas. Los asteriscos (\*\*\*) representan una diferencia significativa con respecto a los controles basales (0  $\mu\text{M}$ ) con valores de  $p < 0.001$ . Los datos se presentan como la media  $\pm$  SEM con un  $n=9$ .

El efecto del complejo **SDQCu** en el ciclo celular también fue estudiado, se encontró que este complejo ocasionó una acumulación de la población celular en la fase G2/M del ciclo solo a la concentración de 1.5  $\mu\text{M}$ , de igual manera se encontró que las células en fase G1 disminuyeron con respecto al control de manera significativa ( $p < 0.001$ ). Los resultados de este experimento se presentan en la Figura 5.4-24.

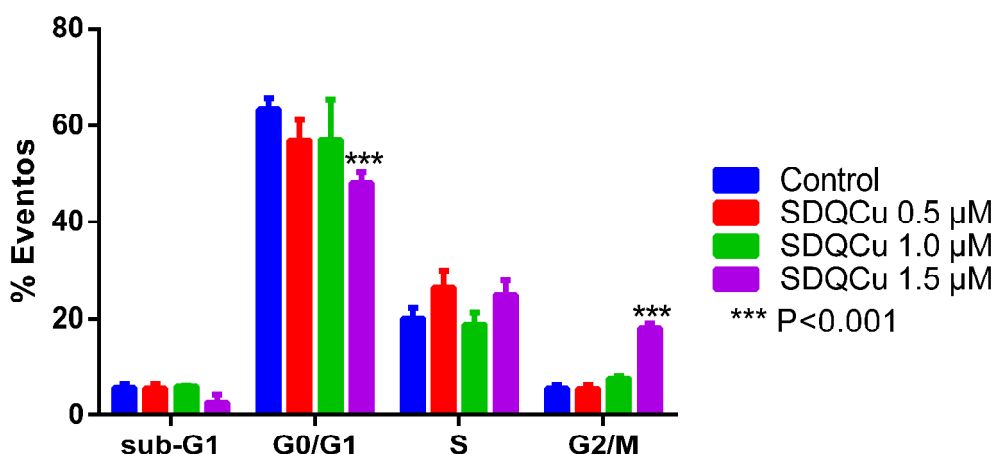


Figura 5.4-24 Distribución de las células A549 en función de la cantidad de ADN dentro de las etapas del ciclo celular al ser tratadas con el complejo SDQCu durante 24 horas. Los asteriscos (\*\*\*) representan una diferencia significativa con respecto a los controles basales (0  $\mu\text{M}$ ) con valores de  $p < 0.001$ . Los datos se presentan como la media  $\pm$  SEM con un  $n=9$ .

El arresto del ciclo celular en la fase G2/M se encuentra asociado a la alteración del ADN debido a cortes dobles y simples, los cuales impiden la progresión de la división celular. Estos resultados son consistentes con los efectos demostrados a través del ensayo cometa (Figura 5.4-17), en el cual se demostró que ambos complejos inducen quiebres en el ADN vinculados a la oxidación de las bases nitrogenadas. Complejos de cobre (II) [374], trióxido de arsénico [375] y otros compuestos inductores de ROS intracelulares [349] mostraron este tipo de comportamientos.

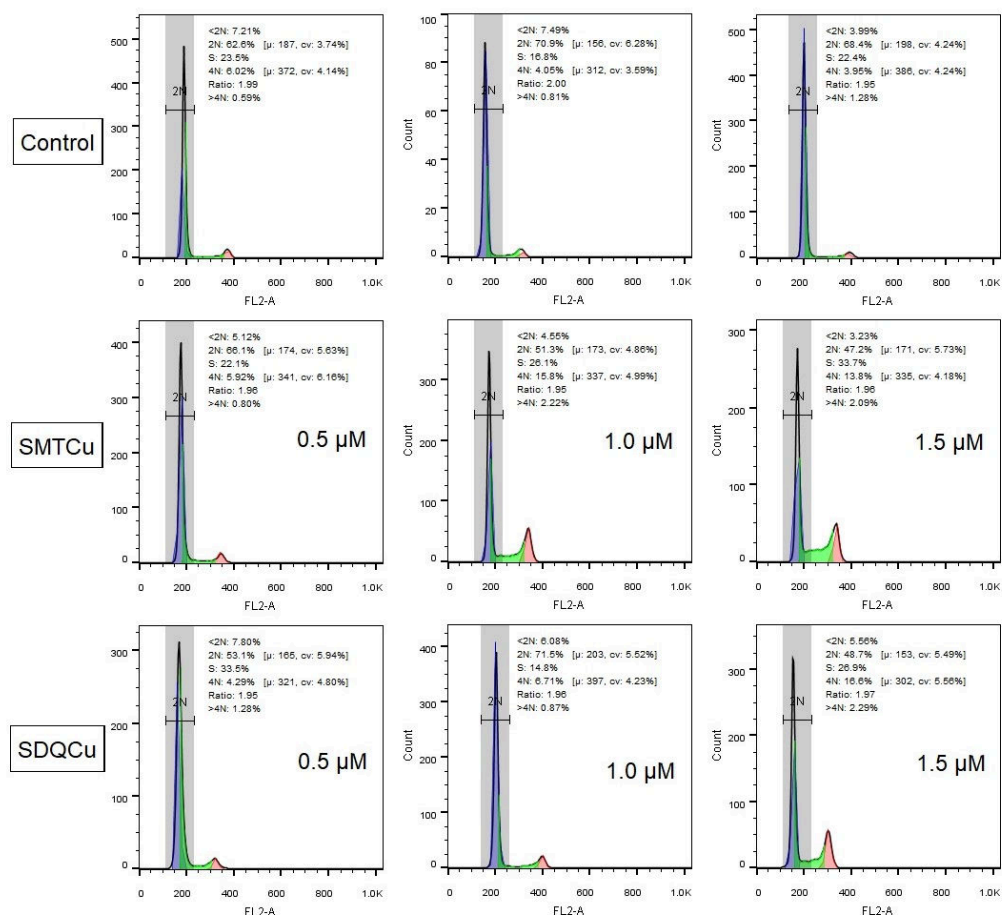


Figura 5.4-25 Histogramas de frecuencia de los análisis de ciclo celular para los complejos SMTCu y SDQCu.

#### 5.4.10. Efecto de la combinación de la radiación y los complejos SMTCu y SDQCu en la proliferación celular

Con el objetivo de encontrar un efecto sinérgico entre el uso de la terapia radiante y los complejos de coordinación SMTCu y SDQCu (maximizar el efecto y/o reducir las dosis o concentraciones efectivas de los tratamientos). Se realizaron experimentos de la siguiente manera: las células fueron expuestas primero a concentraciones de los complejos de 0.5, 1.0 y 1.5  $\mu\text{M}$  durante 18 horas y luego irradiadas con dosis de 0, 2, 6 y 12 Grey (Gy). Finalmente se realizó el ensayo clonogénico para determinar efectos en la proliferación celular a largo plazo y se cuantificó la fracción sobreviviente de células en función de las colonias formadas.

Los resultados experimentales se presentan en la Figura 5.4-26. En experiencias preliminares se observó que la proliferación y viabilidad de las células A549 irradiadas con 12 Gy fue reducida totalmente y no se observó formación de colonias.

El complejo **SMTCu** (Figura 5.4-26, panel superior, barras de color azul) ocasionó una reducción significativa en la proliferación de las células A549 a las concentraciones de 0.5, 1.0 y 1.5  $\mu\text{M}$ , con una dependencia de la concentración entre 1.0 y 1.5  $\mu\text{M}$  ( $p < 0.05$ ).

Al combinar **SMTCu** con una dosis de radiación de 2 Gy (barras de color rojo) se encontró que la radiación de manera individual redujo significativamente la proliferación con respecto a las células no irradiadas (40%) y solo se encontró un efecto diferencial entre la radiación y la combinación de ésta con **SMTCu** a la concentración de 1.5  $\mu\text{M}$  ( $p < 0.05$ ) la cual disminuyó la proliferación 25% menos que la radiación de manera individual, sin embargo, no se halló diferencia estadística significativa entre el efecto en las células tratadas únicamente con el complejo y las expuestas a **SMTCu** (1.5  $\mu\text{M}$ ) y radiación de 2 Gy.

Por su parte el complejo **SDQCu** (resultados presentados en el panel inferior de la Figura 5.4-26) mostró la capacidad de reducir la proliferación celular en una manera dependiente de la concentración en todo el rango ensayado alcanzando valores de sobrevivencia de 73%, 65% y 30% a las concentraciones de 0.5, 1.0 y 1.5  $\mu\text{M}$  respectivamente.

Al combinar la radiación a una dosis de **2 Gy** (70.8% de sobrevivencia) con **SDQCu** se observó una reducción de la proliferación diferencial entre las células únicamente irradiadas y aquellas expuestas **SDQCu** con valores de supervivencia de 54 %, 44 % y 12 % a las concentraciones de 0.5, 1.0 y 1.5  $\mu\text{M}$ , respectivamente.

Las células irradiadas con dosis de 6 Gy redujeron la proliferación de manera significativa con respecto a las células no irradiadas, sin embargo, se notó que no hay diferencia al combinarla con los complejos **SMTCu**.

Para el caso del complejo **SDQCu** si se observó un efecto sinérgico entre la radiación a una dosis de **6 Gy** (sin complejo), cuyo porcentaje de proliferación normalizado por el valor basal, pasó de 19.7 % a valores de 6.1, 8.3 y 0.3 % cuando las células se incubaron con concentraciones de 0.5, 1.0 y 1.5  $\mu\text{M}$  respectivamente ( $p < 0.05$ ).

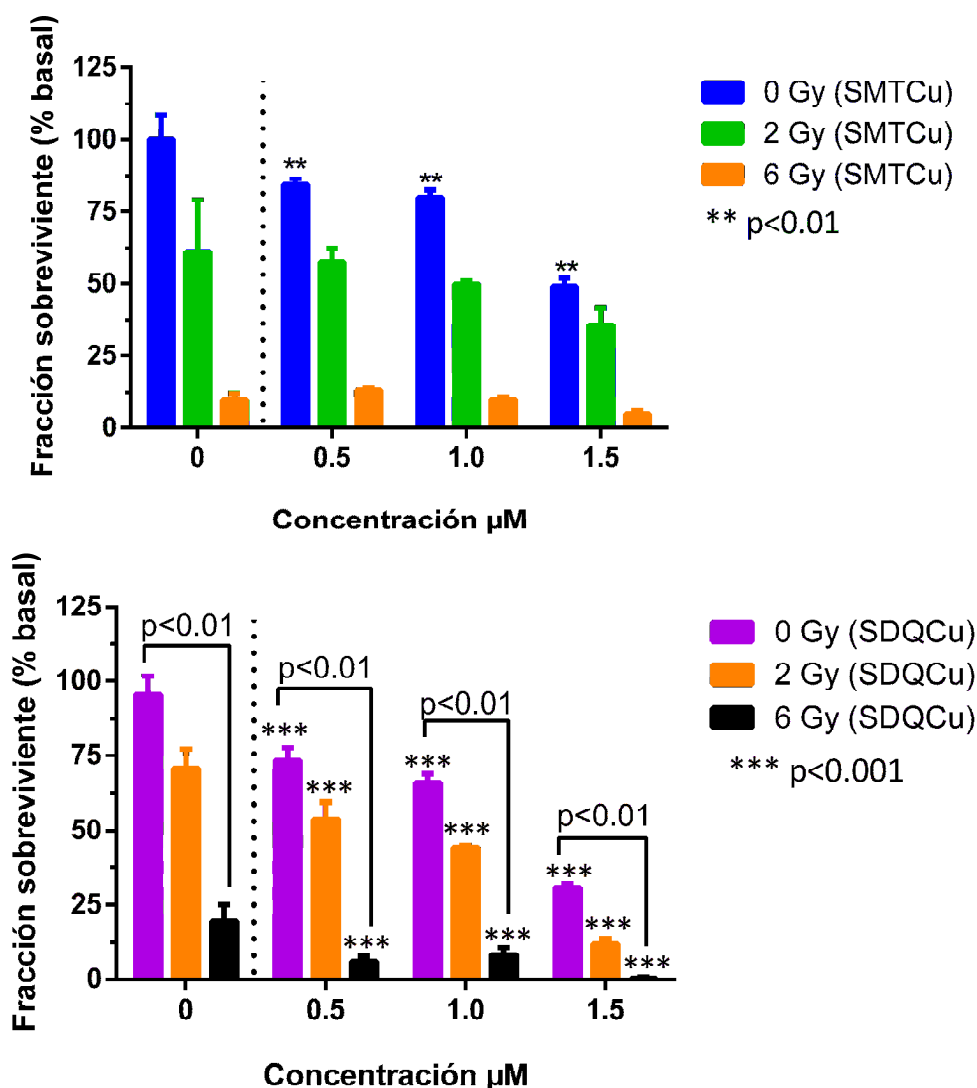


Figura 5.4-26 Efecto en la proliferación de células A549 tratadas con los complejos SMTCu (panel superior) y SDQCu (panel inferior) y/o expuestas a diferentes dosis de radiación. Los asteriscos representan diferencia con los controles basales de células sin complejo adicionado e irradiadas con dosis de 0, 2 y 6 Gy respectivamente. Las barras agrupadas representan una diferencia significativa ( $p < 0.01$ ) entre las células tratadas únicamente con los complejos y las células que fueron irradiadas con 2 y 6 Gy. Los datos se presentan como la media  $\pm$  SEM con  $n=9$

La posible combinación de metales de transición y sus complejos con la radioterapia ha sido de interés clínico con el fin de reducir la cantidad de metal y de dosis de radiación requerido [376].

Varios tipos de complejos de coordinación tienen la capacidad de aumentar el daño intracelular debido a la radiación tanto *in vivo* como *in vitro*. Tres mecanismos principales de radiosensibilización han sido sugeridos para los complejos de transición: unión al ADN y alteración de los mecanismos de reparación, depleción de la reserva de tioles intracelulares (GSH principalmente) y la reducción del complejo metálico para unirse al ADN, el cual es blanco intracelular terapéutico de la radiación [377]. Más recientemente, se ha determinado que los complejos de cobre (II) pueden ejercer su actividad radio

sensibilizante a través de la unión al ADN ya sea del ion cobre individual o complejado y la subsecuente promoción de quiebres en el ADN [378,379].

Complejos de cobre (II) con metronidazol, secnidazol, tinidazol y nimorazol [380] y heterociclos derivados del imidazol [379] demostraron sensibilizar diferentes cepas bacterianas y líneas celulares a la radioterapia debido a su capacidad de aumentar la cantidad de ROS e inducir daños oxidativo en el ADN. Posiblemente esta sea la razón por la cual el complejo SDQCu potenció los efectos de la radiación ya que se ha demostrado que el este compuesto ocasionó quiebres en las hebras del ADN a través del ensayo cometa (sección 4.11.1) y además es un inductor la generación de peróxidos intracelulares, como se mostró en la sección 5.4.4.

#### 5.4.11. Experimentos en esferoides multicelulares

Los efectos de los complejos **SMTCu** y **SDQCu** en la viabilidad celular de los esferoides multicelulares después de un tratamiento de 24 horas, se determinó a través de la reducción de la resazurina y su determinación fluorimétrica. De igual manera los esferoides se co-incubaron con los complejos y BSO (100  $\mu$ M) con el fin de evaluar si hay una diferencia entre los tratamientos, y un posible efecto sinérgico que permita reducir la concentración de las sustancias empleadas y lograr un efecto deletéreo semejante o mayor al de las sustancias de manera individual.

Los resultados de esta experiencia se resumen en la Figura 5.4-27. En el panel superior se encuentran los resultados del complejo **SMTCu**, en el que se pudo observar que el complejo indujo una reducción en la viabilidad celular en todo el rango de concentración estudiado. El efecto se observó dependiente de la concentración, a la máxima concentración se logró una reducción de la viabilidad del 70% de la población.

Cuando el **SMTCu** fue combinado con 100  $\mu$ M de BSO se observó una diferencia significativa con respecto a los controles, no obstante, la combinación de ambos compuestos no mostró un efecto sinérgico ni aditivo a nivel citotóxico.

Por otro lado, al comparar los resultados obtenidos en el modelo de monocapa (2D) con los obtenidos en esferoides (3D), se observó que para causar la pérdida de viabilidad del 50% de la población celular en el esferoide la concentración del complejo **SMTCu** tuvo que ser aumentada 2.5 veces, con respecto a la usada en la monocapa. Los valores de  $IC_{50}$  obtenidos se presentan en la Tabla 5.4-3.

En el panel inferior de la Figura 5.4-1 se presentan los resultados de la alteración en la viabilidad de los esferoides multicelulares tratados con **SDQCu**. Se encontró que el efecto citotóxico del complejo se da de manera dependiente de la concentración en todo el rango estudiado, a la máxima concentración de complejo estudiada se observó una inhibición de la viabilidad del 55.3% de las células.

Al comparar los valores de  $IC_{50}$  obtenido en esferoides con el obtenido en el modelo bidimensional de monocapa, se pudo ver que la concentración en ésta última tuvo que



ser incrementada 3 veces, para lograr el mismo nivel de efecto (inhibir el 50% de la población celular).

Cuando se combinó SDQCu con BSO (100  $\mu$ M), se logró observar que la mezcla de ambas sustancias tuvo un efecto citotóxico superior al mostrado individualmente por SDQCu desde la concentración de 3  $\mu$ M ( $p < 0.05$ ).

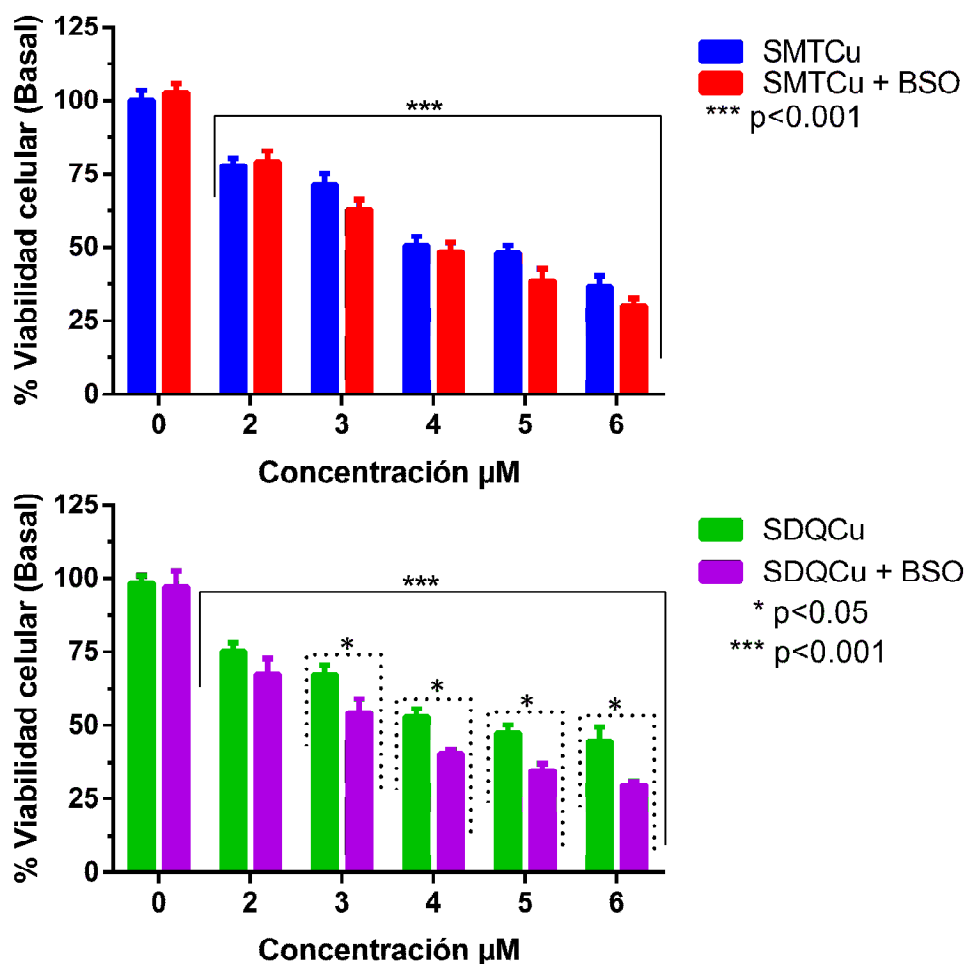


Figura 5.4-27 Efecto de los compuestos SMTCu (panel superior), SDQCu (panel inferior) y sus combinaciones BSO 100 $\mu$ M en la viabilidad de esferoides multicelulares (A549) durante 24 horas. Los asteriscos (\*\*\*) representan diferencia significativa con respecto a la viabilidad de los esferoides no tratados (0  $\mu$ M) con valores de  $p < 0.001$ . Las barras agrupadas para el complejo SDQCu, presentado en el panel inferior, representan una diferencia significativa en el efecto sobre la viabilidad celular a la misma concentración incluir BSO. Los datos se presentan como la media  $\pm$  SEM con un  $n = 15$ .

Tabla 5.4-3 Valores de  $IC_{50}$  calculados para los compuestos SMTCu, SDQCu y sus combinaciones con BSO 100 $\mu$ M tanto en monocapa (2D) como en esferoides multicelulares (3D) de células A549 tratadas durante 24 horas. Los datos se presentan como la media  $\pm$  SEM.

	SDQCu	SMTCu	SDQCu + BSO	SMTCu + BSO
$IC_{50}$ monocapa	1.59 $\pm$ 0.11	1.79 $\pm$ 0.17	0.98 $\pm$ 0.10	0.96 $\pm$ 0.11
$IC_{50}$ esferoides	4.75 $\pm$ 0.50	4.51 $\pm$ 0.95	3.32 $\pm$ 1.10	3.98 $\pm$ 0.45
IRM <sup>a</sup>	3.0	2.5	3.4	4.1

<sup>a</sup> El índice de resistencia multicelular (IRM) es la relación entre el IC<sub>50</sub> obtenido en esferoides multicelulares dividido el IC<sub>50</sub> obtenido en el modelo (2D) monocapa.

El incremento en las concentraciones necesarias para inducir citotoxicidad en los esferoides multicelulares comparada con los observados en el modelo de monocapa, se relacionan principalmente con la resistencia multicelular fenómeno que se da en cultivos celulares tridimensionales, donde las células se vuelven menos sensibles a compuestos antitumorales cuando las células establecen contacto con su microentorno [381].

Se ha reportado que en los esferoides multicelulares se da un aumento en la comunicación física de las células dentro del esferoide, la mejora en las vías de señalización, incremento en la síntesis de proteínas y de matriz extracelular, aumento en la expresión de genes que codifican factores de crecimiento y resistencia [382].

Desoize y Jardillier han reportado índices de resistencia multicelular entre modelos de cultivo bi y tridimensionales de células A549 tratados con compuestos antitumorales de uso clínico (Tabla 5.4-4). Al comparar estos resultados con los índices obtenidos para los complejos **SMTCu** y **SDQCu** (Tabla 5.4-3), se encontró que los valores de éstos fueron menores que el arrojado por los medicamentos. Sin embargo, son levemente mayores al obtenido para el compuesto KP46, el cual es un complejo de galio cuyo mecanismo de acción está asociado a la producción de ROS y alteraciones del ADN [381,383,384].

Tabla 5.4-4 IC<sub>50</sub> μM de cuatro medicamentos antitumorales (cisplatino y etopósido, doxorubicina, vinblastina y KP46) en células A549 cultivadas in vitro como monocapa y como esferoides (tomado de Desoize & Jardillier, 2000).

IC <sub>50</sub>	Cisplatino	Doxorrubicina	Etopósido	Vinblastina	KP46 <sup>a</sup>
<b>Monocapa</b>	3.0 ± 0.5	0.2 ± 0.1	3.2 ± 0.3	0.008 ± 0.001	1.95 ± 0.5
<b>Esferoides</b>	81 ± 15	7 ± 1	521 ± 80	53 ± 6	23.5 ± 1.5
<b>IRM <sup>b</sup></b>	27	35	163	6625	1.2

<sup>a</sup> Tris (8-quinolinato) de galio (III)

<sup>b</sup> El índice de resistencia multicelular (IRM) es la relación entre el IC<sub>50</sub> obtenido en esferoides multicelulares dividido el IC<sub>50</sub> obtenido en el modelo (2D) monocapa.

#### 5.4.11.1. Tinción de esferoides multicelulares con fluoresceína diacetato (FDA) y Yoduro de propidio (IP). "live/dead staining"

La presencia de la capa proliferante en los esferoides multicelulares de A549 fue determinada a través de microscopía de epifluorescencia. Los esferoides fueron marcados con la sonda fluoresceína diacetato, la cual emite fluorescencia de color verde y es retenida en el citoplasma por las células viables; también se usó la sonda yoduro de propidio que emite fluorescencia de color rojo al interactuar con el ADN y señala células cuya viabilidad e integridad de la membrana celular ha sido comprometida.

Como se puede ver en la Figura 5.4-28 los esferoides tratados con el compuesto **SDQCu** (panel superior) a la concentración de 2 μM no mostraron una alteración observable en la intensidad de la fluorescencia en verde indicando que la capa proliferante no fue afectada aparentemente. Al incrementar las concentraciones se observó que la cantidad e intensidad de las zonas de color rojo, asociado a células no proliferantes o no viables

aumentó con respecto a la concentración, en concordancia con los resultados presentados en la Figura 5.4-27 (panel inferior).

En el caso del complejo **SMTCu**, panel inferior de la Figura 5.4-28 se pudo observar que a la concentración de 2  $\mu\text{M}$ , no hubo un efecto relevante a nivel de la capa proliferante del esferoide. A medida que se aumentó la concentración del complejo, la intensidad de la fluorescencia del color verde se vio disminuida, mientras que la roja, asociada con el yoduro de propidio fue en aumento, indicando que la capa proliferante de los esferoides fue afectada por el complejo.

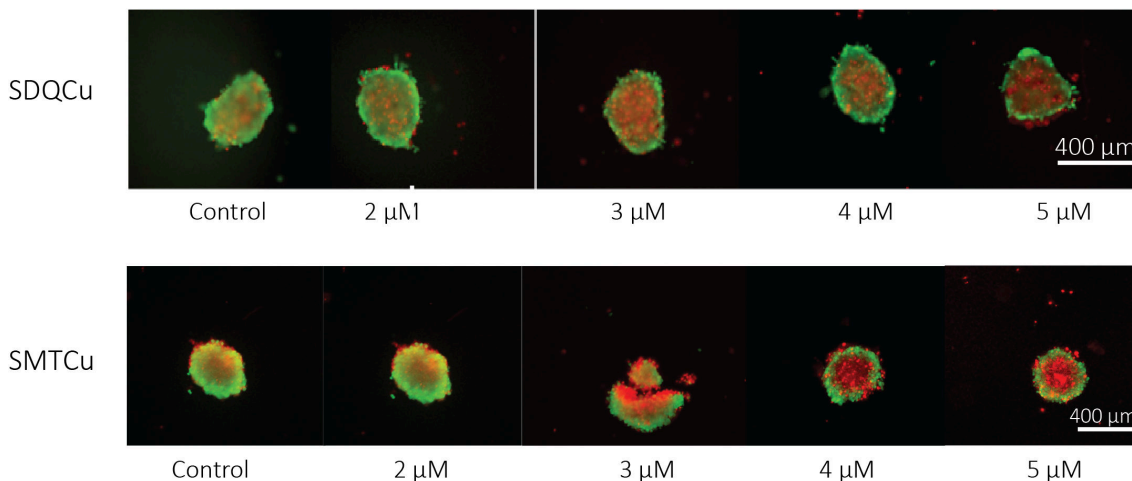


Figura 5.4-28 Tinción de esferoides multicelulares con fluoresceína diacetato (verde) y yoduro de propidio (rojo), tratados con diferentes concentraciones de los complejos SDQCu y SMTCu durante 24 horas.

#### 5.4.11.2. Cambios en la morfología de los esferoides multicelulares tratados con SMTCu, SDQCu y su combinación con BSO

La Figura 5.4-29 muestra las fotografías de los esferoides multicelulares tratados con los complejos **SMTCu**, **SDQCu**, solos y en combinación con **BSO** (100  $\mu\text{M}$ ).

Los cambios morfológicos de los esferoides tratados con concentraciones ascendentes de **SDQCu** durante 24 horas se fotografiaron (Figura 5.4-29 primera fila). Se observa que el complejo ocasionó alteraciones en la integridad del modelo desde la concentración de 4  $\mu\text{M}$ . Asimismo, se puede observar como las células se encogen y se desprenden de los esferoides. En las concentraciones superiores se observa un aumento en la separación de células desde el cuerpo principal del esferoide y a la concentración de 6  $\mu\text{M}$  se observa la presencia de un halo alrededor del cuerpo principal del esferoide, formado por células muertas.

Cuando se empleó la combinación **SDQCu + BSO** en los esferoides de células A549 (segunda línea Figura 5.4-29), se observa una pérdida de la estructura celular desde 4  $\mu\text{M}$  en el cual los márgenes o bordes de los esferoides constituidos por la capa proliferante del esferoide se torna difuso y no es distinguible dentro del esferoide, como es el caso de

los esferoides de control o los expuestos a concentraciones bajas de complejo. Los cambios morfológicos se observan con mayor intensidad al aumentar la concentración de complejo y en la máxima concentración se podría decir que hay un colapso en la estructura 3D del esferoide.

En el panel inferior de la Figura 5.4-29 **Error! No se encuentra el origen de la referencia.** (tercera fila) se observa que **SMTCu** indujo alteraciones en la morfología y compactación del esferoide multicelular desde la concentración de 3  $\mu\text{M}$ . Se presentan células en la periferia de morfología redondeada que se separan del cuerpo principal del esferoide. Con el aumento de la concentración de **SMTCu** se presenta una pérdida de la compactación del esferoide y un número incremental de células que se separan del cuerpo principal del esferoide causando un daño de la estructura principal del mismo.

En la última fila de la Figura 5.4-29 **Error! No se encuentra el origen de la referencia.** se muestran los resultados al combinar el complejo **SMTCu** y **BSO** e incubar los esferoides por 24 horas. Con esta mezcla se encontró una alteración estructural del esferoide con la aparición de células redondeadas separadas del cuerpo principal del esferoide. A medida que se usaron concentraciones más altas de complejo, se observó que el esferoide perdió estructura y no se pudo apreciar el borde formado por la capa proliferante.

Los resultados de la alteración morfológica de los esferoides tratados con los complejos **SMTCu** y **SDQCu** se pueden correlacionar con los resultados de viabilidad (Figura 5.4-27), donde se observó que el efecto de ambos complejos dependía de la concentración y a las mayores concentraciones había un efecto citotóxico mayor.

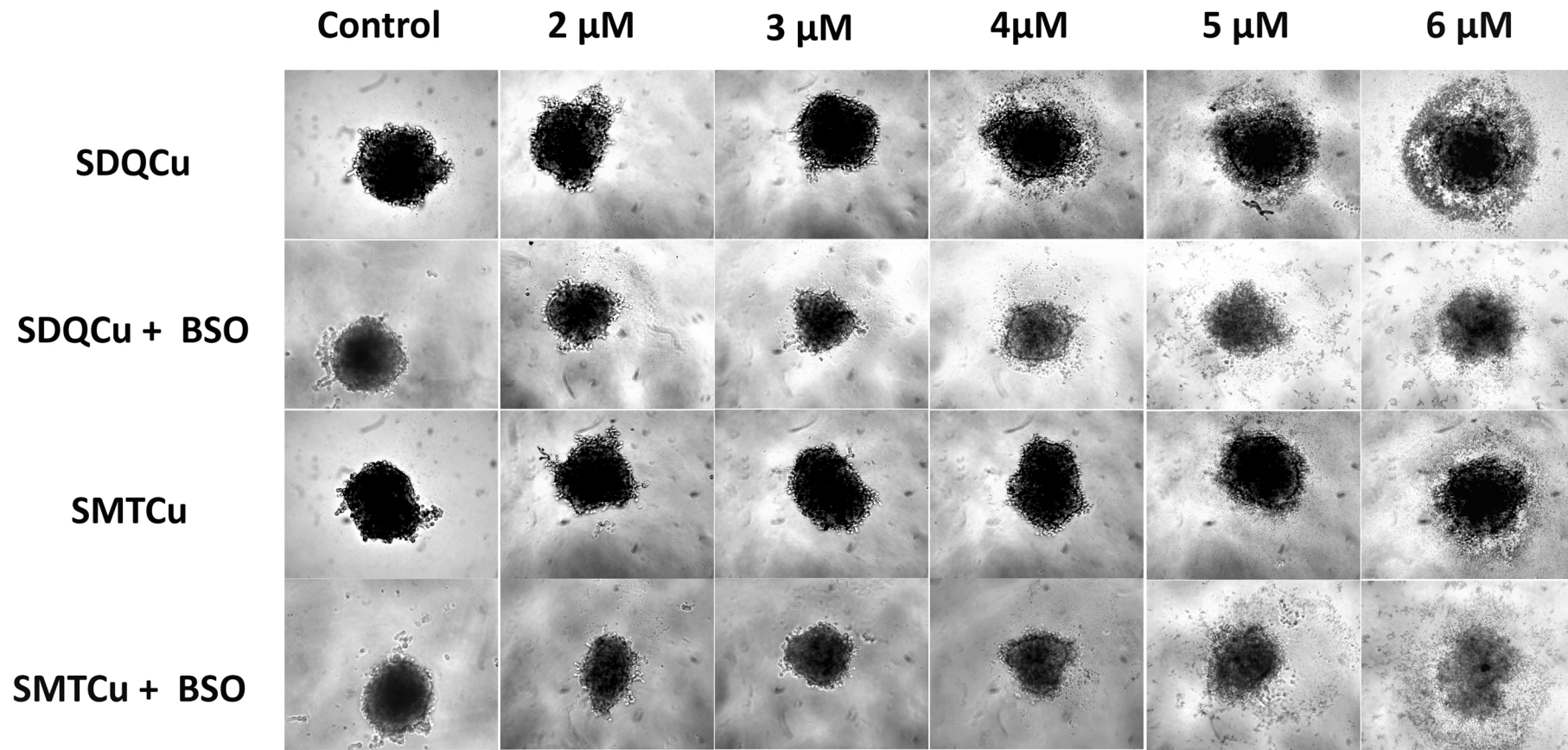


Figura 5.4-29. Alteraciones morfológicas de los esferoides multicelulares (A549) tratados con los complejos SDQCu SMTCu y su combinación con BSO (100  $\mu$ M).

5.4.12. Efecto de los complejos en la invasión de esferoides multicelulares en geles de colágeno.

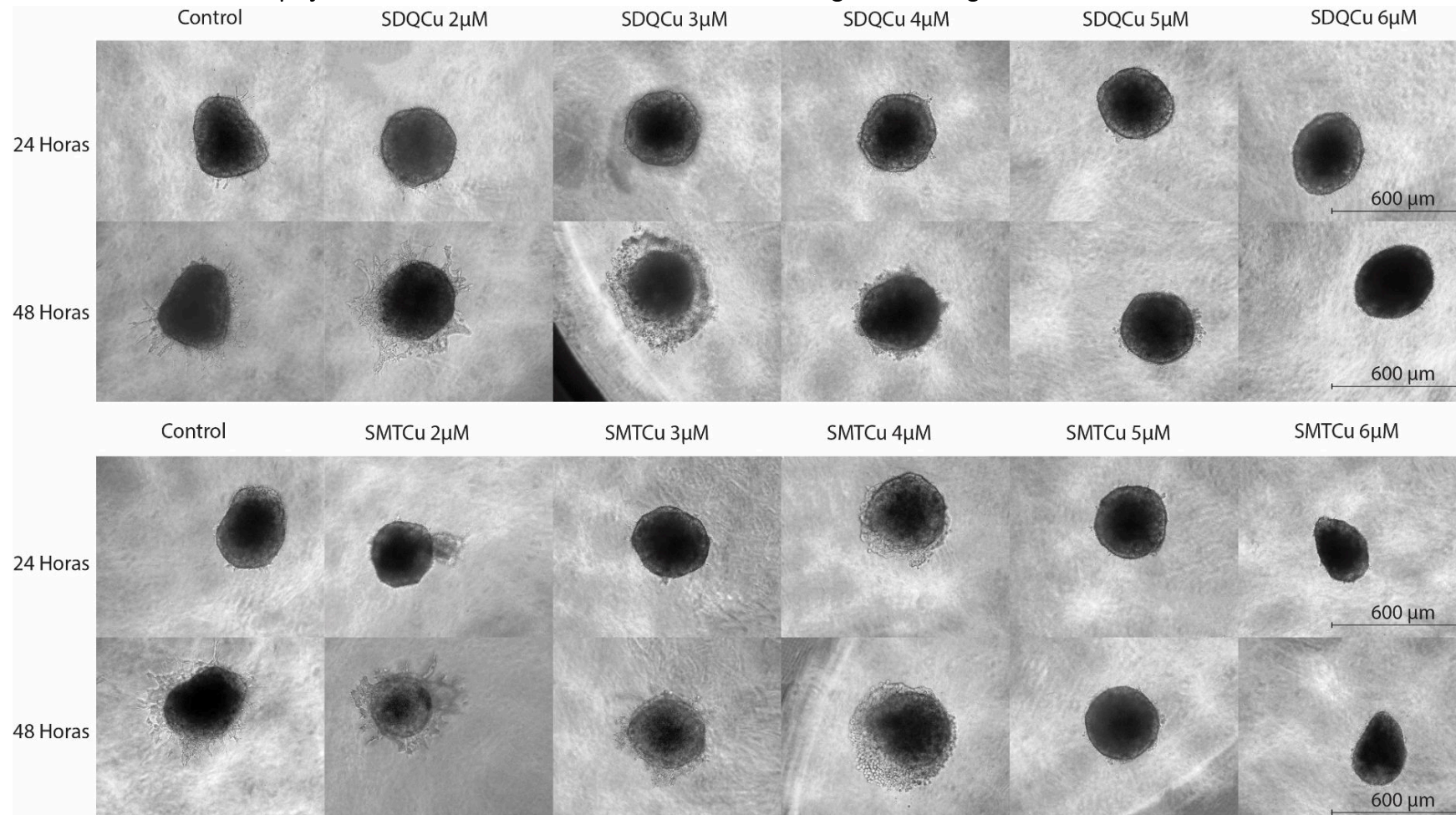


Figura 5.4-30 Fotografías representando la invasión de esferoides multicelulares de células A549 en geles tridimensionales de colágeno tratados con diferentes concentraciones de los compuestos SMTCu, y SDQCu.

Uno de los objetivos en la terapia de posibles compuestos antitumorales es reducir o evitar procesos de metástasis e invasión de tejidos circundantes por parte de las células tumorales.

Con el fin de evaluar si los complejos SMTCu y SDQCu tienen la capacidad de inhibir la invasión de esferoides multicelulares de células A549 en una matriz de colágeno, se desarrolló esta experiencia en la cual los esferoides fueron cultivados como se expuso en la sección 4.12 y se incubaron con concentraciones ascendentes de ambos compuestos y se fotografiaron después de 24 y 48 horas de tratamiento.

Las fotografías de los esferoides tratados con los complejos SDQCu (panel superior) y SMTCu (panel inferior) se muestran en la Figura 5.4-30. Se pudo observar que, tras 24 horas de tratamiento, los esferoides a todos los niveles de concentración mostraron proyecciones celulares tipo invadopodios en la matriz de colágeno. Lo cual señala que los complejos a este tiempo y en el rango de concentraciones estudiado no tienen la capacidad de inhibir la migración celular.

Al analizar las fotografías correspondientes a los tratamientos con ambos compuestos pasadas 48 horas de exposición, se pudo observar en forma general que los esferoides tratados a bajas concentraciones de los complejos (2 y 3  $\mu\text{M}$ ) mostraron la capacidad de invadir un área equivalente a la invadida por los controles. No obstante, a partir de 4  $\mu\text{M}$  para ambos compuestos se observó que las células provenientes del esferoide que lograron invadir el gel de colágeno tenían una morfología redondeada consistente con la presentada por células muertas.

Los resultados obtenidos en esta experiencia guardan consistencia con lo observado en los experimentos de viabilidad (Figura 5.4-27), las fotografías de los cambios morfológicos de los esferoides expuestos a los complejos (Figura 5.4-29) y con la tinción de esferoides con fluoresceína diacetato y yoduro de propidio (Figura 5.4-28). Las cuales demostraron que a bajas concentraciones los esferoides conservaban una viabilidad cercana 75%, con poca alteración morfológica y una cantidad apreciable de células de tipo proliferante en el esferoide; por lo tanto, fueron capaces de invadir y proliferar dentro del gel de colágeno.

Como conclusión se puede decir que los complejos SMTCu y SDQCu tienen la capacidad de generar efectos citotóxicos en los esferoides en el rango superior de concentraciones, pero son incapaces de inhibir la migración e invasión celular a 24 horas, fenómeno que se revierte a las 48 horas.

#### **5.4.13. Efectos de los complejos SMTCu y SDQCu en la viabilidad otras líneas celulares**

El efecto citotóxico de los complejos SMTCu y SDQCu también fue estudiado en las líneas celulares MCF-7 y MG-63 a través del ensayo de MTT. Los resultados se prestan en la Figura 5.4-31 y la Figura 5.4-32.

Se pudo observar que el efecto citotóxico de los complejos SDQCu y SMTCu en las células MCF-7 (Figura 5.4-31) se presenta a partir de 2  $\mu\text{M}$  de una manera dependiente de la concentración. También se pudo ver que esta línea celular fue más sensible a SDQCu, ya



que el valor de IC50 para este compuesto es 1.3 veces menor que el observado para SMTCu y se encontró diferencia significativa entre los dos compuestos ( $p < 0.001$ ) a las concentraciones 2 y 3  $\mu\text{M}$ . En la Tabla 5.4-5 se presentan los valores de IC50 obtenidos para los complejos en esta línea celular.

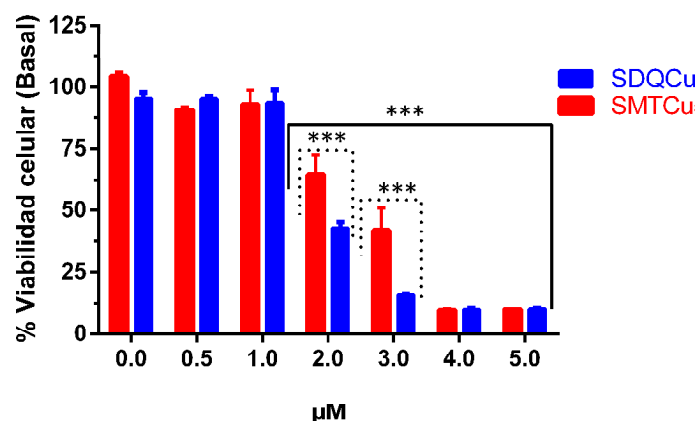


Figura 5.4-31 Viabilidad de células MCF-7 de cáncer de mama tratadas con los complejos SDQCu y SMTCu durante 24 horas. \*\*\* representan diferencia significativa con respecto a los controles basales ( $0 \mu\text{M}$ )  $p < 0.001$  y las barras de datos agrupadas bajo la línea punteada representan una diferencia significativa entre el efecto de los complejos SMTCu y SDQCu a la misma concentración con un valor  $p < 0.001$ . Los datos se presentan como la media  $\pm$  SEM con  $n = 9$ .

Tabla 5.4-5 Valores de IC50 obtenidos al tratar las células MCF-7 y MG-63 con los complejos SDQCu y SMTCu durante 24 horas. Los datos se presentan como la media  $\pm$  SEM con  $n = 9$

	SDQCu	SMTCu
MCF-7	$1.89 \pm 0.57$	$2.46 \pm 0.71$
MG-63	$1.79 \pm 0.98$	$1.89 \pm 0.85$

En el caso de las células derivadas de osteosarcoma humano, MG-63, se encontró que ambos complejos ejercieron un efecto citotóxico a partir de la concentración de 1.5  $\mu\text{M}$ . En el caso particular del complejo SDQCu fue más citotóxico que SMTCu desde 2  $\mu\text{M}$ .

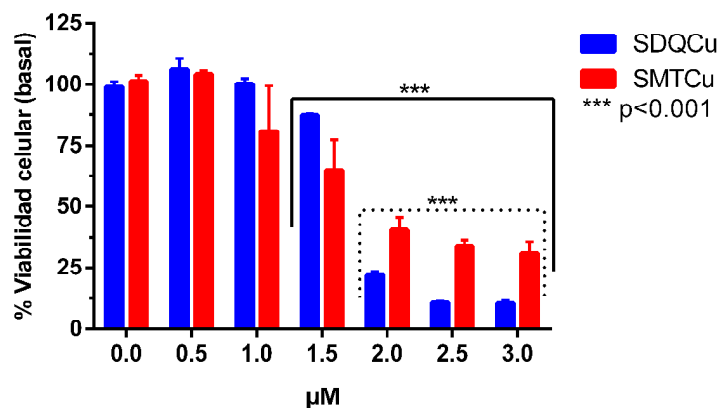


Figura 5.4-32 viabilidad de células MG-63 de cáncer de mama tratadas con los complejos SDQCu y SMTCu durante 24 horas. \*\*\* representan diferencia significativa con respecto a los controles basales ( $0 \mu\text{M}$ )



$p < 0.001$  y las barras de datos agrupadas bajo la línea punteada representan una diferencia significativa entre el efecto de los complejos SMTCu y SDQCu a la misma concentración con un valor  $p < 0.001$ . Los datos se presentan como la media  $\pm$  SEM con  $n = 9$ .

#### 5.4.14. Otros complejos ternarios de sulfonamidas y N, N heterociclos estudiados

Dentro de los estudios realizados para este trabajo de tesis doctoral, se investigaron otros complejos de metales de transición como cobalto, níquel, cobre y zinc con sulfonamidas y ligandos de tipo nitrogenados heterocíclicos.

Los complejos enumerados en la Tabla 5.4-6 se estudiaron en células MG-63 y A549 cultivadas en monocapa y en la misma se encuentran resumidos los valores de IC50 obtenidos.

De todos esos complejos, se encontró que los que contienen Cu(II) son los más activos, y que los complejos SDQCu y SMTCu, tienen valores de IC50 considerablemente menores que los de los otros. Por esto, se decidió ahondar en los estudios solo con esos dos complejos.

Tabla 5.4-6 Valores de IC50 obtenidos para otros complejos de sulfonamidas y ligandos heterocíclicos nitrogenados estudiados en células MG-63 y A549 tratadas durante 24 horas.

Fórmula	MG-63 (IC50) $\mu$ M	A549 (IC50) $\mu$ M
Co(SDZ)2bpy	>500	>500
Ni(SDZ)2bpy	202.1	>500
Cu(SDZ)2bpy	41.7	39.3
Cu(SDZ)bpyCl	41.8	37.5
Zn(SDZ)2bpy	497.1	>500
Co(SDZ)2fen	n.d	>500
Cu(SDZ)2fen	n.d	139.1
Zn(SDZ)2fen	n.d	>500
Co(SDZ)2(6MQ)2	n.d	>500
Cu(SDQ)2bpy	n.d	>500
Co(SDQ)2bpm	>500	n.d
Ni(SDQ)2bpm	294.9	>500
Cu(SDQ)2bpm	195.4	>500
Zn(SDQ)2bpm	146.0	233.8
Ni(SDQ)2bq	> 500	486.1
Cu(SDQ)bqCl	1.79	1.59
Cu(SMT)bqCl	1.89	1.79
SDQ-5Br-Sal	> 500	> 500
SDQ-O-Va	> 500	> 500
CoCl2	>500	n.d
NiCl2	>500	>500
CuCl2	310.9	>500
NaSDQ	> 500	> 500

NaSMT	> 500	> 500
Bq	2,2'-biquinolina	
Bpm	2,2'-bipirimidina	
Bpy	2,2'-bipiridina	
6-MQ	6-Metoxiquinolina	
Fen	1,10'-fenantrolina	
SDZ	Sulfadiazina	
SDQ	Sulfaquinoxalina	
SMT	Sulfametazina	

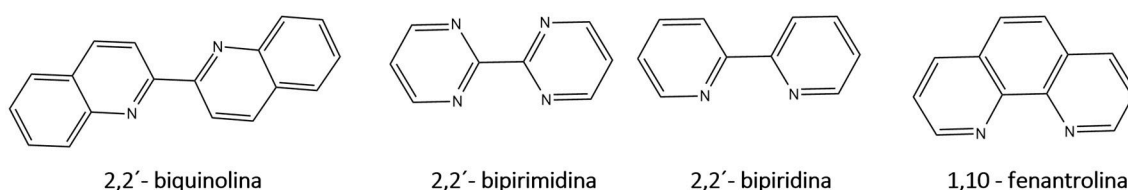


Figura 5.4-33 Estructura de los ligandos nitrogenados estudiados en este trabajo de tesis.

#### 5.4.15. Resumen 5.4 Estudios realizados con complejos ternarios de 2,2'-biquinolina con sulfametazina y sulfaquinoxalina

Al estudiar los complejos SMTCu y SDQCu, los cuales son complejos ternarios de cobre (II) con sulfametazina o sulfaquinoxalina y biquinolina en el modelo de monocapa de células tumorales pulmonares A549, se encontró que los complejos tuvieron un efecto citotóxico en el rango de concentraciones de 1 a 5  $\mu\text{M}$ . SMTCu y SDQCu incrementaron de manera significativa la cantidad intracelular de ROS desde 1.0  $\mu\text{M}$ .

Con la finalidad de reducir la cantidad de complejos de cobre utilizado en las células se exploró la posible sinergia de los complejos con L-butionina sulfoximina (BSO), el cual es un compuesto que inhibe la producción de GSH y como consecuencia se reduce la defensa antioxidante celular tanto a nivel de scavengers como enzimática (ver Figura 1.9-1).

Los complejos -como consecuencia de la producción de ROS- indujeron la oxidación de GSH, disminuyendo la relación GSH/GSSG. Este efecto se vio incrementado cuando se empleó el BSO. De igual manera se calculó a través de la ecuación de Nernst el potencial de reducción de la dupla GSSG/GSH<sub>2</sub> el cual también se vio aumentado de manera similar por ambos complejos y en mayor medida cuando se combinaron los complejos con BSO. Entre mayor sea el valor de este potencial se asocia con una alteración en el estado redox y bienestar general de la célula.

SMTCu y SDQCu causaron cortes dobles y simples en el ADN celular y se demostró que dado el aumento de la cantidad de ROS al interior de la célula se produjo oxidación bases

pirimidínicas en el ADN, lo que fue demostrado con el uso de una enzima de tipo endonucleasa (Endo III) que escinde estas bases oxidadas de ADN.

Probablemente como consecuencia de los daños a nivel del ADN, los complejos SMTCu y SDQCu indujeron arresto del ciclo celular en las células A549 en la fase G2/M a expensas de la población G1 desde las concentraciones de 1.0 y 1.5  $\mu\text{M}$ , respectivamente.

Posiblemente por la alteración del ADN y el desbalance redox intracelular ocasionado por los complejos, se desencadenaron procesos apoptóticos mediados por caspasa, ya que se demostró que ambas sustancias indujeron activación de la caspasa 3 lo cual se confirmó posteriormente al hacer marcación de las células con anexina V-FITC y yoduro de propidio. Se encontró que ambos complejos inducen apoptosis desde 1.0  $\mu\text{M}$  y la combinación con BSO con SDQCu indujo apoptosis desde 0.5  $\mu\text{M}$  con un incremento marcado en la población apoptótica en las concentraciones de 0.5, 1.0 y 1.5  $\mu\text{M}$ . La combinación de SMTCu + BSO aumentó la población apoptótica únicamente a 1 y 1.5  $\mu\text{M}$ .

Con el objeto de evaluar una posible combinación de radioterapia y quimioterapia basada en los complejos SMTCu y SDQCu, las células A549 fueron tratadas con concentraciones de los complejos de 0.5, 1.0 y 1.5  $\mu\text{M}$  y posteriormente fueron irradiadas con dosis de 2 y 6 Gy. Para SMTCu no se observó una mejoría de los efectos citotóxicos al combinar ambos tratamientos. Por el contrario, el complejo SDQCu mostró un efecto sinérgico al combinar la radiación con dosis de 2 Gy y las concentraciones de 1.0 y 1.5  $\mu\text{M}$  del complejo, mejorando el efecto obtenido con la radiación y con el complejo de manera individual. Del mismo modo al incubar las células A549 con SDQCu a las concentraciones de 0.5, 1.0 y 1.5  $\mu\text{M}$  y posteriormente irradiarlas con una dosis de 6 Gy se encontró una respuesta mayor y diferencial entre la combinación de la radiación y el complejo comparada con los tratamientos de manera individual. Adicionalmente, este experimento permitió observar que ambos complejos por si solos tienen la capacidad de alterar la proliferación celular en una manera dependiente de la concentración en todo el rango estudiado. Sin embargo, el efecto del complejo SDQCu es más marcado en comparación con el SMTCu.

Los complejos SMTCu y SDQCu no demostraron capacidad de inhibir la invasión celular de los esferoides multicelulares en geles de colágeno tras 24 horas de tratamiento. Sin embargo, tras 48 horas de exposición, se indujo la muerte de las células más externas del esferoide, deteniendo la progresión de la migración celular al usar altas concentraciones de los complejos.

Finalmente, los estudios realizados en esferoides multicelulares demostraron la presencia de resistencia multicelular y los cálculos del índice de resistencia obtenidos para los complejos SMTCu y SDQCu (2.5 y 3.0, respectivamente) fueron mejores que la de varias de las drogas usadas actualmente para tratamiento de tumores.

## 5.5. Determinación de algunas propiedades fisicoquímicas de los complejos y su relación con los efectos citotóxicos observados

### 5.5.1. Estudio de la lipofilicidad de los complejos binarios y ternarios de cobre (II)

El uso del cobre en la terapéutica antitumoral tiene dos aproximaciones paradójicas, una es usar quelantes de cobre con el fin de limitar la biodisponibilidad de este metal al interior de las células y alterar la producción de enzimas como la superóxido dismutasa dependiente de cobre y la segunda es formar complejos de cobre con el fin de formar ionóforos que transporten el metal a través de la membrana celular de una manera neutra hacia el interior de la célula y atacar directa o indirectamente dianas clave como el ADN, la mitocondria, proteínas y/o la alteración del balance redox intracelular [54,380,381].

A lo largo de este trabajo de tesis doctoral se estudiaron diferentes familias de complejos, y en particular complejos de coordinación de cobre, cuya actividad citotóxica varió de manera significativa de una familia a otra como se ha descrito en secciones previas de este manuscrito. En función del posible mecanismo de acción propuesto para los compuestos se hipotetizó que los complejos actuaron como ionóforos de cobre, necesariamente llegando al interior de la célula para ejercer su efecto citotóxico.

Se ha relacionado la capacidad de una molécula para cruzar membranas celulares por medio de difusión pasiva con la lipofilicidad, la cual refleja la solubilidad relativa del compuesto en un entorno lipídico, como por ejemplo la bicapa lipídica de la membrana celular.

Considerando que el carácter hidrofóbico de una sustancia ha demostrado ser un factor que afecta la absorción, el transporte a través de membrana, la biodisponibilidad, acumulación intracelular de drogas, interacciones con receptores hidrofóbicos, metabolismo, efectos farmacológicos, así como su toxicidad. [382].

Para demostrar que los complejos actuaron como transportadores de cobre al interior de la célula, primero se determinó la constante de retención cromatográfica ( $R_m^0$ ), a través de cromatografía en capa fina de fase reversa (RP-TLC), el cual es un descriptor del carácter lipofílico [224,225,383], como se dijo antes, este factor tiene una relación directa con el cruce de sustancias a través de la membrana celular.

Los resultados de las curvas de regresión lineal se presentan en la Figura 5.5-1 y la Figura 5.5-2 para los complejos de cobre (II) estudiados en este trabajo de tesis doctoral. Para la determinación se emplearon placas de cromatografía en capa fina de capa reversa de sílica funcionalizadas con una cadena lineal de dieciocho carbonos (C18), se determinó el  $R_f$  para cada complejo y posteriormente el  $R_m$  (apartado 4.2).

El  $R_m$  calculado fue graficado en función de la concentración ( $v/v$ ) de acetonitrilo o fracción orgánica ( $\varphi$ ) empleada. Con base en esta gráfica, se obtuvo la ecuación de la recta que permitió extrapolar el valor de ( $R_m^0$ ). Las constantes de retención cromatográficas se encuentran resumidas en la Tabla 5.5-1.

Como se puede ver en los resultados obtenidos los complejos SMTCu y SDQCu fueron los más lipofílicos, seguidos el binario de biquinolina (CuBQ) y el complejo de cobre con 6-

metoxiquinolina Cu6MQ. En los últimos lugares se puede observar que se encuentran los complejos de sacarina y glutamina.

Los complejos binarios de SMT y SDQ con Cu(II) también fueron analizados, no obstante, debido a su polaridad, y a que químicamente su estructura es polimérica, no se pudo obtener una recta que ajustara de manera adecuadamente al modelo de regresión lineal, sin embargo, se incluyeron en los gráficos con propósitos comparativos.

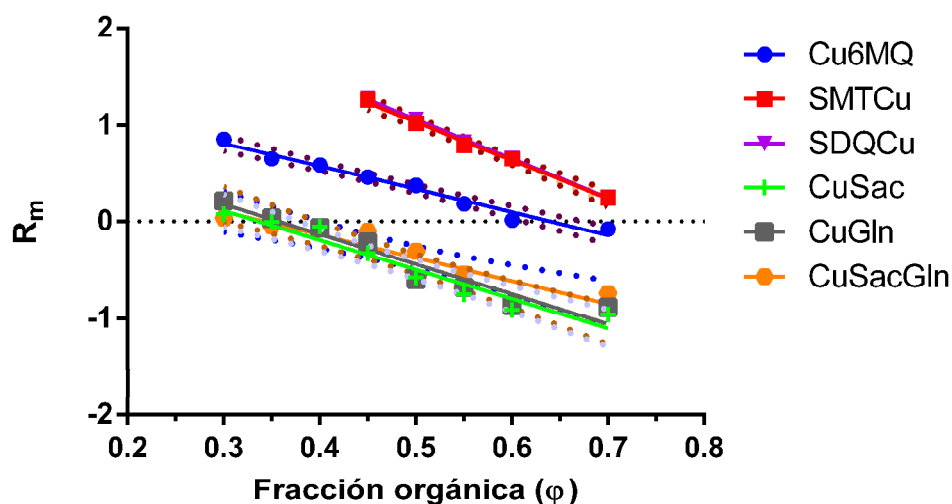


Figura 5.5-1 Gráficas de regresión lineal de los valores de  $R_m$  versus la concentración de acetonitrilo o fracción orgánica ( $\phi$ ), determinado para los complejos Cu6MQ, SMTCu, SDQCu, Cu-sac, Cu-gln y Cu-Sac-gln.

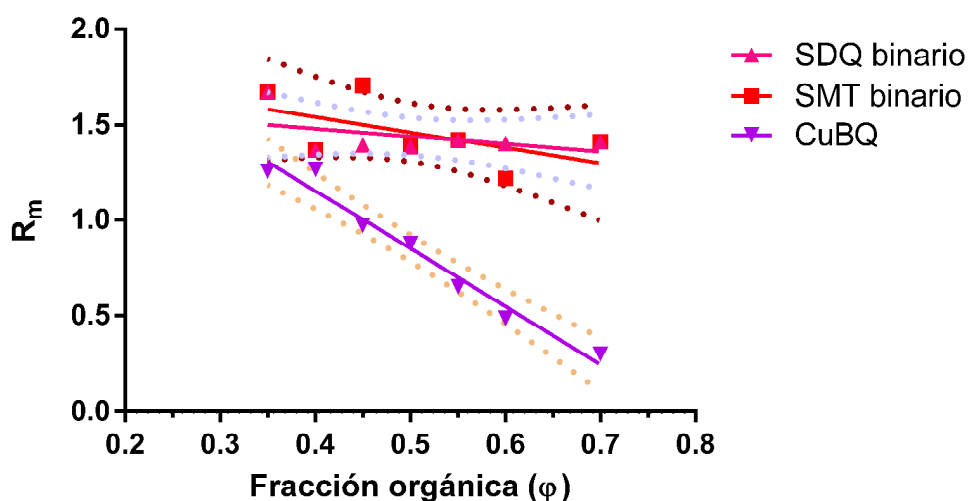


Figura 5.5-2 Gráficas de regresión lineal de los valores de  $R_m$  versus la concentración de acetonitrilo o fracción orgánica ( $\phi$ ), determinado para los complejos, SMTCu binario, SDQCu binario y CuBQ.

En la Figura 5.5-3 se representan en el eje Y los complejos de cobre estudiados, ordenados forma ascendente, en función de la constante de retención cromatográfica ( $R_m^0$ ) (eje X). De esta figura se puede analizar que a mayor valor de la constante mayor es el carácter lipófilico de los complejos.

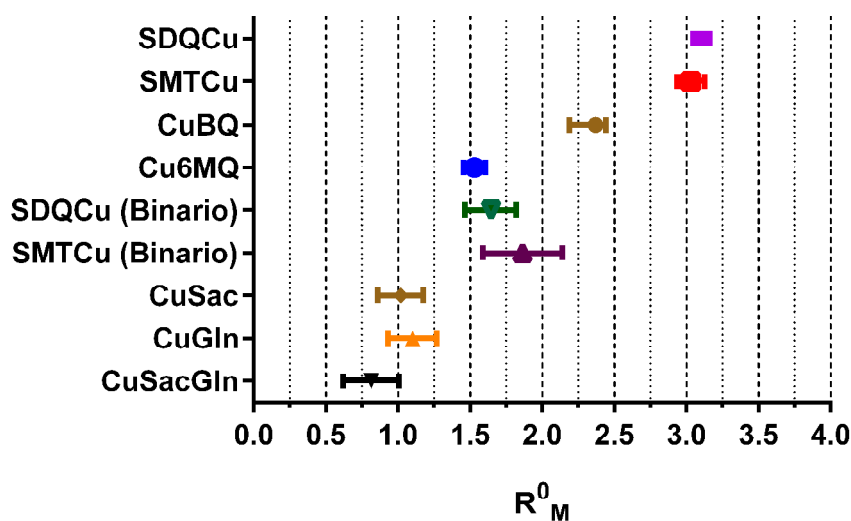


Figura 5.5-3 Gráfica del parámetro  $R_m^0$  para los diferentes complejos de cobre (II) estudiados.

Tabla 5.5-1 Resumen de los resultados de la ecuación de la recta de la gráfica  $R_m$  versus  $\varphi$ , para la determinación de la constante de retención cromatográfica  $R_m^0$  para los distintos complejos de cobre estudiados.

Complejo	$R_m^0$	b	R2
SDQCu	$3.104 \pm 0.05934$	$-4.087 \pm 0.1047$	0.9980
SMTCu	$3.031 \pm 0.09383$	$-3.994 \pm 0.1656$	0.9949
CuBQ	$2.371 \pm 0.1261$	$-3.035 \pm 0.2428$	0.9894
SMTCu binario	$1.863 \pm 0.2762$	$-0.8012 \pm 0.5320$	*
SDQCu Binario	$1.643 \pm 0.1776$	$-0.4013 \pm 0.3420$	*
Cu6MQ	$1.531 \pm 0.07348$	$-2.391 \pm 0.1478$	0.9776
Zn6MQ	$1.426 \pm 0.08244$	$-2.248 \pm 0.1658$	0.9684
Cu-gln	$1.101 \pm 0.1680$	$-3.081 \pm 0.3378$	0.9327
Cu-sac	$1.018 \pm 0.1558$	$-3.026 \pm 0.3134$	0.9395
Cu-sac-gln	$0.8147 \pm 0.1939$	$-2.380 \pm 0.3901$	0.9861

\* Los complejos marcados con asterisco (\*) no lograron ajustarse correctamente a un modelo de regresión lineal, sin embargo, se presentan en la tabla de modo ilustrativo.

Con el objetivo de observar si hay una correlación entre los valores de IC50 de los diferentes complejos de cobre obtenidos para la inhibición de la viabilidad de las células A549, se decidió graficar los valores del logaritmo del valor de IC50 versus el de  $R_m^0$ , el resultado se presenta en la Figura 5.5-4. Como se puede ver en dicha figura que hay una correlación inversa entre el valor de lipofilicidad ( $R_m^0$ ) y el valor de IC50 en células A549. Se pudo ver que los complejos que tuvieron mayor actividad frente a esta línea celular fueron aquellos con un mayor carácter lipofílico.

Resultados similares han sido reportados para complejos de cobre con 8-hidroxiquinolinas sustituidas, en los cuales se varió la hidrofobicidad del ligando y se estudió su efecto citotóxico en células HeLa y PC3, se encontró que los complejos más hidrofílicos tuvieron poca o nula actividad citotóxica mientras que aquellos con lipofilidad intermedia fueron los más activos, según Tardito y colaboradores cuando los complejos se hicieron extremadamente lipofílicos quedaban atrapados entre la bicapa lipídica de la membrana celular y fueron incapaces de alcanzar una concentración efectiva a nivel intracelular [159].

El efecto de la lipofilidad en la actividad citotóxica de complejos de coordinación también ha sido demostrado para complejos de rutenio en los cuales se encontró la misma correlación inversa entre la lipofilidad y los valores de IC<sub>50</sub> [384].

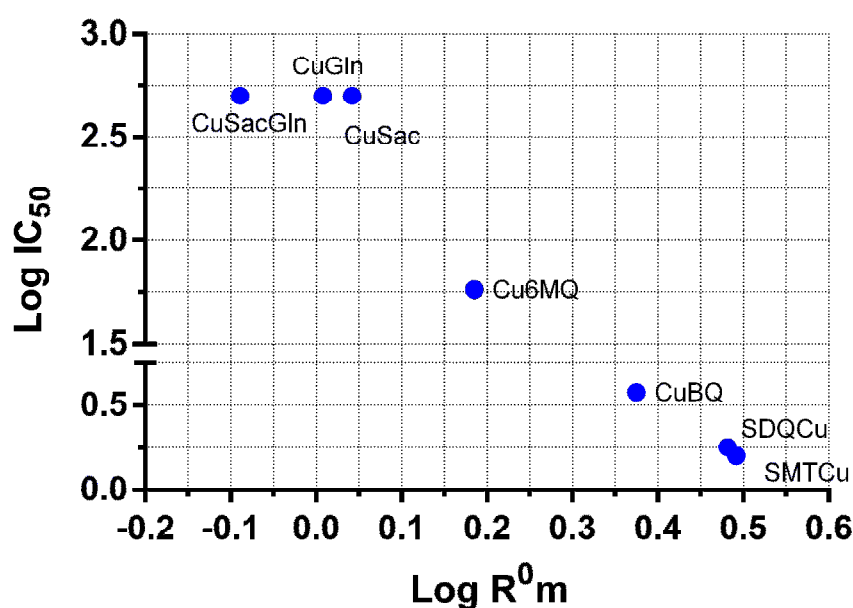


Figura 5.5-4 gráfica de correlación entre el logaritmo base 10 del IC<sub>50</sub> calculado para los diferentes complejos de cobre en función del logaritmo de la constante retención cromatográfica ( $R_m^0$ )

Cuantificación del cobre intracelular por medio de absorción atómica acoplada a plasma inducido

Con el fin de verificar si en efecto la mayor lipofilidad de los complejos tiene un impacto en la cantidad de cobre que es transportado al interior de las células, la cantidad del biometal se determinó a través de la técnica de absorción atómica acoplada a plasma inducido, después de lisar las células con Tritón x-100 y digerirlas en caliente con ácido nítrico (materiales y métodos sección 4.15)

En la Figura 5.5-5 se presentan los resultados de esta experiencia y como se puede ver, los complejos de cobre, SMTCu, SDQCu y CuBQ cuyos valores de  $R_m^0$  fueron 3.031, 3.104 y 2.371, respectivamente (ver Tabla 5.5-2), mostraron que el uptake de cobre a nivel

intracelular normalizado por la cantidad de cobre de los complejos agregada, tuvieron valores cercanos al 30%. Mientras que el complejo Cu6MQ cuyo valor de  $R_m^0$  obtenido fue de 1.53, mostró que la cantidad de cobre intracelular estuvo alrededor de 4.9%.

En la Tabla 5.5-3 se encuentran representados los valores de la cuantificación de cobre obtenida y los cálculos del uptake de cobre intracelular.

Complejos ternarios de cobre (II) con fenantrolina y distintas cadenas alquílicas como coligandos estudiados en células HeLa y SKOV-3. Demostraron que el uptake y la citotoxicidad de los complejos aumentó linealmente con respecto a la longitud de la cadena alifática la cual también incrementó los valores obtenidos de lipofilidad, señalando una relación entre citotoxicidad, lipofilidad y uptake de cobre intracelular [385].

Tabla 5.5-2 Resumen de los valores de IC50 y  $R_m^0$  para los complejos de cobre estudiados en células A549.

Complejo	$R_m^0$	IC50
SDQCu	3.104	1.59
SMTCu	3.031	1.79
CuBQ	2.371	3.8
SMTCu binario	1.863	148.7
SDQCu Binario	1.643	410.3
Cu6MQ	1.531	57.9
Zn6MQ	1.426	206.4
Cu-gln	1.101	500
Cu-sac	1.018	500
Cu-sac-gln	0.8147	500

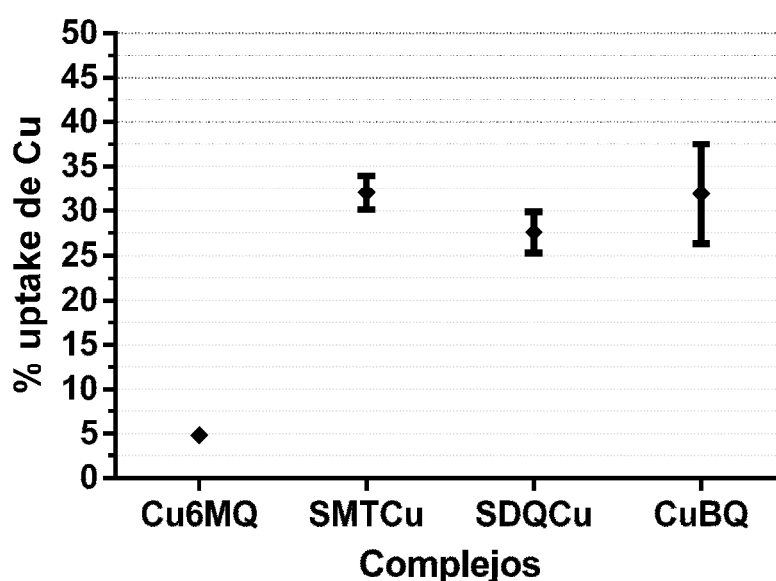


Figura 5.5-5 determinación de cobre intracelular después de tratar las células A549 durante 24 horas con los complejos de cobre (II), Cu6MQ, SMTCu, SDQCu y CuBQ.



Tabla 5.5-3 Resumen de la cuantificación de cobre intracelular y los porcentajes de uptake de cobre en células A549, determinados a través de absorción atómica acoplada a plasma inducido.

Complejo	Concentración $\mu\text{M}$ de Cu	mg/mL cobre agregado	mg/mL cobre intracelular	% Cu uptake
Cu6MQ	30	$1.90 \times 10^{-3}$	$9.90 \times 10^{-5}$	5.2
		$1.90 \times 10^{-3}$	$1.02 \times 10^{-4}$	5.4
	50	$3.17 \times 10^{-3}$	$1.40 \times 10^{-4}$	4.4
		$3.17 \times 10^{-3}$	$1.39 \times 10^{-4}$	4.4
BQCu	2.0	$1.27 \times 10^{-4}$	$2.00 \times 10^{-5}$	15.8
		$1.27 \times 10^{-4}$	$4.20 \times 10^{-5}$	33.1
	3.0	$1.90 \times 10^{-4}$	$7.70 \times 10^{-5}$	40.5
		$1.90 \times 10^{-4}$	$7.30 \times 10^{-5}$	38.4
SMTCu	1.0	$6.34 \times 10^{-5}$	$2.00 \times 10^{-5}$	31.5
		$6.34 \times 10^{-5}$	$2.00 \times 10^{-5}$	31.5
	1.5	$9.51 \times 10^{-5}$	$2.30 \times 10^{-5}$	24.2
		$9.51 \times 10^{-5}$	$2.20 \times 10^{-5}$	23.1
SDQCu	1.0	$6.34 \times 10^{-5}$	$1.90 \times 10^{-5}$	30.0
		$6.34 \times 10^{-5}$	$1.90 \times 10^{-5}$	30.0
	1.5	$9.51 \times 10^{-5}$	$3.60 \times 10^{-5}$	37.8
		$9.51 \times 10^{-5}$	$2.90 \times 10^{-5}$	30.5



## 5.6. Conclusiones generales.

El desarrollo de fármacos es un proceso complejo el cual inicia con la identificación de compuestos que muestran actividad biológica en un ensayo de tamizaje. La mayoría de los medicamentos que están en uso clínico son el resultado de un proceso de investigación muy complejo. Por ello, es necesaria la unión de esfuerzos de diferentes disciplinas científicas para descubrir y desarrollar medicamentos con efectos clínicos benéficos y efectos secundarios mínimos. Se estima que de cada 9.000 moléculas biológicamente activas solo una tiene uso clínico.

Los resultados presentados en este trabajo de tesis doctoral indican que los complejos de cobre(II) estudiados ejercen sus efectos citotóxicos a través de mecanismos de muerte que conllevan a un aumento del estrés oxidativo, una disminución de los niveles de GSH con el consecuente arresto del ciclo celular y/o la inducción de apoptosis. Asimismo estos compuestos inducen genotoxicidad provocada por un daño oxidativo a nivel del ADN. En modelos tridimensionales de células tumorales, también se pudieron encontrar efectos citotóxicos y sobre la invasión celular.

Por otro lado, cabe destacar que la eficacia de los compuestos tamizados aumenta con la cantidad admitida de cobre que está asociada a su vez con la lipofilia (y con las estructuras químicas). Los complejos ternarios con 2,2'biquinolina, SMTCu y SDQCu, resultaron ser los complejos más prometedores, ya que no solo se destacan del resto de los complejos de cobre de las otras familias estudiadas en forma individual sino incluso supera a Cu6MQ en mezcla uno a uno con Zn6MQ.

Asimismo, de los complejos de cobre con sulfonamidas, solo SDQCu, muestra un efecto sinérgico en un tratamiento combinado con radioterapia.



## 6. ANEXO 1. OTROS COMPLEJOS DE COORDINACIÓN DE CU(II) Y PT(II)

### 6.1. Introducción

En este anexo se presentan experimentos originalmente no incluidos ni contemplados dentro del plan de tesis, pero que se realizaron con el objetivo de ahondar en el efecto inducido por el cambio de metal de coordinación y su potencial efecto antitumoral y compararlo con las familias de complejos previamente expuestos. Los complejos que se mencionan a continuación se sintetizaron y caracterizaron con la colaboración del Ing. Cristian Villa y la Dra. Beatriz Soria en su laboratorio del CEQUINOR. Se presenta la síntesis y la caracterización fisicoquímica de algunos complejos de Cu(II) y Pt(II). Estos compuestos son complejos binarios de los ligandos 6-metoxiquinolina (6MQ), 5-nitro-8-hidroxiquinolina (NQ) y lamivudina (Lami). De los tres se pudieron obtener monocristales por lo que se hizo una caracterización detallada de la estructura cristalina. También se realizaron estudios de microanálisis elemental, análisis termogravimétricos y estudios espectroscópicos.

#### 6.1.1. Pt(6MQ)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>

**Síntesis:** En primer lugar, se intentó sin resultados positivos la síntesis de este compuesto según la metodología empleada para los complejos M(6MQ)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (M = Cu(II) y Zn(II)) que fue discutida anteriormente, pero utilizando K<sub>2</sub>PtCl<sub>4</sub> como precursor metálico. Finalmente, el complejo pudo ser obtenido como cristales amarillos pálidos al efectuar la reacción por el método solvotermal como se describe a continuación. En un recipiente de teflón se pusieron 0.2 mmol de 6MQ, 0.1 mmol de K<sub>2</sub>PtCl<sub>4</sub> o Pt(DMSO)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y una mezcla CH<sub>3</sub>CN / MeOH (1:4; 15 mL); el recipiente se cerró y se introdujo en un reactor de acero inoxidable que fue mantenido a 100°C durante 72 h en una estufa. Pasado el tiempo de reacción, se dejó enfriar lentamente el sistema, una vez alcanzada la temperatura ambiente se abrió el reactor y se filtró el material cristalino. Se obtuvo el mismo compuesto al emplear cualquiera de las dos sales de Pt(II). Los cristales obtenidos fueron sometidos a su estudio por microanálisis elemental y por difracción de rayos X de monocristal. Análisis elemental para PtC<sub>20</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (PM: 584.4): Experimental (Calculado): C, 39.73 (41.11); H, 3.21 (3.10); N, 4.97 (4.79) %. La reacción tiene un rendimiento del 78.2 % a partir de K<sub>2</sub>PtCl<sub>4</sub>. Este compuesto es muy insoluble en los solventes de uso común en el laboratorio. Al no ser soluble en ningún solvente compatible con ensayos biológicos, no se pudieron realizar estudios de este tipo para este compuesto.

**Estructura:** El complejo es isoestructural a su análogo de Cu (II), estando el Pt (II) rodeado por dos átomos de cloro y dos ligandos 6MeQ que coordinan a través del átomo de Nitrógeno (Figura 6.1-2). El centro metálico está posicionado en un centro de inversión con un entorno PtN<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> cuadrado plano. Cristaliza en el sistema monoclinico 14 (P21/n) con a = 4.66370 Å, b = 12.6279 Å, c = 16.3712 Å, β = 96.220 °, V = 958.467 Å<sup>3</sup> y Z = 2.

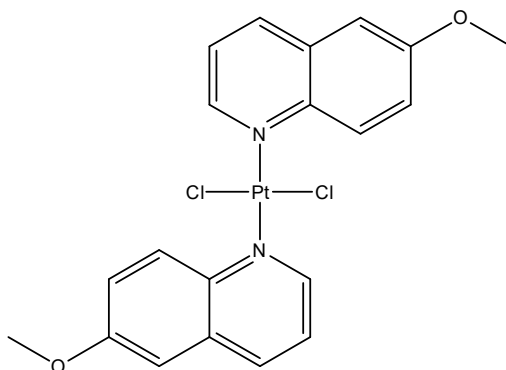


Figura 6.1-1. Estructura molecular del complejo  $Pt(6-MeQ)_2Cl_2$ .

Comportamiento térmico: Como método de confirmación de la estructura encontrada mediante el análisis de DRX y para estudiar el comportamiento térmico del compuesto se hicieron medidas termogravimétricas (equipo Shimadzu TG-50) en atmósfera oxidante entre la temperatura ambiente y 800 °C, con una velocidad de calentamiento de 5°C min<sup>-1</sup>, un flujo de O<sub>2</sub> de 50 mL min<sup>-1</sup> y empleando N<sub>2</sub> como gas de arrastre (20 mL min<sup>-1</sup>). El compuesto es estable hasta los 130 °C; una vez alcanzada esa temperatura empieza la descomposición. Inicialmente se pierden las dos moléculas de 6MQ siguiendo un proceso en tres etapas (Experimental: 55.8 % vs Calculado: 54.5 %). Posteriormente, el PtCl<sub>2</sub> obtenido empieza a descomponerse a 705°C, dejando como residuo final Pt metálico (esperado: 12.1 % vs encontrado: 12.0 %).

### 6.1.2. Pt(DMSO)(NQ)Cl

En años recientes, el ligando 8-hidroxiquinolina y sus derivados han despertado interés en la química medicinal. Sus propiedades antitumorales y antineoplásicas han sido evaluadas [386,387]. Por ejemplo, Chan y colaboradores, reportaron una serie de derivados de este ligando, entre esos compuestos, encontraron que el 8-hidroxi-2-quinolinacarbaldéido tiene buena capacidad citotóxica *in vitro* sobre células de carcinoma humano [388]. Por otro lado, el grupo de Barilli reportó la citotoxicidad de complejos de coordinación de la 8-hidroxiquinolina sobre la línea celular HeLa [389]. El complejo de cobre de 5-cloro-7-yodo-8-hidroxiquinolina exhibe potencial anticancerígeno con efectos adversos menores, según los estudios de Tardito, et. al. [159]. En cuanto al ligando 5-nitro-8-hidroxiquinolina (Figura 6.1-2), algunos complejos de coordinación han sido reportados [390], pero sus actividades biológicas y en especial, su capacidad antitumoral, no han sido estudiadas en detalle [157,391]. Las propiedades biológicas de un

Figura 6.1-2. Fórmula estructural del ligando NQ.

complejo de Fe(III) con el ligando NQ fueron estudiadas, incluyendo su capacidad citotóxica y de interacción con el ADN y sobre una serie de líneas celulares tumorales [392].

Síntesis: Este complejo se obtuvo al agregar 0.1 mmol de Pt(DMSO)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> sobre 0.2 mmol de NQ y 0.2 mmol de KOH. Se produjo un sólido amarillo que fue filtrado. La solución madre se reservó, y después de algunos días se obtuvieron cristales aptos para la determinación cristalográfica de la estructura del compuesto.

Estructura: Este complejo posee una geometría aproximadamente cuadrado plana alrededor del átomo de Pt(II), el cual está unido al ligando NQ a través del nitrógeno quinolínico y del oxígeno del grupo 8-hidroxi. La tercera y cuarta posición del entorno de coordinación están ocupadas por una molécula de dimetilsulfóxido (coordinada por el átomo de azufre) y un átomo de cloro, respectivamente. El compuesto cristaliza en el sistema monoclinico (P21/c), con  $a = 6.7297 \text{ \AA}$ ,  $b = 24.872 \text{ \AA}$ ,  $c = 8.1534 \text{ \AA}$ ,  $\beta = 94.580^\circ$ ,  $V = 1360.37 \text{ \AA}^3$  y  $Z = 4$ .

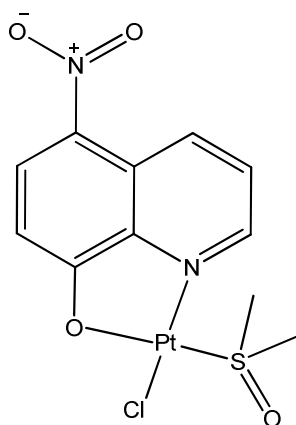


Figura 6.1-3. Estructura molecular del complejo Pt(NQ)(DMSO)Cl.

Ensayo de viabilidad celular en diferentes líneas.

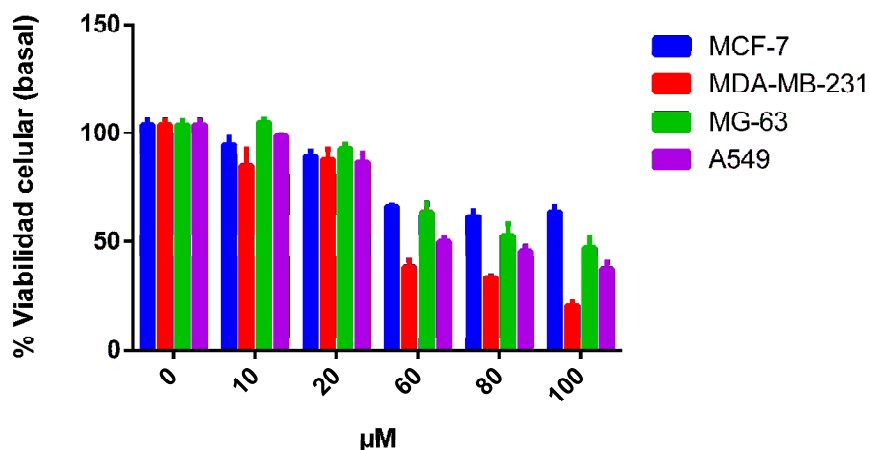


Figura 6.1-4. Efecto en la viabilidad celular del complejo Pt(NQ)(DMSO)Cl en células MCF-7, MDA-MB-231, MG-63 y A549.

Tabla 6.1-1. Valores de IC50 del complejo PtNQ en diferentes líneas celulares tratadas durante 24 horas.

	MCF-7	MDA-MB-231	MG-63	A549
PtNQ	>100	48.8 ± 8.3	87.9 ± 11.1	67.7 ± 13.2

### 6.1.3. $\text{Cu}(\text{Lami})_4(\text{ClO}_4)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$

La lamivudina es un compuesto análogo estructuralmente al nucleósido citidina, se emplea como antirretroviral en el tratamiento de virus como la hepatitis B o el VIH. Actúa sobre la transcriptasa inversa de los virus impidiendo la replicación de estos. El compuesto inhibe competitivamente a la enzima al competir por el centro activo con el nucleótido timina [393]. En la bibliografía, solamente se ha encontrado un reporte de un complejo de coordinación con este ligando, de Ru(II) con los coligandos trifenilfosfina y 2,2-bipiridina, sin embargo, solo se hace un análisis de la estructura cristalina del compuesto [394].

Figura 6.1-5. Fórmula estructural del ligando Lamivudina.

Síntesis: se pesaron 1.0 mmol de Lamivudina y se disolvieron en 5 mL de  $\text{H}_2\text{O}$ , posteriormente se agregaron 0.5 mmol de  $\text{CuClO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (en 0.4 mL de  $\text{H}_2\text{O}$ ) bajo continua agitación a temperatura ambiente. Inmediatamente se formó un precipitado de color lila que fue centrifugado y lavado varias veces con  $\text{H}_2\text{O}$  destilada. La solución sobrenadante se reservó y algunos días después se separaron monocristales del mismo color que fueron aptos para su determinación estructural por medio de Difracción de Rayos X en monocristal. Si bien los datos recopilados no son de buena calidad, si fue posible obtener la estructura del compuesto. Se hicieron medidas de microanálisis elemental que soportan la fórmula encontrada por DRX. Análisis elemental para  $\text{CuC}_{32}\text{H}_{50}\text{N}_{12}\text{O}_{23}\text{S}_4\text{Cl}_2$  (PM: 1233.5): Experimental (Calculado): C, 30.58 (31.16); H, 3.96 (4.09); N, 13.22 (13.63); S, 10.62 (10.40) %. El complejo es muy soluble en agua.

Estructura: El complejo cristaliza en el sistema ortorrómbico (P212121) con  $a = 12.0747$ ,  $b = 24.0204$  y  $c = 35.2766$  Å, un volumen de celda unidad de  $10231.6$  Å<sup>3</sup> y  $Z = 8$ .

Cada átomo de Cu(II) está rodeado por 4 ligandos lamivudina que coordinan a través del nitrógeno 3 (ver la Figura 6.1-5), dando lugar a una esfera de coordinación  $\text{CuN}_4$  cuadrada plana. La neutralidad de cargas se logra con la presencia de dos contraiones perclorato por cada átomo de cobre. En la estructura cristalina, además de lo anterior, se encontró que existen dos unidades asimétricas, y que el segmento 1,3-oxatiolano está altamente desordenado en una de las cuatro lamivudinas, de una de las unidades asimétricas. Se observó además la presencia de una cantidad indeterminada de moléculas de agua en la esfera de solvatación, que no pudieron ser ubicadas espacialmente en la red cristalina,



debido a un alto desorden. Para determinar la cantidad de moléculas de agua en la esfera de solvatación, se realizaron medidas termogravimétricas, encontrándose una pérdida de masa del 4.9 % por debajo de los 100°C, lo que corresponde a 3 moléculas de agua. Esto está de acuerdo con los resultados del análisis elemental. En la Figura 6.1-6, se presentan la estructura molecular del complejo.

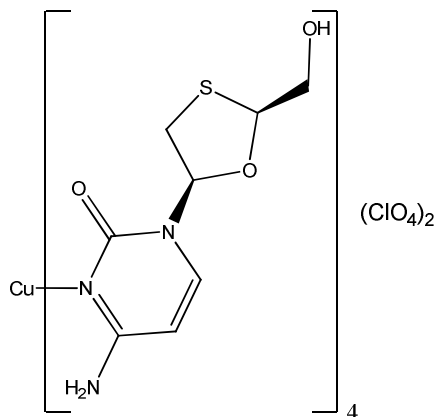


Figura 6.1-6. Estructura molecular del complejo  $\text{Cu}(\text{Lami})_4(\text{ClO}_4)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ .

#### Citotoxicidad, Ensayo del MTT:

Se evaluó el carácter citotóxico de este complejo frente a la línea celular A549, y no se encontró ningún efecto sobre la viabilidad celular en el rango de concentraciones estudiado (0 - 500  $\mu\text{M}$ ), por lo que no se profundizó en los estudios biológicos.



## 7. Publicaciones científicas y comunicaciones a congresos

### 7.1. Artículos científicos

León IE, Cadavid-Vargas JF, Resasco A, et al. (2016) In vitro and in vivo antitumor effects of the VO-chrysin complex on a new three-dimensional osteosarcoma spheroids model and a xenograft tumor in mice. *JBIC J Biol Inorg Chem* 21:1009–1020. doi: 10.1007/s00775-016-1397-0 (Con referato)

Cadavid-Vargas JF, León IE, Etcheverry SB, et al. (2016) Copper(II) complexes with saccharinate and glutamate as antitumor agents. Cyto- and genotoxicity in human osteosarcoma cells. *Anticancer. Agents Med. Chem.* Vol 17, Issue 3. doi: 10.2174/1871520616666160513130204 (Con referato)

Villa-Pérez C, Cadavid-Vargas JF, Camí GE, et al. (2016) Synthesis, physicochemical and biological studies of a ternary Co(II) complex with sulfaquinoxaline and 2,2'-bipyrimidine as ligands. *Inorganica Chim Acta* 447:127–133. doi: 10.1016/j.ica.2016.03.043 (Con referato)

León IE, Cadavid-Vargas JF, Di Virgilio AL, Etcheverry S (2016) Vanadium, Ruthenium and Copper compounds: a new class of non-platinum metallodrugs with anticancer activity. *Curr. Med. Chem.* Vol 23, issue 30. doi: 10.2174/0929867323666160824162546 (Con referato)

León IE, Cadavid-Vargas JF, Tiscornia I, et al. (2015) Oxidovanadium(IV) complexes with chrysin and silibinin: anticancer activity and mechanisms of action in a human colon adenocarcinoma model. *J Biol Inorg Chem* 20:1175–91. doi: 10.1007/s00775-015-1298-7 (Con referato)

Villa-Perez C, Cadavid-Vargas JF, Di Virgilio A.L., Echeverría, G.A., Camí, G.E., Soria, D.B. (2018) Crystal structure, Hirshfield surface analysis, spectroscopic and biological studies on sulfamethazine and sulfaquinoxaline ternary complexes with 2,2'-Biquinoline. *New Journal of Chemistry* 42:891-901 doi: 10.1039/c7nj03624h (Con referato).

Kljun, J., León, I.E., Peršič., Cadavid-Vargas JF, Etcheverry S.B., He, W., Bai, Y., Turel, I. (2018) Synthesis and biological characterization of organoruthenium complexes with 8-hydroxyquinolines. *Journal of Inorganic Biochemistry* 186:187-196 doi: 10.1016/j.jinorgbio.2018.05.009 (Con referato).

J.F. Cadavid-Vargas, C. Villa-Pérez, M.C. Ruiz, I.E. León, G.C. Valencia-Uribe, D.B. Soria, S.B. Etcheverry, A.L. Di Virgilio, 6-Methoxyquinoline complexes as lung carcinoma agents: induction of oxidative damage on A549 monolayer and multicellular spheroid model, *JBIC J. Biol. Inorg. Chem.* (2019). doi:10.1007/s00775-019-01644-7. (Con referato).

### 7.2. Comunicaciones a congresos y otras reuniones científicas.

Complejos de Cu (II) como potenciales antitumorales. Cito- y genotoxicidad en osteoblastos en cultivo. KLIII Congreso Argentino de genética. San Carlos de Bariloche, Argentina. Octubre 19-22 de 2014.

Antitumor Properties and Nuclease Activity of Platinum (II) Complexes Based on Hydroxyquinoline Ligands in a Human Osteosarcoma Cell Line and Plasmid DNA. XXVI International Symposia on Metal Complexes – ISMEC 2015. Wroclaw, Polonia. Junio 24 -28 de 2015

Platinum (II) complexes based on hydroxyquinoline ligands. Antitumor effects in 2D and 3D human osteosarcoma models. 17th international conference on biological inorganic chemistry – ISMEC 2015. Beijing, China. Junio 20-24 de 2015.

Synthesis and characterization of novel metal complexes of 6-methoxyquinoline: 1O2(1Δg) photosensitizing capacity and biological activity. 25th Interamerican Photochemical Society (IAPS) Meeting. Santiago de Chile, Chile. Mayo 24-27 de 2016.

Cyto- and genotoxicity of ruthenium - clioquinol complex against 2D and 3D human osteosarcoma models. X congreso Asociación Latinoamericana de Mutagénesis, Carcinogénesis y Teratogénesis Ambiental (ALAMCTA). Montevideo, Uruguay. Octubre 13-15 de 2016.

Transition metal complexes with 6-Methoxyquinoline as antitumor agents. Biological studies on two and three-dimensional cell culture models. LXI Reunión anual de la Sociedad Argentina de Investigación clínica – SAIC. Mar del Plata, Argentina. Noviembre 15 – 19 de 2016.

## 8. Referencias bibliográficas.

- [1] National Cancer Institute, What Is Cancer?, (s/f).
- [2] H.W. Jackson, V. Defamie, P. Waterhouse, R. Khokha, TIMPs: versatile extracellular regulators in cancer, *Nat. Rev. Cancer*. 17 (2017) 38–53. doi:10.1038/nrc.2016.115.
- [3] K.R. Harrap, Preclinical studies identifying carboplatin as a viable cisplatin alternative, *Cancer Treat. Rev.* 12 (1985) 21–33. doi:10.1016/0305-7372(85)90015-5.
- [4] D. Hanahan, R.A. Weinberg, The Hallmarks of Cancer, *Cell*. 100 (2000) 57–70. doi:10.1016/S0092-8674(00)81683-9.
- [5] D. Hanahan, R.A. Weinberg, Hallmarks of Cancer: The Next Generation, *Cell*. 144 (2011) 646–674. doi:10.1016/J.CELL.2011.02.013.
- [6] J. Luo, N.L. Solimini, S.J. Elledge, Principles of Cancer Therapy: Oncogene and Non-oncogene Addiction, *Cell*. 136 (2009) 823–837. doi:10.1016/J.CELL.2009.02.024.
- [7] G. Kroemer, J. Pouyssegur, Tumor Cell Metabolism: Cancer’s Achilles’ Heel, *Cancer Cell*. 13 (2008) 472–482. doi:10.1016/J.CCR.2008.05.005.
- [8] J. Ferlay, H.-R. Shin, F. Bray, D. Forman, C. Mathers, D.M. Parkin, Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008, *Int. J. Cancer*. 127 (2010) 2893–2917. doi:10.1002/ijc.25516.
- [9] C. Fitzmaurice, C. Allen, R.M. Barber, L. Barregard, Z.A. Bhutta, H. Brenner, D.J. Dicker, O. Chimed-Orchir, R. Dandona, L. Dandona, T. Fleming, M.H. Forouzanfar, J. Hancock, R.J. Hay, R. Hunter-Merrill, C. Huynh, H.D. Hosgood, C.O. Johnson, J.B. Jonas, J. Khubchandani, G.A. Kumar, M. Kutz, Q. Lan, H.J. Larson, X. Liang, S.S. Lim, A.D. Lopez, M.F. MacIntyre, L. Marczak, N. Marquez, A.H. Mokdad, C. Pinho, F. Pourmalek, J.A. Salomon, J.R. Sanabria, L. Sandar, B. Sartorius, S.M. Schwartz, K.A. Shackelford, K. Shibuya, J. Stanaway, C. Steiner, J. Sun, K. Takahashi, S.E. Vollset, T. Vos, J.A. Wagner, H. Wang, R. Westerman, H. Zeeb, L. Zoeckler, F. Abd-Allah, M.B. Ahmed, S. Alabed, N.K. Alam, S.F. Aldhahri, G. Alem, M.A. Alemayohu, R. Ali, R. Al-Raddadi, A. Amare, Y. Amoako, A. Artaman, H. Asayesh, N. Atnafu, A. Awasthi, H.B. Saleem, A. Barac, N. Bedi, I. Bensenor, A. Berhane, E. Bernabé, B. Betsu, A. Binagwaho, D. Boneya, I. Campos-Nonato, C. Castañeda-Orjuela, F. Catalá-López, P. Chiang, C. Chibueze, A. Chittheer, J.-Y. Choi, B. Cowie, S. Damtew, J. das Neves, S. Dey, S. Dharmaratne, P. Dhillon, E. Ding, T. Driscoll, D. Ekwueme, A.Y. Endries, M. Farvid, F. Farzadfar, J. Fernandes, F. Fischer, T.T. G/hiwot, A. Gebru, S. Gopalani, A. Hailu, M. Horino, N. Horita, A. Hussein, I. Huybrechts, M. Inoue, F. Islami, M. Jakovljevic, S. James, M. Javanbakht, S.H. Jee, A. Kasaeian, M.S. Kedir, Y.S. Khader, Y.-H. Khang, D. Kim, J. Leigh, S. Linn, R. Lunevicius, H.M.A. El Razek, R. Malekzadeh, D.C. Malta, W. Marcenes, D. Markos, Y.A. Melaku, K.G. Meles, W. Mendoza, D.T. Mengiste, T.J. Meretoja, T.R. Miller, K.A. Mohammad, A. Mohammadi, S. Mohammed, M. Moradi-Lakeh, G. Nagel, D. Nand, Q. Le Nguyen, S. Nolte, F.A. Ogbo, K.E. Oladimeji, E. Oren, M. Pa, E.-K. Park, D.M. Pereira, D. Plass, M. Qorbani, A. Radfar, A. Rafay, M. Rahman, S.M. Rana, K. Søreide, M. Satpathy, M. Sawhney, S.G. Sepanlou, M.A. Shaikh, J. She, I. Shiue, H.R. Shore, M.G. Shrimme, S. So, S. Soneji, V.

- Stathopoulou, K. Stroumpoulis, M.B. Sufiyan, B.L. Sykes, R. Tabarés-Seisdedos, F. Tadese, B.A. Tedla, G.A. Tessema, J.S. Thakur, B.X. Tran, K.N. Ukwaja, B.S.C. Uzochukwu, V.V. Vlassov, E. Weiderpass, M. Wubshet Terefe, H.G. Yebyo, H.H. Yimam, N. Yonemoto, M.Z. Younis, C. Yu, Z. Zaidi, M.E.S. Zaki, Z.M. Zenebe, C.J.L. Murray, M. Naghavi, Global, Regional, and National Cancer Incidence, Mortality, Years of Life Lost, Years Lived With Disability, and Disability-Adjusted Life-years for 32 Cancer Groups, 1990 to 2015, *JAMA Oncol.* 3 (2017) 524. doi:10.1001/jamaoncol.2016.5688.
- [10] Y. Enomoto, N. Inui, K. Yoshimura, K. Nishimoto, K. Mori, M. Kono, T. Fujisawa, N. Enomoto, Y. Nakamura, T. Iwashita, T. Suda, Lung cancer development in patients with connective tissue disease-related interstitial lung disease, *Medicine (Baltimore)*. 95 (2016) e5716. doi:10.1097/MD.0000000000005716.
- [11] P. Goldstraw, New TNM classification : achievements and hurdles, 2 (2013) 264–272. doi:10.3978/j.issn.2218-6751.2013.07.02.
- [12] J. Reedijk, Metal-ligand exchange kinetics in platinum and ruthenium complexes: Significance for effectiveness as anticancer drugs, *Platin. Met. Rev.* 52 (2008) 2–11. doi:10.1595/147106708X255987.
- [13] J. Reedijk, New clues for platinum antitumor chemistry: Kinetically controlled metal binding to DNA, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100 (2003) 3611–3616. doi:10.1073/pnas.0737293100.
- [14] T. Storr, K.H. Thompson, C. Orvig, Design of targeting ligands in medicinal inorganic chemistry, *Chem. Soc. Rev.* 35 (2006) 534–544. doi:10.1039/b514859f.
- [15] M. Peyrone, Ueber die Einwirkung des Ammoniaks auf Platinchlorür, *Justus Liebigs Ann. Chem.* 51 (1844) 1–29. doi:10.1002/jlac.18440510102.
- [16] D. Shaloam, P.B. Tchounwou, Cisplatin in cancer therapy: Molecular mechanisms of action, *Eur. J. Pharmacol.* 740 (2014) 364–378. doi:10.1016/j.ejphar.2014.07.025.Cisplatin.
- [17] Bristol-Myers Squibb, PLATINOL<sup>®</sup> (cisplatin for injection, USP), s/f.
- [18] I.A. Riddell, S.J. Lippard, Cisplatin and oxaliplatin: Our current understanding of their actions, 2018. doi:10.1515/9783110470734-001.
- [19] S. Wang, H. Zhang, L. Cheng, C. Evans, C.-X. Pan, Analysis of the cytotoxic activity of carboplatin and gemcitabine combination., *Anticancer Res.* 30 (2010) 4573–8.
- [20] D. Lebwohl, R. Canetta, Clinical development of platinum complexes in cancer therapy: An historical perspective and an update, *Eur. J. Cancer.* 34 (1998) 1522–1534. doi:10.1016/S0959-8049(98)00224-X.
- [21] A. Markowska, B. Kasprzak, K. Jaszczyńska-Nowinka, J. Lubin, J. Markowska, Noble metals in oncology, *Wspolczesna Onkol.* 19 (2015) 271–275. doi:10.5114/wo.2015.54386.
- [22] U. Ndagi, N. Mhlongo, M.E. Soliman, Metal complexes in cancer therapy – An update from drug design perspective, *Drug Des. Devel. Ther.* 11 (2017) 599–616.

- doi:10.2147/DDDT.S119488.
- [23] M. Frezza, S. Hindo, D. Chen, A. Davenport, S. Schmitt, D. Tomco, Q. Ping Dou, Novel Metals and Metal Complexes as Platforms for Cancer Therapy, *Curr. Pharm. Des.* 16 (2010) 1813–1825. doi:10.2174/138161210791209009.
- [24] M. a Jakupec, M. Galanski, V.B. Arion, C.G. Hartinger, B.K. Keppler, Antitumour metal compounds: more than theme and variations., *Dalton Trans.* (2008) 183–194. doi:10.1039/b712656p.
- [25] A.A. Adeniyi, P.A. Ajibade, An insight into the anticancer activities of Ru(II)-based metallocompounds using docking methods, *Molecules.* 18 (2013) 10829–10856. doi:10.3390/molecules180910829.
- [26] N.P.E. Barry, P.J. Sadler, Exploration of the medical periodic table: towards new targets., *Chem. Commun. (Camb).* 49 (2013) 5106–31. doi:10.1039/c3cc41143e.
- [27] K.D. Mjos, C. Orvig, Metallodrugs in medicinal inorganic chemistry., *Chem. Rev.* 114 (2014) 4540–63. doi:10.1021/cr400460s.
- [28] J.L. Burkhead, K.A. Gogolin Reynolds, S.E. Abdel-Ghany, C.M. Cohu, M. Pilon, Copper homeostasis, *New Phytol.* 182 (2009) 799–816. doi:10.1111/j.1469-8137.2009.02846.x.
- [29] L.H. Doerrer, Cu in biology: Unleashed by O<sub>2</sub> and now irreplaceable, *Inorganica Chim. Acta.* (2017). doi:10.1016/j.ica.2017.11.051.
- [30] C. Santini, M. Pellei, V. Gandin, M. Porchia, F. Tisato, C. Marzano, Advances in copper complexes as anticancer agents, *Chem. Rev.* 114 (2014) 815–862. doi:10.1021/cr400135x.
- [31] I.E. León, J.J.F. Cadavid-Vargas, A.L.A. Di Virgilio, S. Etcheverry, I. Leon, J.J.F. Cadavid-Vargas, A.L.A. Di Virgilio, S. Etcheverry, Vanadium, Ruthenium and Copper Compounds: A New Class of Nonplatinum Metallodrugs with Anticancer Activity, *Curr. Med. Chem.* 24 (2017) 112–148. doi:10.2174/0929867323666160824162546.
- [32] C. Marzano, M. Pellei, F. Tisato, C. Santini, Copper complexes as anticancer agents., *Anticancer. Agents Med. Chem.* 9 (2009) 185–211.
- [33] I. Iakovidis, I. Delimaris, S.M. Piperakis, Copper and Its Complexes in Medicine: A Biochemical Approach, *Mol. Biol. Int.* 2011 (2011) 1–13. doi:10.4061/2011/594529.
- [34] E.J. Baran, *Química bioinorgánica*, 1a ed., McGraw-Hill, Madrid, 1995.
- [35] M.C. Linder, M. Hazegh-Azam, Copper biochemistry and molecular biology., *Am. J. Clin. Nutr.* 63 (1996) 797S–811S. doi:10.1093/ajcn/63.5.797.
- [36] D.B. Milne, Copper intake and assessment of copper status, *Am. J. Clin. Nutr.* 67 (1998). doi:10.1093/ajcn/67.5.1041S.
- [37] G. Crisponi, V.M. Nurchi, D. Fanni, C. Gerosa, S. Nemolato, G. Faa, Copper-related diseases: From chemistry to molecular pathology, *Coord. Chem. Rev.* 254 (2010) 876–889. doi:10.1016/j.ccr.2009.12.018.

- [38] S. Lutsenko, Human copper homeostasis: a network of interconnected pathways, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 14 (2010) 211–217. doi:10.1016/j.cbpa.2010.01.003.
- [39] M.E. Bravo-Gómez, A. Espinoza-Guillén, S.C. Blum, N.B. Behrens, Metalochaperonas: Escoltas personales en el tráfico intracelular de iones metálicos, *Educ. Quim.* 26 (2015) 26–37. doi:10.1016/S0187-893X(15)72095-1.
- [40] I. Scheiber, R. Dringen, J.F.B. Mercer, Copper: Effects of Deficiency and Overload, en: *Met. Ions Life Sci.*, 2013: pp. 359–387. doi:10.1007/978-94-007-7500-8\_11.
- [41] L. Banci, I. Bertini, K.S. McGreevy, A. Rosato, Molecular recognition in copper trafficking, *Nat. Prod. Rep.* 27 (2010) 695. doi:10.1039/b906678k.
- [42] H.L. Londoño Suárez, Enfermedad de Menkes, *MedUNAB.* 13 (2011) 169–172.
- [43] R. Nath, Copper deficiency and heart disease: molecular basis, recent advances and current concepts., *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 29 (1997) 1245–54.
- [44] I.F. Scheiber, J.F.B. Mercer, R. Dringen, Metabolism and functions of copper in brain., *Prog. Neurobiol.* 116 (2014) 33–57. doi:10.1016/j.pneurobio.2014.01.002.
- [45] R. Ojha, A.N. Prasad, Menkes disease: What a multidisciplinary approach can do, *J. Multidiscip. Healthc.* 9 (2016) 371–385. doi:10.2147/JMDH.S93454.
- [46] R. Rosencrantz, M. Schilsky, Wilson disease: pathogenesis and clinical considerations in diagnosis and treatment., *Semin. Liver Dis.* 31 (2011) 245–59. doi:10.1055/s-0031-1286056.
- [47] European Association for the Study of the Liver, EASL Clinical Practice Guidelines: Wilson’s disease (European association or the study of the liver, *J. Hepatol.* 56 (2012) 671–685. doi:10.1016/j.jhep.2011.11.007.
- [48] H.W. Kuo, S.F. Chen, C.C. Wu, D.R. Chen, J.H. Lee, Serum and tissue trace elements in patients with breast cancer in Taiwan., *Biol. Trace Elem. Res.* 89 (2002) 1–11. doi:10.1385/BTER:89:1:1.
- [49] A. Gupte, R.J. Mumper, Elevated copper and oxidative stress in cancer cells as a target for cancer treatment, *Cancer Treat. Rev.* 35 (2009) 32–46. doi:10.1016/j.ctrv.2008.07.004.
- [50] S.B. Nayak, V.R. Bhat, D. Upadhyay, S.L. Udupa, Copper and ceruloplasmin status in serum of prostate and colon cancer patients., *Indian J. Physiol. Pharmacol.* 47 (2003) 108–10.
- [51] M. Díez, M. Arroyo, F.J. Cerdán, M. Muñoz, M.A. Martín, J.L. Balibrea, Serum and tissue trace metal levels in lung cancer., *Oncology.* 46 (1989) 230–4.
- [52] L. Turecký, P. Kalina, E. Uhlíková, S. Námerová, J. Krizko, Serum ceruloplasmin and copper levels in patients with primary brain tumors., *Klin. Wochenschr.* 62 (1984) 187–9.
- [53] B.R. McAuslan, W. Reilly, Endothelial cell phagocytosis in response to specific metal ions., *Exp. Cell Res.* 130 (1980) 147–57.



- [54] D. Chen, V. Milacic, M. Frezza, Q.P. Dou, Metal complexes, their cellular targets and potential for cancer therapy., *Curr. Pharm. Des.* 15 (2009) 777–91.
- [55] H. Wei, W.-J. Zhang, R. Leboeuf, B. Frei, Copper induces--and copper chelation by tetrathiomolybdate inhibits--endothelial activation in vitro., *Redox Rep.* 19 (2014) 40–8. doi:10.1179/1351000213Y.0000000070.
- [56] C.N. Hancock, L.H. Stockwin, B. Han, R.D. Divilbiss, J.H. Jun, S. V Malhotra, M.G. Hollingshead, D.L. Newton, A copper chelate of thiosemicarbazone NSC 689534 induces oxidative/ER stress and inhibits tumor growth in vitro and in vivo., *Free Radic. Biol. Med.* 50 (2011) 110–21. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2010.10.696.
- [57] C.A. Bolos, A.T. Chaviara, D. Mourelatos, Z. Iakovidou, E. Mioglou, E. Chrysogelou, A. Papageorgiou, Synthesis, characterization, toxicity, cytogenetic and in vivo antitumor studies of 1,1-dithiolate Cu(II) complexes with di-, tri-, tetra- amines and 1,3-thiazoles. Structure-activity correlation., *Bioorg. Med. Chem.* 17 (2009) 3142–51. doi:10.1016/j.bmc.2009.02.059.
- [58] F. Carvallo-Chaigneau, C. Trejo-Solís, C. Gómez-Ruiz, E. Rodríguez-Aguilera, L. Macías-Rosales, E. Cortés-Barberena, C. Cedillo-Peláez, I. Gracia-Mora, L. Ruiz-Azuara, V. Madrid-Marina, F. Constantino-Casas, Casiopeína III-ia induces apoptosis in HCT-15 cells in vitro through caspase-dependent mechanisms and has antitumor effect in vivo., *Biometals.* 21 (2008) 17–28. doi:10.1007/s10534-007-9089-4.
- [59] M.R. Taylor, E.J. Gabe, J.P. Glusker, J.A. Minkin, A.L. Patterson, The crystal structures of compounds with antitumor activity. 2-keto-3-ethoxybutyraldehyde bis(thiosemicarbazone) and its cupric complex., *J. Am. Chem. Soc.* 88 (1966) 1845–6.
- [60] P. Wolohan, J. Yoo, M.J. Welch, D.E. Reichert, QSAR studies of copper azamacrocycles and thiosemicarbazones: MM3 parameter development and prediction of biological properties., *J. Med. Chem.* 48 (2005) 5561–9. doi:10.1021/jm0501376.
- [61] H. Zhang, R. Thomas, D. Oupicky, F. Peng, Synthesis and characterization of new copper thiosemicarbazone complexes with an ONNS quadridentate system: cell growth inhibition, S-phase cell cycle arrest and proapoptotic activities on cisplatin-resistant neuroblastoma cells., *J. Biol. Inorg. Chem.* 13 (2008) 47–55. doi:10.1007/s00775-007-0299-6.
- [62] M. Belicchi Ferrari, F. Bisceglie, G. Pelosi, P. Tarasconi, R. Albertini, P.P. Dall’Aglia, S. Pinelli, A. Bergamo, G. Sava, Synthesis, characterization and biological activity of copper complexes with pyridoxal thiosemicarbazone derivatives. X-ray crystal structure of three dimeric complexes., *J. Inorg. Biochem.* 98 (2004) 301–12.
- [63] M. Privat, C. Aubel, S. Arnould, Y. Communal, M. Ferrara, Y.-J. Bignon, Breast cancer cell response to genistein is conditioned by BRCA1 mutations., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 379 (2009) 785–9. doi:10.1016/j.bbrc.2008.12.151.
- [64] Y. Sánchez, D. Amrán, E. de Blas, P. Aller, Regulation of genistein-induced differentiation in human acute myeloid leukaemia cells (HL60, NB4) Protein kinase

- modulation and reactive oxygen species generation., *Biochem. Pharmacol.* 77 (2009) 384–96. doi:10.1016/j.bcp.2008.10.035.
- [65] X. Chen, L.-J. Tang, Y.-N. Sun, P.-H. Qiu, G. Liang, Syntheses, characterization and antitumor activities of transition metal complexes with isoflavone., *J. Inorg. Biochem.* 104 (2010) 379–84. doi:10.1016/j.jinorgbio.2009.11.008.
- [66] R.M.S. Pereira, N.E.D. Andrades, N. Paulino, A.C.H.F. Sawaya, M.N. Eberlin, M.C. Marcucci, G.M. Favero, E.M. Novak, S.P. Bydlowski, Synthesis and characterization of a metal complex containing naringin and Cu, and its antioxidant, antimicrobial, antiinflammatory and tumor cell cytotoxicity., *Molecules.* 12 (2007) 1352–66.
- [67] M. Tan, J. Zhu, Y. Pan, Z. Chen, H. Liang, H. Liu, H. Wang, Synthesis, cytotoxic activity, and DNA binding properties of copper (II) complexes with hesperetin, naringenin, and apigenin., *Bioinorg. Chem. Appl.* (2009) 347872. doi:10.1155/2009/347872.
- [68] J. Tan, B. Wang, L. Zhu, DNA binding and oxidative DNA damage induced by a quercetin copper(II) complex: potential mechanism of its antitumor properties., *J. Biol. Inorg. Chem.* 14 (2009) 727–39. doi:10.1007/s00775-009-0486-8.
- [69] P.A.M. Williams, J. Zinzuk, D.A. Barrio, O.E. Piro, O.R. Nascimento, S.B. Etcheverry, Potential antitumoral properties of a new copper complex with santonic acid., *Bioorg. Med. Chem.* 16 (2008) 4313–22. doi:10.1016/j.bmc.2008.02.075.
- [70] S.B. Etcheverry, A.L. Di Virgilio, O.R. Nascimento, P.A.M. Williams, Dinuclear copper(II) complexes with valsartan. Synthesis, characterization and cytotoxicity., *J. Inorg. Biochem.* 107 (2012) 25–33. doi:10.1016/j.jinorgbio.2011.10.005.
- [71] G.L. Eichhorn, Y.A. Shin, Interaction of Metal Ions with Polynucleotides and Related Compounds. XII. The Relative Effect of Various Metal Ions on DNA Helicity, *J. Am. Chem. Soc.* 90 (1968) 7323–7328. doi:10.1021/ja01028a024.
- [72] R. Buchtík, Z. Trávníček, J. Vančo, In vitro cytotoxicity, DNA cleavage and SOD-mimic activity of copper(II) mixed-ligand quinolinonato complexes., *J. Inorg. Biochem.* 116 (2012) 163–71. doi:10.1016/j.jinorgbio.2012.07.009.
- [73] F. Arjmand, M. Muddassir, A mechanistic approach for the DNA binding of chiral enantiomeric L- and D-tryptophan-derived metal complexes of 1,2-DACH: cleavage and antitumor activity., *Chirality.* 23 (2011) 250–9. doi:10.1002/chir.20907.
- [74] R. Buchtík, Z. Trávníček, J. Vančo, R. Herchel, Z. Dvořák, Synthesis, characterization, DNA interaction and cleavage, and in vitro cytotoxicity of copper(II) mixed-ligand complexes with 2-phenyl-3-hydroxy-4(1H)-quinolinone., *Dalton Trans.* 40 (2011) 9404–12. doi:10.1039/c1dt10674k.
- [75] W.H. Koppenol, The Haber-Weiss cycle--70 years later., *Redox Rep.* 6 (2001) 229–34. doi:10.1179/135100001101536373.
- [76] A.M. Fleming, J.G. Muller, I. Ji, C.J. Burrows, Characterization of 2'-deoxyguanosine oxidation products observed in the Fenton-like system Cu(II)/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/reductant in nucleoside and oligodeoxynucleotide contexts., *Org. Biomol. Chem.* 9 (2011) 3338–48. doi:10.1039/c1ob05112a.

- [77] J. Luis García-Giménez, M. González-Álvarez, M. Liu-González, B. Macías, J. Borrás, G. Alzuet, Toward the development of metal-based synthetic nucleases: DNA binding and oxidative DNA cleavage of a mixed copper(II) complex with N-(9H-purin-6-yl)benzenesulfonamide and 1,10-phenanthroline. Antitumor activity in human Caco-2 cells and Jurkat T lymphocy, *J. Inorg. Biochem.* 103 (2009) 923–934. doi:10.1016/j.jinorgbio.2009.04.003.
- [78] Y. Qin, L. Meng, C. Hu, W. Duan, Z. Zuo, L. Lin, X. Zhang, J. Ding, Gambogic acid inhibits the catalytic activity of human topoisomerase IIalpha by binding to its ATPase domain., *Mol. Cancer Ther.* 6 (2007) 2429–40. doi:10.1158/1535-7163.MCT-07-0147.
- [79] I.H. Hall, K. Taylor, M.C. Miller, X. Dothan, M.A. Khan, F.M. Bouet, Cytotoxicity of copper complexes of 2-furaldehyde oxime derivatives in murine and human tissue cultured cell lines., *Anticancer Res.* 17 2411–8.
- [80] B. Duff, V. Reddy Thangella, B.S. Creaven, M. Walsh, D.A. Egan, Anti-cancer activity and mutagenic potential of novel copper(II) quinolinone Schiff base complexes in hepatocarcinoma cells, *Eur. J. Pharmacol.* 689 (2012) 45–55. doi:10.1016/J.EJPBAR.2012.06.004.
- [81] Q.P. Dou, D.M. Smith, K.G. Daniel, A. Kazi, Interruption of tumor cell cycle progression through proteasome inhibition: implications for cancer therapy., *Prog. Cell Cycle Res.* 5 (2003) 441–6.
- [82] K.G. Daniel, P. Gupta, R.H. Harbach, W.C. Guida, Q.P. Dou, Organic copper complexes as a new class of proteasome inhibitors and apoptosis inducers in human cancer cells., *Biochem. Pharmacol.* 67 (2004) 1139–51. doi:10.1016/j.bcp.2003.10.031.
- [83] Z. Zhang, C. Bi, S.M. Schmitt, Y. Fan, L. Dong, J. Zuo, Q.P. Dou, 1,10-Phenanthroline promotes copper complexes into tumor cells and induces apoptosis by inhibiting the proteasome activity., *J. Biol. Inorg. Chem.* 17 (2012) 1257–67. doi:10.1007/s00775-012-0940-x.
- [84] I. Gracia-Mora, L. Ruiz-Ramírez, C. Gómez-Ruiz, M. Tinoco-Méndez, A. Márquez-Quiñones, L.R. De Lira, Á. Marín-Hernández, L. Macías-Rosales, M.E. Bravo-Gómez, Knight's move in the periodic table, from copper to platinum, novel antitumor mixed chelate copper compounds, casiopeinas, evaluated by an in vitro human and murine cancer cell line panel, *Met. Based. Drugs.* 8 (2001) 19–28. doi:10.1155/MBD.2001.19.
- [85] R. Galindo-Murillo, J. Hernandez-Lima, M. González-Rendón, F. Cortés-Guzmán, L. Ruíz-Azuara, R. Moreno-Esparza,  $\pi$ -Stacking between Casiopeinas® and DNA bases., *Phys. Chem. Chem. Phys.* 13 (2011) 14510–5. doi:10.1039/c1cp20183b.
- [86] J. Serment-Guerrero, P. Cano-Sanchez, E. Reyes-Perez, F. Velazquez-Garcia, M.E. Bravo-Gomez, L. Ruiz-Azuara, Genotoxicity of the copper antineoplastic coordination complexes casiopeinas., *Toxicol. In Vitro.* 25 (2011) 1376–84. doi:10.1016/j.tiv.2011.05.008.
- [87] D. Lahiri, R. Majumdar, D. Mallick, T.K. Goswami, R.R. Dighe, A.R. Chakravarty,

- Remarkable photocytotoxicity in hypoxic HeLa cells by a dipyridophenazine copper(II) Schiff base thiolate., *J. Inorg. Biochem.* 105 (2011) 1086–94. doi:10.1016/j.jinorgbio.2011.05.010.
- [88] P. Jaividhya, R. Dhivya, M.A. Akbarsha, M. Palaniandavar, Efficient DNA cleavage mediated by mononuclear mixed ligand copper(II) phenolate complexes: The role of co-ligand planarity on DNA binding and cleavage and anticancer activity, *J. Inorg. Biochem.* 114 (2012) 94–105. doi:10.1016/j.jinorgbio.2012.04.018.
- [89] X.-W. Li, Y.-J. Zheng, Y.-T. Li, Z.-Y. Wu, C.-W. Yan, Synthesis and structure of new bicopper(II) complexes bridged by N-(2-aminopropyl)-N'-(2-oxidophenyl)oxamide: the effects of terminal ligands on structures, anticancer activities and DNA-binding properties., *Eur. J. Med. Chem.* 46 (2011) 3851–7. doi:10.1016/j.ejmech.2011.05.053.
- [90] Q.-Y. Chen, H.-J. Fu, W.-H. Zhu, Y. Qi, Z.-P. Ma, K.-D. Zhao, J. Gao, Interaction with DNA and different effect on the nucleus of cancer cells for copper(II) complexes of N-benzyl di(pyridylmethyl)amine., *Dalton Trans.* 40 (2011) 4414–20. doi:10.1039/c0dt01616k.
- [91] E. Kimura, E. Kikuta, Why zinc in zinc enzymes? From biological roles to DNA base-selective recognition., *J. Biol. Inorg. Chem.* 5 (2000) 139–55.
- [92] D. Beyersmann, H. Haase, Functions of zinc in signaling, proliferation and differentiation of mammalian cells., *Biometals.* 14 (s/f) 331–41.
- [93] A. Franke, W. Lante, V. Fackeldey, H.P. Becker, E. Kurig, L.G. Zöller, C. Weinhold, A. Markewitz, Pro-inflammatory cytokines after different kinds of cardio-thoracic surgical procedures: is what we see what we know?, *Eur. J. Cardiothorac. Surg.* 28 (2005) 569–75. doi:10.1016/j.ejcts.2005.07.007.
- [94] G. Bowman, R.H. Bonneau, V.M. Chinchilli, K.J. Tracey, K.M. Cockcroft, A novel inhibitor of inflammatory cytokine production (CNI-1493) reduces rodent post-hemorrhagic vasospasm., *Neurocrit. Care.* 5 (2006) 222–9. doi:10.1385/NCC:5:3:222.
- [95] J.D. Clark, X. Shi, X. Li, Y. Qiao, D. Liang, M.S. Angst, D.C. Yeomans, Morphine reduces local cytokine expression and neutrophil infiltration after incision., *Mol. Pain.* 3 (2007) 28. doi:10.1186/1744-8069-3-28.
- [96] I.H. TIPTON, M.J. COOK, Trace elements in human tissue. II. Adult subjects from the United States., *Health Phys.* 9 (1963) 103–45.
- [97] B.L. Vallee, K.H. Falchuk, J.K. Chesters, Zinc and Gene Expression [and Discussion], *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 294 (1981) 185–197. doi:10.1098/rstb.1981.0098.
- [98] K. Jeejeebhoy, Zinc: An Essential Trace Element for Parenteral Nutrition, *Gastroenterology.* 137 (2009) S7–S12. doi:10.1053/j.gastro.2009.08.014.
- [99] A.R. Kristal, J.L. Stanford, J.H. Cohen, K. Wicklund, R.E. Patterson, Vitamin and mineral supplement use is associated with reduced risk of prostate cancer., *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 8 (1999) 887–92.

- [100] F. Meyer, P. Galan, P. Douville, I. Bairati, P. Kegle, S. Bertrais, C. Estaquio, S. Hercberg, Antioxidant vitamin and mineral supplementation and prostate cancer prevention in the SU.VI.MAX trial., *Int. J. cancer*. 116 (2005) 182–6. doi:10.1002/ijc.21058.
- [101] K.B. Sprenger, D. Bundschu, K. Lewis, B. Spohn, J. Schmitz, H.E. Franz, Improvement of uremic neuropathy and hypogeusia by dialysate zinc supplementation: a double-blind study., *Kidney Int. Suppl.* 16 (1983) S315–8.
- [102] A.M. Brown, B.S. Kristal, M.S. Effron, A.I. Shestopalov, P.A. Ullucci, K.F. Sheu, J.P. Blass, A.J. Cooper, Zn<sup>2+</sup> inhibits alpha-ketoglutarate-stimulated mitochondrial respiration and the isolated alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex., *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 13441–7.
- [103] S.L. Sensi, H.Z. Yin, J.H. Weiss, AMPA/kainate receptor-triggered Zn<sup>2+</sup> entry into cortical neurons induces mitochondrial Zn<sup>2+</sup> uptake and persistent mitochondrial dysfunction., *Eur. J. Neurosci.* 12 (2000) 3813–8.
- [104] M.-H. Zou, C. Shi, R.A. Cohen, Oxidation of the zinc-thiolate complex and uncoupling of endothelial nitric oxide synthase by peroxynitrite., *J. Clin. Invest.* 109 (2002) 817–26. doi:10.1172/JCI14442.
- [105] I. Korichneva, Redox regulation of cardiac protein kinase C., *Exp. Clin. Cardiol.* 10 (2005) 256–61.
- [106] C. Qiu-Yun, Z. Dong-Fang, H. Juan, G. Wen-Jie, G. Jing, Synthesis, anticancer activities, interaction with DNA and mitochondria of manganese complexes., *J. Inorg. Biochem.* 104 (2010) 1141–7. doi:10.1016/j.jinorgbio.2010.06.012.
- [107] D. Magda, P. Lecane, Z. Wang, W. Hu, P. Thiemann, X. Ma, P.K. Dranchak, X. Wang, V. Lynch, W. Wei, V. Csokai, J.G. Hacia, J.L. Sessler, Synthesis and anticancer properties of water-soluble zinc ionophores., *Cancer Res.* 68 (2008) 5318–25. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-0601.
- [108] H.-L. Seng, H.-K.A. Ong, R.N.Z.R.A. Rahman, B.M. Yamin, E.R.T. Tiekink, K.W. Tan, M.J. Maah, I. Caracelli, C.H. Ng, Factors affecting nucleolytic efficiency of some ternary metal complexes with DNA binding and recognition domains. Crystal and molecular structure of Zn(phen)(edda)., *J. Inorg. Biochem.* 102 (2008) 1997–2011. doi:10.1016/j.jinorgbio.2008.07.015.
- [109] C.H. Ng, K.C. Kong, S.T. Von, P. Balraj, P. Jensen, E. Thirthagiri, H. Hamada, M. Chikira, Synthesis, characterization, DNA-binding study and anticancer properties of ternary metal( ii ) complexes of edda and an intercalating ligand, *Dalt. Trans.* (2008) 447–454. doi:10.1039/B709269E.
- [110] M. Conrad, J.P.F. Angeli, P. Vandenabeele, B.R. Stockwell, Regulated necrosis: disease relevance and therapeutic opportunities, *Nat. Rev. Drug Discov.* 15 (2016) 348–366. doi:10.1038/nrd.2015.6.
- [111] M. Onal, G. Ovet, O. Onal, Review of Apoptosis, *MOJ Immunol.* 3 (2016) 1–4. doi:10.15406/moji.2016.03.00073.
- [112] C.I. Lorda-Diez, B. Garcia-Riart, J.A. Montero, J. Rodriguez-León, J.A. Garcia-Porrero,

- J.M. Hurle, Apoptosis during embryonic tissue remodeling is accompanied by cell senescence, *Aging (Albany, NY)*. 7 (2015) 974–985. doi:10.18632/aging.100844.
- [113] L. Galluzzi, J.M. Bravo-San Pedro, I. Vitale, S.A. Aaronson, J.M. Abrams, D. Adam, E.S. Alnemri, L. Altucci, D. Andrews, M. Annicchiarico-Petruzzelli, E.H. Baehrecke, N.G. Bazan, M.J. Bertrand, K. Bianchi, M. V Blagosklonny, K. Blomgren, C. Borner, D.E. Bredesen, C. Brenner, M. Campanella, E. Candi, F. Cecconi, F.K. Chan, N.S. Chandel, E.H. Cheng, J.E. Chipuk, J.A. Cidlowski, A. Ciechanover, T.M. Dawson, V.L. Dawson, V. De Laurenzi, R. De Maria, K.-M. Debatin, N. Di Daniele, V.M. Dixit, B.D. Dynlacht, W.S. El-Deiry, G.M. Fimia, R.A. Flavell, S. Fulda, C. Garrido, M.-L. Gougeon, D.R. Green, H. Gronemeyer, G. Hajnoczky, J.M. Hardwick, M.O. Hengartner, H. Ichijo, B. Joseph, P.J. Jost, T. Kaufmann, O. Kepp, D.J. Klionsky, R.A. Knight, S. Kumar, J.J. Lemasters, B. Levine, A. Linkermann, S.A. Lipton, R.A. Lockshin, C. López-Otín, E. Lugli, F. Madeo, W. Malorni, J.-C. Marine, S.J. Martin, J.-C. Martinou, J.P. Medema, P. Meier, S. Melino, N. Mizushima, U. Moll, C. Muñoz-Pinedo, G. Nuñez, A. Oberst, T. Panaretakis, J.M. Penninger, M.E. Peter, M. Piacentini, P. Pinton, J.H. Prehn, H. Puthalakath, G.A. Rabinovich, K.S. Ravichandran, R. Rizzuto, C.M. Rodrigues, D.C. Rubinsztein, T. Rudel, Y. Shi, H.-U. Simon, B.R. Stockwell, G. Szabadkai, S.W. Tait, H.L. Tang, N. Tavernarakis, Y. Tsujimoto, T. Vanden Berghe, P. Vandenabeele, A. Villunger, E.F. Wagner, H. Walczak, E. White, W.G. Wood, J. Yuan, Z. Zakeri, B. Zhivotovsky, G. Melino, G. Kroemer, Essential versus accessory aspects of cell death: recommendations of the NCCD 2015, *Cell Death Differ.* 22 (2015) 58–73. doi:10.1038/cdd.2014.137.
- [114] R.M. Mohammad, I. Muqbil, L. Lowe, C. Yedjou, H.-Y. Hsu, L.-T. Lin, M.D. Siegelin, C. Fimognari, N.B. Kumar, Q.P. Dou, H. Yang, A.K. Samadi, G.L. Russo, C. Spagnuolo, S.K. Ray, M. Chakrabarti, J.D. Morre, H.M. Coley, K. Honoki, H. Fujii, A.G. Georgakilas, A. Amedei, E. Niccolai, A. Amin, S.S. Ashraf, W.G. Helderich, X. Yang, C.S. Boosani, G. Guha, D. Bhakta, M.R. Ciriolo, K. Aquilano, S. Chen, S.I. Mohammed, W.N. Keith, A. Bilsland, D. Halicka, S. Nowsheen, A.S. Azmi, Broad targeting of resistance to apoptosis in cancer, *Semin. Cancer Biol.* 35 (2015) S78–S103. doi:10.1016/j.semcancer.2015.03.001.
- [115] K. Segawa, S. Nagata, An Apoptotic ‘Eat Me’ Signal: Phosphatidylserine Exposure, *Trends Cell Biol.* 25 (2015) 639–650. doi:10.1016/J.TCB.2015.08.003.
- [116] W. Zeng, X. Wang, P. Xu, G. Liu, H.S. Eden, X. Chen, Molecular imaging of apoptosis: from micro to macro., *Theranostics*. 5 (2015) 559–82. doi:10.7150/thno.11548.
- [117] D.R. McIlwain, T. Berger, T.W. Mak, Caspase functions in cell death and disease., *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 5 (2013) a008656. doi:10.1101/cshperspect.a008656.
- [118] M. Olsson, B. Zhivotovsky, Caspases and cancer., *Cell Death Differ.* 18 (2011) 1441–9. doi:10.1038/cdd.2011.30.
- [119] W. Xu, G. McArthur, Cell Cycle Regulation and Melanoma., *Curr. Oncol. Rep.* 18 (2016) 34. doi:10.1007/s11912-016-0524-y.
- [120] G.H. Williams, K. Stoeber, The cell cycle and cancer, *J. Pathol.* 226 (2012) 352–364. doi:10.1002/path.3022.

- [121] A.A. Velez, M. Howard, Tumor-suppressor genes, cell cycle regulatory checkpoints, and the skin, *N. Am. J. Med. Sci.* 7 (2015) 176. doi:10.4103/1947-2714.157476.
- [122] P. Strzyz, Cell signalling: Signalling to cell cycle arrest., *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 17 (2016) 536. doi:10.1038/nrm.2016.108.
- [123] M. Valko, C.J. Rhodes, J. Moncol, M. Izakovic, M. Mazur, Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer, *Chem. Biol. Interact.* 160 (2006) 1–40. doi:10.1016/j.cbi.2005.12.009.
- [124] S.J. Stohs, D. Bagchi, Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions, *Free Radic. Biol. Med.* 18 (1995) 321–336. doi:10.1016/0891-5849(94)00159-H.
- [125] J.S. Armstrong, K.K. Steinauer, B. Hornung, J.M. Irish, P. Lecane, G.W. Birrell, D.M. Peehl, S.J. Knox, Role of glutathione depletion and reactive oxygen species generation in apoptotic signaling in a human B lymphoma cell line, *Cell Death Differ.* 9 (2002) 252–263. doi:10.1038/sj.cdd.4400959.
- [126] A. V Kuznetsov, I. Kehrer, A. V Kozlov, M. Haller, H. Redl, M. Hermann, M. Grimm, J. Troppmair, Mitochondrial ROS production under cellular stress: comparison of different detection methods., *Anal. Bioanal. Chem.* 400 (2011) 2383–90. doi:10.1007/s00216-011-4764-2.
- [127] O.M. Ighodaro, O.A. Akinloye, First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid, *Alexandria J. Med.* 54 (2018) 287–293. doi:10.1016/j.ajme.2017.09.001.
- [128] J. Nordberg, E.S.J. Arnér, Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system, *Free Radic. Biol. Med.* 31 (2001) 1287–1312. doi:10.1016/S0891-5849(01)00724-9.
- [129] B. Halliwell, O.I. Aruoma, DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems., *FEBS Lett.* 281 (1991) 9–19.
- [130] J. Chandra, A. Samali, S. Orrenius, Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress., *Free Radic. Biol. Med.* 29 (2000) 323–33. doi:10.1016/S0891-5849(00)00302-6.
- [131] L. Ronconi, P.J. Sadler, Using coordination chemistry to design new medicines, *Coord. Chem. Rev.* 251 (2007) 1633–1648. doi:10.1016/j.ccr.2006.11.017.
- [132] U. Jungwirth, C.R. Kowol, B.K. Keppler, C.G. Hartinger, W. Berger, P. Heffeter, Anticancer Activity of Metal Complexes: Involvement of Redox Processes, *Antioxid. Redox Signal.* 15 (2011) 1085–1127. doi:10.1089/ars.2010.3663.
- [133] E. Reisner, V.B. Arion, B.K. Keppler, A.J.L. Pombeiro, Electron-transfer activated metal-based anticancer drugs, *Inorganica Chim. Acta.* 361 (2008) 1569–1583. doi:10.1016/j.ica.2006.12.005.
- [134] R. Hudej, D. Miklavcic, M. Cemazar, V. Todorovic, G. Sersa, A. Bergamo, G. Sava, A. Martincic, J. Scancar, B.K. Keppler, I. Turel, Modulation of Activity of Known Cytotoxic Ruthenium(III) Compound (KP418) with Hampered Transmembrane

- Transport in Electrochemotherapy In Vitro and In Vivo., *J. Membr. Biol.* 247 (2014) 1239–51. doi:10.1007/s00232-014-9696-2.
- [135] A. Singh, R.P. Sharma, P. Brandão, V. Felix, P. Venugopalan, Cationic cobalt(III) complex as anion receptor for biologically important anion: Synthesis, characterization and X-ray structure of  $[\text{Co}(\text{phen})_3](\text{C}_7\text{H}_4\text{NSO}_3)_3 \cdot 8.5\text{H}_2\text{O}$  where  $\text{C}_7\text{H}_4\text{NSO}_3 = \text{saccharinate}$  ion, *J. Mol. Struct.* 891 (2008) 396–403. doi:10.1016/j.molstruc.2008.04.021.
- [136] J. Fang, H. Nakamura, A.K. Iyer, Tumor-targeted induction of oxystress for cancer therapy, *J. Drug Target.* 15 (2007) 475–486. doi:10.1080/10611860701498286.
- [137] C.F. Nathan, Z.A. Cohn, Antitumor effects of hydrogen peroxide in vivo, *J. Exp. Med.* 154 (1981) 1539–1553.
- [138] O. Ben-Yoseph, B.D. Ross, Oxidation therapy: The use of a reactive oxygen species-generating enzyme system for tumour treatment, *Br. J. Cancer.* 70 (1994) 1131–1135. doi:10.1038/bjc.1994.460.
- [139] S. Simizu, M. Takada, K. Umezawa, M. Imoto, Requirement of caspase-3(-like) protease-mediated hydrogen peroxide production for apoptosis induced by various anticancer drugs, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 26900–26907. doi:10.1074/jbc.273.41.26900.
- [140] J. Alexandre, F. Batteux, C. Nicco, C. Chéreau, A. Laurent, L. Guillevin, B. Weill, F. Goldwasser, Accumulation of hydrogen peroxide is an early and crucial step for paclitaxel-induced cancer cell death both in vitro and in vivo, *Int. J. Cancer.* 119 (2006) 41–48. doi:10.1002/ijc.21685.
- [141] K. Berneis, M. Kofler, W. Bollag, A. Kaiser, A. Langemann, The degradation of deoxyribonucleic acid by new tumour inhibiting compounds: The intermediate formation of hydrogen peroxide, *Experientia.* 19 (1963) 132–133. doi:10.1007/BF02171591.
- [142] S.X. Skapek, O.M. Colvin, O.W. Griffith, G.B. Elion, D.D. Bigner, H.S. Friedman, Enhanced melphalan cytotoxicity following buthionine sulfoximine-mediated glutathione depletion in a human medulloblastoma xenograft in athymic mice, *Cancer Res.* 48 (1988) 2764–2767.
- [143] H. Maeda, S. Hori, H. Ohizumi, T. Segawa, Y. Kakehi, O. Ogawa, A. Kakizuka, Effective treatment of advanced solid tumors by the combination of arsenic trioxide and L-buthionine-sulfoximine, *Cell Death Differ.* 11 (2004) 737–746. doi:10.1038/sj.cdd.4401389.
- [144] D.E.S. Ocial, ESFEROIDES TUMORALES MULTICELULARES EN LA EVALUACIÓN DE ESTRATEGIAS TERAPÉUTICAS ANTICANCEROSAS, 25 (2013) 1–8.
- [145] J.M. Kelm, N.E. Timmins, C.J. Brown, M. Fussenegger, L.K. Nielsen, Method for generation of homogeneous multicellular tumor spheroids applicable to a wide variety of cell types, *Biotechnol. Bioeng.* 83 (2003) 173–180. doi:10.1002/bit.10655.
- [146] C. Dubessy, J.L. Merlin, C. Marchal, F. Guillemin, Spheroids in radiobiology and



- photodynamic therapy, *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 36 (2000) 179–192. doi:10.1016/S1040-8428(00)00085-8.
- [147] C.R. Thoma, M. Zimmermann, I. Agarkova, J.M. Kelm, W. Krek, 3D cell culture systems modeling tumor growth determinants in cancer target discovery, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 69–70 (2014). doi:10.1016/j.addr.2014.03.001.
- [148] H. Page, P. Flood, E.G. Reynaud, Three-dimensional tissue cultures: Current trends and beyond, *Cell Tissue Res.* 352 (2013) 123–131. doi:10.1007/s00441-012-1441-5.
- [149] J.M. Lee, P. Mhawech-Fauceglia, N. Lee, L.C. Parsanian, Y.G. Lin, S.A. Gayther, K. Lawrenson, A three-dimensional microenvironment alters protein expression and chemosensitivity of epithelial ovarian cancer cells in vitro, *Lab. Invest.* 93 (2013) 528–542. doi:10.1038/labinvest.2013.41.
- [150] S. Nath, G.R. Devi, Three-dimensional culture systems in cancer research: Focus on tumor spheroid model, *Pharmacol. Ther.* 163 (2016) 94–108. doi:10.1016/j.pharmthera.2016.03.013.
- [151] P. Benien, A. Swami, 3D tumor models: history, advances and future perspectives., *Future Oncol.* 10 (2014) 1311–27. doi:10.2217/fon.13.274.
- [152] J. Friedrich, R. Ebner, L. a Kunz-Schughart, Experimental anti-tumor therapy in 3-D: spheroids--old hat or new challenge?, *Int. J. Radiat. Biol.* 83 (2007) 849–871. doi:10.1080/09553000701727531.
- [153] A. Marella, O.P. Tanwar, R. Saha, M.R. Ali, S. Srivastava, M. Akhter, M. Shaquiquzzaman, M.M. Alam, Quinoline: A versatile heterocyclic, *Saudi Pharm. J.* 21 (2013) 1–12. doi:10.1016/j.jsps.2012.03.002.
- [154] O. Afzal, S. Kumar, M.R. Haider, M.R. Ali, R. Kumar, M. Jaggi, S. Bawa, A review on anticancer potential of bioactive heterocycle quinoline, *Eur. J. Med. Chem.* 97 (2015) 871–910. doi:10.1016/j.ejmech.2014.07.044.
- [155] S. Jain, V. Chandra, P. Kumar Jain, K. Pathak, D. Pathak, A. Vaidya, Comprehensive review on current developments of quinoline-based anticancer agents, *Arab. J. Chem.* (2016). doi:10.1016/j.arabjc.2016.10.009.
- [156] V. Prachayasittikul, S. Prachayasittikul, S. Ruchirawat, V. Prachayasittikul, 8-Hydroxyquinolines: A review of their metal chelating properties and medicinal applications, *Drug Des. Devel. Ther.* 7 (2013) 1157–1178. doi:10.2147/DDDT.S49763.
- [157] D.K. Heidary, B.S. Howerton, E.C. Glazer, Coordination of hydroxyquinolines to a ruthenium bis-dimethyl-phenanthroline scaffold radically improves potency for potential as antineoplastic agents, *J. Med. Chem.* 57 (2014) 8936–8946. doi:10.1021/jm501043s.
- [158] J. Kljun, I.E. León, Š. Peršič, J.F. Cadavid-Vargas, S.B. Etcheverry, W. He, Y. Bai, I. Turel, Synthesis and biological characterization of organoruthenium complexes with 8-hydroxyquinolines, *J. Inorg. Biochem.* 186 (2018) 187–196. doi:10.1016/j.jinorgbio.2018.05.009.

- [159] S. Tardito, A. Barilli, I. Bassanetti, M. Tegoni, O. Bussolati, R. Franchi-Gazzola, C. Mucchino, L. Marchi??, Copper-dependent cytotoxicity of 8-hydroxyquinoline derivatives correlates with their hydrophobicity and does not require caspase activation, *J. Med. Chem.* 55 (2012) 10448–10459. doi:10.1021/jm301053a.
- [160] H.-L. Seng, W.-S. Wang, S.-M. Kong, H.-K. Alan Ong, Y.-F. Win, R.N.Z. Raja Abd. Rahman, M. Chikira, W.-K. Leong, M. Ahmad, A.S.-B. Khoo, C.-H. Ng, Biological and cytoselective anticancer properties of copper(II)-polypyridyl complexes modulated by auxiliary methylated glycine ligand, *BioMetals*. 25 (2012) 1061–1081. doi:10.1007/s10534-012-9572-4.
- [161] W. Chan-On, N.T.B. Huyen, N. Songtawee, W. Suwanjang, S. Prachayasittikul, V. Prachayasittikul, Quinoline-based clioquinol and nitroxoline exhibit anticancer activity inducing FoxM1 inhibition in cholangiocarcinoma cells, *Drug Des. Devel. Ther.* 9 (2015) 2033–2047. doi:10.2147/DDDT.S79313.
- [162] M.C. Ruiz, A. Resasco, A.L. Di Virgilio, M. Ayala, I. Cavaco, S. Cabrera, J. Aleman, I.E. León, In vitro and in vivo anticancer effects of two quinoline–platinum(II) complexes on human osteosarcoma models, *Cancer Chemother. Pharmacol.* 0 (2019) 0. doi:10.1007/s00280-019-03773-x.
- [163] N.A. Rey, K.C. Dos Santos, M.Â.B.C. Menezes, A.S. Mangrich, E.C. Pereira-Maia, Two different modes for copper(II) ion coordination to quinine-type ligands, *J. Braz. Chem. Soc.* 17 (2006) 497–504. doi:10.1590/S0103-50532006000300010.
- [164] W. Sneader, History of Sulfonamides, en: *Encycl. Life Sci.*, John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, 2001: pp. 1–2. doi:10.1038/npg.els.0003625.
- [165] W.C. Campbell, History of the discovery of sulfaquinolaxine as a coccidiostat., *J. Parasitol.* 94 (2008) 934–945. doi:10.1645/GE-1413.1.
- [166] T. Zhang, F. Dong, F. Luo, C. Li, Degradation of sulfonamides and formation of trihalomethanes by chlorination after pre-oxidation with Fe(VI), *J. Environ. Sci. (China)*. (2018) 1–7. doi:10.1016/j.jes.2018.01.016.
- [167] B. Banik, A. Tairai, P.K. Bhattacharyya, P. Das, Excellent Suzuki–Miyaura catalytic activity of a new Pd(II) complex with sulfonamide–Schiff base ligand, *Appl. Organomet. Chem.* 30 (2016) 519–523. doi:10.1002/aoc.3464.
- [168] M. Krátký, M. Dzurková, J. Janoušek, K. Konečná, F. Trejtnar, J. Stolaříková, J. Vinšová, Sulfadiazine Salicylaldehyde-Based Schiff Bases: Synthesis, Antimicrobial Activity and Cytotoxicity, *Molecules*. 22 (2017) 1573. doi:10.3390/molecules22091573.
- [169] F.A. Saad, A.M. Khedr, Greener solid state synthesis of nano-sized mono and homo bi-nuclear Ni(II), Co(II), Mn(II), Hg(II), Cd(II) and Zn(II) complexes with new sulfa ligand as a potential antitumour and antimicrobial agents, *J. Mol. Liq.* 231 (2017) 572–579. doi:10.1016/j.molliq.2017.02.046.
- [170] M. Tahriri, M. Yousefi, K. Mehrani, M. Tabatabaee, M.D. Ashkezari, Synthesis, Characterization and Antimicrobial Activity of Two Novel Sulfonamide Schiff Base Compounds, *Pharm. Chem. J.* 51 (2017) 425–428. doi:10.1007/s11094-017-1626-z.

- [171] D.M. Gil, F.F. Salomón, G.A. Echeverría, O.E. Piro, H. Pérez, A. Ben Altabef, A detailed exploration of intermolecular interactions in 4-(4-dimethylaminobenzylideneamino)-N-(5-methyl-3-isoxazolyl)benzenesulfonamide and related Schiff bases: Crystal structure, spectral studies, DFT methods, Pixel energies and Hirshfeld surface analysis, *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 185 (2017) 286–297. doi:10.1016/j.saa.2017.05.066.
- [172] M. Shahid, M. Salim, M. Khalid, M.N. Tahir, M.U. Khan, A.A.C. Braga, Synthetic, XRD, non-covalent interactions and solvent dependent nonlinear optical studies of Sulfadiazine-Ortho-Vanillin Schiff base: (E)-4-((2-hydroxy-3-methoxy-benzylidene)amino)-N-(pyrimidin-2-yl)benzene-sulfonamide, *J. Mol. Struct.* 1161 (2018) 66–75. doi:10.1016/j.molstruc.2018.02.043.
- [173] Z. Demircioğlu, F.A. Özdemir, O. Dayan, Z. Şerbetçi, N. Özdemir, Synthesis, X-ray diffraction method, spectroscopic characterization (FT-IR, <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR), antimicrobial activity, Hirshfeld surface analysis and DFT computations of novel sulfonamide derivatives, *J. Mol. Struct.* 1161 (2018) 122–137. doi:10.1016/j.molstruc.2018.02.063.
- [174] F. Niu, Y. Liu, Z. Jing, G. Han, L. Sun, L. Yan, L. Zhou, Y. Wu, Y. Xu, L. Hu, X. Zhao, Novel carbazole sulfonamide microtubule-destabilizing agents exert potent antitumor activity against esophageal squamous cell carcinoma, *Cancer Lett.* 420 (2018) 60–71. doi:10.1016/j.canlet.2018.01.066.
- [175] K.G. Samper, S.C. Marker, P. Bayón, S.N. MacMillan, I. Keresztes, Ò. Palacios, J.J. Wilson, Anticancer activity of hydroxy- and sulfonamide-azobenzene platinum(II) complexes in cisplatin-resistant ovarian cancer cells, *J. Inorg. Biochem.* 174 (2017) 102–110. doi:10.1016/j.jinorgbio.2017.06.003.
- [176] Y.-F. Wang, H.-L. Zou, X.-J. Luo, Z.-F. Chen, H. Liang, *trans*-Bis[4-amino-*N*-(pyrimidin-2-yl)benzenesulfonamidato]dipyridinecobalt(II) hemihydrate, *Acta Crystallogr. Sect. E Struct. Reports Online.* 66 (2010) m548–m548. doi:10.1107/S1600536810013802.
- [177] L. de L. Marques, E.S. Lang, R.A. Burrow, [4-Amino-*N*-(pyrimidin-2-yl)benzenesulfonamido-κ<sup>N</sup>](triphenylarsine-κ<sup>As</sup>)gold(I), *Acta Crystallogr. Sect. E Struct. Reports Online.* 59 (2003) m707–m709. doi:10.1107/S1600536803017008.
- [178] T.-J. He, Y.-S. Tan, Y.-Q. Gu, Z.-F. Chen, H. Liang, Bis[4-amino-*N*-(pyrimidin-2-yl)benzenesulfonamidato](2,2'-bipyridine)manganese(II), *Acta Crystallogr. Sect. E Struct. Reports Online.* 66 (2010) m684–m685. doi:10.1107/S1600536810017794.
- [179] J.J. Guo, W. Wang, Y.D. Zhang, L. Yang, S.H. Zhang, *trans*-Bis[4-amino-*N*-(pyrimidin-2-yl-κ<sup>N</sup>)benzenesulfonamidato-κ<sup>N</sup>]bis(*N,N*-dimethylformamide-κ<sup>O</sup>)cobalt(II), *Acta Crystallogr. Sect. E Struct. Reports Online.* 68 (2012) m1398–m1399. doi:10.1107/S160053681204336X.
- [180] C.A. Otter, S.M. Couchman, J.C. Jeffery, K.L.V. Mann, E. Psillakis, M.D. Ward, Complexes of a new bidentate chelating pyridyl/sulfonamide ligand with copper(II), cobalt(II) and palladium(II): Crystal structures and spectroscopic properties, *Inorganica Chim. Acta.* 278 (1998) 178–184. doi:10.1016/S0020-1693(98)00018-8.

- [181] M.R.L. Oliveira, V.M. De Bellis, Preparation of novel cobalt(III) complexes with dithiocarbimates derived from sulfonamides, *Transit. Met. Chem.* 24 (1999) 127–130. doi:10.1023/A:1006945923839.
- [182] M. Mondelli, F. Pavan, P.C. De Souza, C.Q. Leite, J. Ellena, O.R. Nascimento, G. Facchin, M.H. Torre, Study of a series of cobalt(II) sulfonamide complexes: Synthesis, spectroscopic characterization, and microbiological evaluation against *M. tuberculosis*. Crystal structure of [Co(sulfamethoxazole)<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>].H<sub>2</sub>O, *J. Mol. Struct.* 1036 (2013) 180–187. doi:10.1016/j.molstruc.2012.09.064.
- [183] Ü.Ö. Özdemir, P. Güvenç, E. Şahin, F. Hamurcu, Synthesis, characterization and antibacterial activity of new sulfonamide derivatives and their nickel(II), cobalt(II) complexes, *Inorganica Chim. Acta.* 362 (2009) 2613–2618. doi:10.1016/j.ica.2008.11.029.
- [184] G.M.G. Hossain, A.J. Amoroso, A. Banu, K.M.A. Malik, Syntheses and characterisation of mercury complexes of sulfadiazine, sulfamerazine and sulfamethazine, *Polyhedron.* 26 (2007) 967–974. doi:10.1016/J.POLY.2006.09.056.
- [185] Y.-Y. Zhao, X.-H. Zhao, J. Zhang, J.-G. Pan, X. Li, Electrochemical properties of a cobalt(II) complex with sulfadiazine and 1,3-bis(pyridin-4-yl)propane, *Acta Crystallogr. Sect. C Cryst. Struct. Commun.* 69 (2013) 1096–1099. doi:10.1107/S010827011302297X.
- [186] X.-H. Zhao, Y.-Y. Zhao, J. Zhang, J.-G. Pan, X. Li, Synthesis, crystal structure and fluorescence spectrum of a cadmium(II) sulfaquinoxaline complex., *Acta Crystallogr. C.* 69 (2013) 1332–5. doi:10.1107/S010827011302711X.
- [187] G. Campbell, R. Fisher, A.R. Kennedy, N.L.C. King, R. Spiteri, Salt forms of sulfadiazine with alkali metal and organic cations, *International Union of Crystallography*, 2018. doi:10.1107/S205322961800414X.
- [188] J.-Y. Kang, S.-J. Huang, X.-H. Zhao, Y.-Y. Zhao, X. Li, Syntheses, Crystal Structures and Fluorescent Properties of Two Zn(II) Complexes Based on Sulfaquinoxalines, *Chinese J. Inorg. Chem.* 31 (2015) 798–806.
- [189] W.B. Shi, A.L. Cui, H.Z. Kou, Sulfadiazine/dimethylsulfadiazine transition metal complexes: Synthesis, crystal structures and magnetic properties, *Polyhedron.* 99 (2015) 252–259. doi:10.1016/j.poly.2015.08.028.
- [190] R.-X. Yuan, R.-G. Xiong, Z.-F. Chen, P. Zhang, H.-X. Ju, Z. Dai, Z.-J. Guo, H.-K. Fun, X.-Z. You, Crystal structure of zinc(II) 2-sulfanilamidopyrimidine: a widely used topical burn drug, *J. Chem. Soc. Dalt. Trans.* (2001) 774–776. doi:10.1039/b100901j.
- [191] M. Gaber, K.Y. El-Baradie, Synthesis, Spectral, Thermal, and Electrical Conductivity Studies of Cobalt (II) and Copper (II) Sulfadiazine Complexes, *Chem. Pap.* 57 (2003) 317–321.
- [192] Y.F. Wang, H.L. Zou, X.J. Luo, Z.F. Chen, H. Liang, Trans-bis[4-amino-N-(pyrimidin-2-yl)benzenesulfonamidato] dipyridine-cobalt(II) hemihydrate, *Acta Crystallogr. Sect. E Struct. Reports Online.* 66 (2010). doi:10.1107/S1600536810013802.

- [193] P. a. Ajibade, G. a. Kolawole, P. O'Brien, M. Helliwell, J. Raftery, Cobalt(II) complexes of the antibiotic sulfadiazine, the X-ray single crystal structure of  $[\text{Co}(\text{C}_{10}\text{H}_9\text{N}_4\text{O}_2\text{S})_2(\text{CH}_3\text{OH})_2]$ , *Inorganica Chim. Acta.* 359 (2006) 3111–3116. doi:10.1016/j.ica.2006.03.030.
- [194] P.A. Ajibade, G.A. Kolawole, P.O. Brien, Metal Complexes of 4-Amino-N-(2-pyrimidinyl)benzene Sulfonamide: Synthesis, Characterization and Antiprotozoal Studies, *Synth. React. Inorganic, Met. Nano-Metal Chem.* 37:8 (2007) 653–659. doi:10.1080/15533170701608957.
- [195] J.B. Tommasino, F.N.R. Renaud, D. Luneau, G. Pilet, Multi-biofunctional complexes combining antiseptic copper(II) with antibiotic sulfonamide ligands: Structural, redox and antibacterial study, *Polyhedron.* 30 (2011) 1663–1670. doi:10.1016/j.poly.2011.03.033.
- [196] A.M. Mansour, Experimental and quantum chemical studies of sulfamethazine complexes with Ni(II) and Cu(II) ions, *J. Coord. Chem.* 66 (2013) 1118–1128. doi:10.1080/00958972.2013.775427.
- [197] A.M. Mansour, Coordination behavior of sulfamethazine drug towards Ru(III) and Pt(II) ions: Synthesis, spectral, DFT, magnetic, electrochemical and biological activity studies, *Inorganica Chim. Acta.* 394 (2013) 436–445. doi:10.1016/j.ica.2012.08.025.
- [198] A.M. Mansour, Molecular structure and spectroscopic properties of novel manganese(II) complex with sulfamethazine drug, *J. Mol. Struct.* 1035 (2013) 114–123. doi:10.1016/j.molstruc.2012.09.048.
- [199] F. Öztürk, İ. Bulut, A. Bulut, Structural, spectroscopic, magnetic and electrochemical studies of monomer N-substituted-sulfanilamide copper (II) complex with 2,2'-bipyridine, *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 138 (2015) 891–899. doi:10.1016/J.SAA.2014.10.065.
- [200] İ. Bulut, F. Öztürk, A. Bulut, Synthesis, structural and electrochemical properties of nickel(II) sulfamethazine complex with diethylenetriamine ligand, *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 138 (2015) 138–145. doi:10.1016/j.saa.2014.10.113.
- [201] I. Bulut, E. Biçer, Study of binary complexes of Cu(II), Ni(II) and Co(II) with sulfamethazine by voltammetry, *Russ. J. Electrochem.* 46 (2010) 62–71. doi:10.1134/S1023193510010076.
- [202] L. Gutiérrez, G. Alzuet, J. Borrás, A. Castiñeiras, A. Rodríguez-Forteza, E. Ruiz, Copper(II) Complexes with 4-Amino-N-[4,6-dimethyl-2-pyrimidinyl]benzenesulfonamide. Synthesis, Crystal Structure, Magnetic Properties, EPR, and Theoretical Studies of a Novel Mixed  $\mu$ -Carboxylato, NCN-Bridged Dinuclear Copper Compound, *Inorg. Chem.* 40 (2001) 3089–3096. doi:10.1021/ic000869i.
- [203] D. Crystal, I.E. Perez-carrefio, M&aI Complexes of Sulfkilamide Derivatives. Crystal Structure of  $[\text{Zn}(\text{Sulfathiazole} \sim 2)]$ , *Science (80-. ).* 699 (1993) 689–699.
- [204] J.H.B. Nunes, R.E.F. De Paiva, A. Cuin, A.M. Da Costa Ferreira, W.R. Lustrì, P.P. Corbi, Synthesis, spectroscopic characterization, crystallographic studies and antibacterial

- assays of new copper(II) complexes with sulfathiazole and nimesulide, *J. Mol. Struct.* 1112 (2016) 14–20. doi:10.1016/j.molstruc.2016.02.006.
- [205] Á. García-Raso, J.J. Fiol, S. Rigo, A. López-López, E. Molins, E. Espinosa, E. Borrás, G. Alzuet, J. Borrás, A. Castièiras, Coordination behaviour of sulfanilamide derivatives. Crystal structures of [Hg(sulfamethoxypyridazinato)2], [Cd(sulfadimidinato)2(H2O)]·2H2O and [Zn(sulfamethoxazolato)2-(pyridine)2(H2O)2], *Polyhedron*. 19 (2000) 991–1004. doi:10.1016/S0277-5387(00)00355-7.
- [206] M.M. Ghorab, F.A. Ragab, M.M. Hamed, Design, synthesis and anticancer evaluation of novel tetrahydroquinoline derivatives containing sulfonamide moiety, *Eur. J. Med. Chem.* 44 (2009) 4211–4217. doi:10.1016/j.ejmech.2009.05.017.
- [207] C.T. Supuran, A. Scozzafava, Carbonic anhydrases as targets for medicinal chemistry, *Bioorganic Med. Chem.* 15 (2007) 4336–4350. doi:10.1016/j.bmc.2007.04.020.
- [208] A. Budakoti, A.R. Bhat, A. Azam, Synthesis of new 2-(5-substituted-3-phenyl-2-pyrazoliny)-1,3-thiazolino[5,4-b]quinoxaline derivatives and evaluation of their antiamebic activity, *Eur. J. Med. Chem.* 44 (2009) 1317–1325. doi:10.1016/j.ejmech.2008.02.002.
- [209] A. Carta, M. Loriga, G. Paglietti, A. Mattana, P.L. Fiori, P. Mollicotti, L. Sechi, S. Zanetti, Synthesis, anti-mycobacterial, anti-trichomonas and anti-candida in vitro activities of 2-substituted-6,7-difluoro-3-methylquinoxaline 1,4-dioxides, *Eur. J. Med. Chem.* 39 (2004) 195–203. doi:10.1016/j.ejmech.2003.11.008.
- [210] S.M. Tailor, U.H. Patel, Spectroscopic and thermogravimetric study of nickel sulfaquinoxaline complex, en: *Int. Conf. Condens. Matter Appl. Phys. (ICC 2015)*, 2016: p. 020246. doi:10.1063/1.4946297.
- [211] N. Saleh, M.M. Khowdiary, A.F. Badawi, Synthesis and antitumor and surface activity of novel tetrachloro metallate complexes of sulfaquinoxaline with Co(II), Cu(II), or Sn(II) chlorides, *Tenside, Surfactants, Deterg.* 51 (2014) 318–324. doi:10.3139/113.110313.
- [212] A.M. Mansour, R.R. Mohamed, Sulfamethazine copper(II) complexes as antimicrobial thermal stabilizers and co-stabilizers for rigid PVC: spectroscopic, thermal, and DFT studies, *RSC Adv.* 5 (2015) 5415–5423. doi:10.1039/C4RA07212J.
- [213] C. Villa-Pérez, I.C. Ortega, A. Vélez-Macías, A.M. Payán, G.A. Echeverría, D.B. Soria, G.C. Valencia-Urbe, Crystal Structure, Physicochemical Properties, Hirshfeld Surface Analysis and Antibacterial Activity Assays of Transition Metal Complexes of 6-Methoxyquinoline., *New J. Chem.* (2018). doi:10.1039/C8NJ00661J.
- [214] C. Villa-Pérez, I. Oyarzabal, G.A. Echeverría, G.C. Valencia-Urbe, J.M. Seco, D.B. Soria, Single-Ion Magnets Based on Mononuclear Cobalt(II) Complexes with Sulfadiazine, *Eur. J. Inorg. Chem.* 2016 (2016) 4835–4841. doi:10.1002/ejic.201600777.
- [215] S. Haider, K. Malik, K. Ahmed, Synthesis and some properties of metal–saccharin complexes with the general formula . 2H2O, *Bangladesh Acad Sci.* (1981).

- [216] S.Z. Haider, K.M.A. Malik, K.J. Ahmed, H. Hess, H. Riffel, M.B. Hursthouse, X-ray crystal structures of metal-saccharin complexes of general formula  $[M(C_7H_4NO_3S)_2(H_2O)_4] \cdot 2H_2O$ , where  $M = Fe(II), Co(II), Ni(II)$  and  $Cu(II)$ , *Inorganica Chim. Acta.* 72 (1983) 21–27. doi:10.1016/S0020-1693(00)81689-8.
- [217] P. Deschamps, N. Zerrouk, I. Nicolis, T. Martens, E. Curis, M.-F. Charlot, J.J. Girerd, T. Prangé, S. Bénazeth, J.C. Chaumeil, A. Tomas, Copper(II)–L-glutamine complexation study in solid state and in aqueous solution, *Inorganica Chim. Acta.* 353 (2003) 22–34. doi:10.1016/S0020-1693(03)00218-4.
- [218] E. Santi, I. Viera, A. Mombrú, J. Castiglioni, E.J. Baran, M.H. Torre, Synthesis and characterization of heteroleptic copper and zinc complexes with saccharinate and aminoacids. Evaluation of SOD-like activity of the copper complexes., *Biol. Trace Elem. Res.* 143 (2011) 1843–55. doi:10.1007/s12011-011-8992-2.
- [219] E.J. Baran, V.T. Yilmaz, Metal complexes of saccharin, *Coord. Chem. Rev.* 250 (2006) 1980–1999. doi:10.1016/j.ccr.2005.11.021.
- [220] C. Villa-Pérez, J.F. Cadavid-Vargas, A.L. Di Virgilio, G.A. Echeverría, G.E. Camí, D.B. Soria, Crystal structure, Hirshfeld surface analysis, spectroscopic and biological studies on sulfamethazine and sulfaquinoxaline ternary complexes with 2,2'-biquinoline, *New J. Chem.* 42 (2018) 891–901. doi:10.1039/C7NJ03624H.
- [221] S. Hongmao, Quantitative Structure–Property Relationships Models for Lipophilicity and Aqueous Solubility, en: *A Pract. Guid. to Ration. Drug Des.*, Elsevier, 2016: pp. 193–223. doi:10.1016/B978-0-08-100098-4.00006-5.
- [222] OECD. (1995), Test No. 107: Partition Coefficient (n-octanol/water): Shake Flask Method, *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 1*, (1995) 1–4. doi:10.1787/9789264069626-en.
- [223] K.S.A.M. Shweshein, F. Andrić, A. Radoičić, M. Zlatar, M. Gruden-Pavlović, Ž. Tešić, D. Milojković-Opsenica, Lipophilicity assessment of ruthenium(II)-arene complexes by the means of reversed-phase thin-layer chromatography and DFT calculations, *Sci. World J.* 2014 (2014). doi:10.1155/2014/862796.
- [224] K. Dross, C. Sonntag, R. Mannhold, Determination of the hydrophobicity parameter  $RM_w$  by reversed-phase thin-layer chromatography, *J. Chromatogr. A.* 673 (1994) 113–124. doi:10.1016/0021-9673(94)87064-0.
- [225] K. Dross, C. Sonntag, R. Mannhold, On the precise estimation of  $RM$  values in reversed-phase thin-layer chromatography including aspects of pH dependence, *J. Chromatogr. A.* 639 (1993) 287–294. doi:10.1016/0021-9673(93)80265-A.
- [226] H. Kalász, B. Benkő, Z. Gulyás, K. Tekes, Lipophilicity Determination using Both TLC and Calculations, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 32 (2009) 1342–1358. doi:10.1080/10826070902854466.
- [227] G. Vastag, S. Apostolov, B. Matijević, Prediction of lipophilicity and pharmacokinetics of chloroacetamides by chemometric approach, *Iran. J. Pharm. Res.* 17 (2018) 100–114.

- [228] D.J. Giard, S.A. Aaronson, G.J. Todaro, P. Arnstein, J.H. Kersey, H. Dosik, W.P. Parks, In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors., *J. Natl. Cancer Inst.* 51 (1973) 1417–23.
- [229] M. Lieber, B. Smith, a Szakal, W. Nelson-Rees, G. Todaro, A continuous tumor-cell line from a human lung carcinoma with properties of type II alveolar epithelial cells., *Int. J. Cancer.* 17 (1976) 62–70. doi:10.1002/ijc.2910170110.
- [230] J.P. Jacobs, C.M. Jones, J.P. Baille, Characteristics of a human diploid cell designated MRC-5, *Nature.* 227 (1970) 168–170. doi:10.1038/227168a0.
- [231] F. Wu, K. Reddy, I. Nadeau, J. Gilly, S. Terpening, D.J. Clanton, Optimization of a MRC-5 Cell Culture Process for the Production of a Smallpox Vaccine, *Cytotechnology.* 49 (2005) 95–107. doi:10.1007/s10616-005-4022-6.
- [232] A. Billiau, V.G. Edy, H. Heremans, J. Van Damme, J. Desmyter, J.A. Georgiades, P. De Somer, Human interferon: mass production in a newly established cell line, MG 63, *Antimicrob. Agents Chemother.* 12 (1977) 11–15. doi:10.1128/AAC.12.1.11.
- [233] P. Elter, T. Weihe, R. Lange, J. Gimsa, U. Beck, The influence of topographic microstructures on the initial adhesion of L929 fibroblasts studied by single-cell force spectroscopy, *Eur. Biophys. J.* 40 (2011) 317–327. doi:10.1007/s00249-010-0649-0.
- [234] F. Hirschhaeuser, H. Menne, C. Dittfeld, J. West, W. Mueller-Klieser, L. a. Kunz-Schughart, Multicellular tumor spheroids: An underestimated tool is catching up again, *J. Biotechnol.* 148 (2010) 3–15. doi:10.1016/j.jbiotec.2010.01.012.
- [235] X. Hu, V. Laguerre, D. Packert, A. Nakasone, L. Moscinski, A Simple and efficient method for preparing cell slides and staining without using cytocentrifuge and cytoclips, *Int. J. Cell Biol.* 2015 (2015). doi:10.1155/2015/813216.
- [236] M. Feoktistova, P. Geserick, M. Leverkus, Crystal violet assay for determining viability of cultured cells, *Cold Spring Harb. Protoc.* 2016 (2016) 343–346. doi:10.1101/pdb.prot087379.
- [237] T. Mosmann, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays., *J. Immunol. Methods.* 65 (1983) 55–63.
- [238] S.N. Rampersad, Multiple applications of alamar blue as an indicator of metabolic function and cellular health in cell viability bioassays, *Sensors (Switzerland).* 12 (2012) 12347–12360. doi:10.3390/s120912347.
- [239] J. O'Brien, I. Wilson, T. Orton, F. Pognan, Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity, *Eur. J. Biochem.* 267 (2000) 5421–5426. doi:10.1046/j.1432-1327.2000.01606.x.
- [240] D.P. Ivanov, T.L. Parker, D.A. Walker, C. Alexander, M.B. Ashford, P.R. Gellert, M.C. Garnett, Multiplexing spheroid volume, resazurin and acid phosphatase viability assays for high-throughput screening of tumour spheroids and stem cell neurospheres, *PLoS One.* 9 (2014). doi:10.1371/journal.pone.0103817.
- [241] N. a P. Franken, H.M. Rodermond, J. Stap, J. Haveman, C. van Bree, Clonogenic assay



- of cells in vitro., *Nat. Protoc.* 1 (2006) 2315–9. doi:10.1038/nprot.2006.339.
- [242] A. Munshi, M. Hobbs, R.E. Meyn, Clonogenic cell survival assay., *Methods Mol. Med.* 110 (2005) 21–28. doi:10.1385/1-59259-869-2:021.
- [243] S.L. Hempel, G.R. Buettner, Y.Q. O'Malley, D.A. Wessels, D.M. Flaherty, Dihydrofluorescein diacetate is superior for detecting intracellular oxidants: Comparison with 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, 5(and 6)-carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, and dihydrorhodamine 123, *Free Radic. Biol. Med.* 27 (1999) 146–159. doi:10.1016/S0891-5849(99)00061-1.
- [244] H.-Y. Chang, H.-C. Huang, T.-C. Huang, P.-C. Yang, Y.-C. Wang, H.-F. Juan, Flow Cytometric Detection of Reactive Oxygen Species, *BIO-PROTOCOL.* 3 (2013) 3–6. doi:10.21769/BioProtoc.431.
- [245] P.J. Hissin, R. Hilf, A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues., *Anal. Biochem.* 74 (1976) 214–226. doi:10.1016/0003-2697(76)90326-2.
- [246] J. Lü, P.H. Lin, Q. Yao, C. Chen, Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems., *J. Cell. Mol. Med.* 14 (2010) 840–860. doi:10.1111/j.1582-4934.2009.00897.x.
- [247] Y.H. Han, S.Z. Kim, S.H. Kim, W.H. Park, Induction of apoptosis in arsenic trioxide-treated lung cancer A549 cells by buthionine sulfoximine., *Mol. Cells.* 26 (2008) 158–64. doi:107 [pii].
- [248] N.P. Singh, M.T. McCoy, R.R. Tice, E.L. Schneider, A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells, *Exp. Cell Res.* 175 (1988) 184–191. doi:10.1016/0014-4827(88)90265-0.
- [249] A. Azqueta, A.R. Collins, The essential comet assay: a comprehensive guide to measuring DNA damage and repair, *Arch. Toxicol.* 87 (2013) 949–968. doi:10.1007/s00204-013-1070-0.
- [250] A.L. Di Virgilio, K. Iwami, W. Wätjen, R. Kahl, G.H. Degen, Genotoxicity of the isoflavones genistein, daidzein and equol in V79 cells, *Toxicol. Lett.* 151 (2004) 151–162. doi:10.1016/j.toxlet.2004.04.005.
- [251] M. Fenech, The in vitro micronucleus technique, *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* 455 (2000) 81–95. doi:10.1016/S0027-5107(00)00065-8.
- [252] G.E. Tobón Zapata, J.F. Benavides A., *Dimensión Fractal Reactiva de Partículas Farmacéuticas Aplicada al proceso de disolución*, 1a ed., Editorial Académica Española, 2012.
- [253] O. Flórez-Acosta, G. Tobón-Zapata, J. Valencia-Velasquez, Categorization of the main descriptors of different ampicillin crystal habits, *Brazilian J. Pharm. Sci.* 46 (2010) 679–685. doi:10.1590/S1984-82502010000400009.
- [254] T.C. Chou, Preclinical versus clinical drug combination studies, *Leuk Lymphoma.* 49 (2008) 2059–2080. doi:10.1080/10428190802353591.

- [255] T.C. Chou, The mass-action law based algorithms for quantitative econo-green bio-research, *Integr Biol.* 3 (2011) 548–559. doi:10.1039/c0ib00130a.
- [256] T.-C. Chou, P. Talalay, Analysis of combined drug effects: a new look at a very old problem, *Trends Pharmacol. Sci.* 4 (1983) 450–454. doi:10.1016/0165-6147(83)90490-X.
- [257] I. V. Bijnsdorp, E. Giovannetti, G.J. Peters, Analysis of Drug Interactions, en: *Methods*, 2011: pp. 421–434. doi:10.1007/978-1-61779-080-5\_34.
- [258] J.M. Walker, *3D Cell Culture*, Humana Press, Totowa, NJ, 2011. doi:10.1007/978-1-60761-984-0.
- [259] K. Carver, X. Ming, R.L. Juliano, Multicellular tumor spheroids as a model for assessing delivery of oligonucleotides in three dimensions., *Mol. Ther. Nucleic Acids.* 3 (2014) e153. doi:10.1038/mtna.2014.5.
- [260] F. Mittler, P. Obeïd, A. V. Rulina, V. Haguët, X. Gidrol, M.Y. Balakirev, High-Content Monitoring of Drug Effects in a 3D Spheroid Model, *Front. Oncol.* 7 (2017). doi:10.3389/fonc.2017.00293.
- [261] M. Vinci, S. Gowan, F. Boxall, L. Patterson, M. Zimmermann, W. Court, C. Lomas, M. Mendiola, D. Hardisson, S.A. Eccles, Advances in establishment and analysis of three-dimensional tumor spheroid-based functional assays for target validation and drug evaluation, *BMC Biol.* 10 (2012). doi:10.1186/1741-7007-10-29.
- [262] M. Zanoni, F. Piccinini, C. Arienti, A. Zamagni, S. Santi, R. Polico, A. Bevilacqua, A. Tesei, 3D tumor spheroid models for in vitro therapeutic screening: a systematic approach to enhance the biological relevance of data obtained., *Sci. Rep.* 6 (2016) 19103. doi:10.1038/srep19103.
- [263] H.F. Kaiser, An index of factorial simplicity, *Psychometrika.* 39 (1974) 31–36. doi:10.1007/BF02291575.
- [264] B.A. Cerny, H.F. Kaiser, A Study Of A Measure Of Sampling Adequacy For Factor-Analytic Correlation Matrices, *Multivariate Behav. Res.* 12 (1977) 43–47. doi:10.1207/s15327906mbr1201\_3.
- [265] S.J. Blott, K. Pye, Particle shape: A review and new methods of characterization and classification, *Sedimentology.* 55 (2008) 31–63. doi:10.1111/j.1365-3091.2007.00892.x.
- [266] K. Köhler, A. Hillebrecht, J. Schulze Wischeler, A. Innocenti, A. Heine, C.T. Supuran, G. Klebe, Saccharin Inhibits Carbonic Anhydrases: Possible Explanation for its Unpleasant Metallic Aftertaste, *Angew. Chemie Int. Ed.* 46 (2007) 7697–7699. doi:10.1002/anie.200701189.
- [267] J. Moeker, T.S. Peat, L.F. Bornaghi, D. Vullo, C.T. Supuran, S.A. Poulsen, Cyclic secondary sulfonamides: Unusually good inhibitors of cancer-related carbonic anhydrase enzymes, *J. Med. Chem.* 57 (2014) 3522–3531. doi:10.1021/jm500255y.
- [268] B.P. Mahon, A.M. Hendon, J.M. Driscoll, G.M. Rankin, S.-A. Poulsen, C.T. Supuran, R. McKenna, Saccharin: A lead compound for structure-based drug design of carbonic

- anhydrase IX inhibitors, *Bioorg. Med. Chem.* 23 (2015) 849–854. doi:10.1016/J.BMC.2014.12.030.
- [269] M. Benej, S. Pastorekova, J. Pastorek, Carbonic Anhydrase IX: Regulation and Role in Cancer, en: *Subcell. Biochem.*, Springer, Dordrecht, 2014: pp. 199–219. doi:10.1007/978-94-007-7359-2\_11.
- [270] J. Fernandez-De-Cossio-Diaz, A. Vazquez, Limits of aerobic metabolism in cancer cells, *Sci. Rep.* 7 (2017) 1–8. doi:10.1038/s41598-017-14071-y.
- [271] J.T. Brosnan, Interorgan Amino Acid Transport and its Regulation, *J. Nutr.* 133 (2003) 2068S–2072S. doi:10.1093/jn/133.6.2068S.
- [272] J.C. Hall, K. Heel, R. McCauley, Glutamine, *Br. J. Surg.* 83 (1996) 305–312. doi:10.1002/bjs.1800830306.
- [273] N.S.M. Mokhtaruddin, E.N.M. Yusof, T.B.S.A. Ravooof, E.R.T. Tiekink, A. Veerakumarasivam, M.I.M. Tahir, Unusual saccharin-N,O (carbonyl) coordination in mixed-ligand copper(II) complexes: Synthesis, X-ray crystallography and biological activity, *J. Mol. Struct.* 1139 (2017) 1–9. doi:10.1016/j.molstruc.2017.03.037.
- [274] M.C. Apella, R. Totaro, E.J. Baran, Determination of superoxide dismutase-like activity in some divalent metal saccharinates, *Biol. Trace Elem. Res.* 37 (1993) 293–299. doi:10.1007/BF02783803.
- [275] P. Deschamps, N. Zerrouk, T. Martens, M.F. Charlot, J.J. Girerd, J.C. Chaumeil, A. Tomas, Copper Complexation by Amino Acid: L-Glutamine-Copper(II)-L-Histidine Ternary System, *J. Trace Microprobe Tech.* 21 (2003) 729–741. doi:10.1081/TMA-120025823.
- [276] I. Şakiyan, Synthesis and characterization of four new manganese(III) complexes and amino acid (L-aspartic acid, L-asparagine, L-glutamic acid, L-glutamine) Schiff bases, *Transit. Met. Chem.* 32 (2007) 131–135. doi:10.1007/s11243-006-0139-5.
- [277] L.H. Abdel-Rahman, A.M. Abu-Dief, N.M. Ismail, M. Ismael, Synthesis, characterization, and biological activity of new mixed ligand transition metal complexes of glutamine, glutaric, and glutamic acid with nitrogen based ligands, *Inorg. Nano-Metal Chem.* 47 (2017) 467–480. doi:10.1080/15533174.2015.1137057.
- [278] J. Iwasa, W.F. Marshall, G. Karp, *Karp's cell and molecular biology : concepts and experiments*, 8a ed., Wiley Publishing, Inc, 2002.
- [279] M. Tümer, H. Köksal, M.K. Sener, S. Serin, Antimicrobial activity studies of the binuclear metal complexes derived from tridentate Schiff base ligands, *Transit. Met. Chem.* 24 (1999) 414–420.
- [280] S. Arayne, N. Sultana, U. Haroon, M.A. Mesaik, Synthesis, characterization, antibacterial and anti-inflammatory activities of enoxacin metal complexes., *Bioinorg. Chem. Appl.* (2009) 914105. doi:10.1155/2009/914105.
- [281] Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), Hazardous Substances Data Bank [Internet], (2019). <https://toxnet.nlm.nih.gov/newtoxnet/hsdb.htm> (consultado el

- 30 de enero de 2019).
- [282] C. Zhang, M.L. Maddelein, R. Wai-Yin Sun, H. Gornitzka, O. Cuvillier, C. Hemmert, Pharmacomodulation on Gold-NHC complexes for anticancer applications – is lipophilicity the key point?, *Eur. J. Med. Chem.* 157 (2018) 320–332. doi:10.1016/j.ejmech.2018.07.070.
- [283] H.-R. Teppo, Y. Soini, P. Karihtala, Reactive Oxygen Species-Mediated Mechanisms of Action of Targeted Cancer Therapy, *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2017 (2017) 1–11. doi:10.1155/2017/1485283.
- [284] S. Pervaiz, Pro-oxidant milieu blunts scissors: insight into tumor progression, drug resistance, and novel druggable targets, *Curr Pharm Des.* 12 (2006) 4469–4477. doi:10.2174/138161206779010503.
- [285] D.P. Jones, [11] Redox potential of GSH/GSSG couple: Assay and biological significance, en: *Methods Enzymol.*, 2002: pp. 93–112. doi:10.1016/S0076-6879(02)48630-2.
- [286] J.F.J. Cadavid-Vargas, I.E. León, S.S.B. Etcheverry, E. Santi, M.M.H. Torre, A.A.L. Di Virgilio, I. Leon, S.S.B. Etcheverry, E. Santi, M.M.H. Torre, A.A.L. Di Virgilio, Copper(II) Complexes with Saccharinate and Glutamine as Antitumor Agents: Cytoand Genotoxicity in Human Osteosarcoma Cells, *Anticancer. Agents Med. Chem.* 17 (2017) 424–433. doi:10.2174/1871520616666160513130204.
- [287] C.R. Kowol, P. Heffeter, W. Miklos, L. Gille, R. Trondl, L. Cappellacci, W. Berger, B.K. Keppler, Mechanisms underlying reductant-induced reactive oxygen species formation by anticancer copper(II) compounds, *J. Biol. Inorg. Chem.* 17 (2012) 409–423. doi:10.1007/s00775-011-0864-x.
- [288] C. Shobha Devi, B. Thulasiram, R.R. Aerva, P. Nagababu, Recent Advances in Copper Intercalators as Anticancer Agents, *J. Fluoresc.* 28 (2018) 1195–1205. doi:10.1007/s10895-018-2283-7.
- [289] D. Galaris, A. Evangelou, The role of oxidative stress in mechanisms of metal-induced carcinogenesis, *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 42 (2002) 93–103. doi:10.1016/S1040-8428(01)00212-8.
- [290] S. Lee, D. Pagoria, A. Raigrodski, W. Geurtsen, Effects of combinations of ROS scavengers on oxidative DNA damage caused by visible-light-activated camphorquinone/N,N-dimethyl-p-toluidine, *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.* 83B (2007) 391–399. doi:10.1002/jbm.b.30808.
- [291] L. Li, Y. Meng, Z. Li, W. Dai, X. Xu, X. Bi, J. Bian, Discovery and development of small molecule modulators targeting glutamine metabolism, *Eur. J. Med. Chem.* 163 (2019). doi:10.1016/j.ejmech.2019.01.025.
- [292] L. Becco, A. Rodríguez, M.E. Bravo, M.J. Prieto, L. Ruiz-Azuara, B. Garat, V. Moreno, D. Gambino, New achievements on biological aspects of copper complexes Casiopeínas®: Interaction with DNA and proteins and anti-Trypanosoma cruzi activity, *J. Inorg. Biochem.* 109 (2012) 49–56. doi:10.1016/j.jinorgbio.2012.01.010.

- [293] J. Serment-Guerrero, M.E. Bravo-Gomez, E. Lara-Rivera, L. Ruiz-Azuara, Genotoxic assessment of the copper chelated compounds Casiopeinas: Clues about their mechanisms of action, *J. Inorg. Biochem.* 166 (2017) 68–75. doi:10.1016/J.JINORGBIO.2016.11.007.
- [294] X. Cai, N. Pan, G. Zou, Copper-1,10-phenanthroline-induced apoptosis in liver carcinoma Bel-7402 cells associates with copper overload, reactive oxygen species production, glutathione depletion and oxidative DNA damage, *BioMetals.* 20 (2007) 1–11. doi:10.1007/s10534-006-9008-0.
- [295] A. Mahmood Dar, M. Alam Khan, DNA Binding, Cleavage Activity, Molecular Docking, Cytotoxicity and Genotoxicity Studies of Newly Synthesized Copper Based Metal Complexes, *Pharm. Anal. Acta.* 07 (2015). doi:10.4172/2153-2435.1000464.
- [296] A. Mughal, A. Vikram, P. Ramarao, G.B. Jena, Micronucleus and comet assay in the peripheral blood of juvenile rat: Establishment of assay feasibility, time of sampling and the induction of DNA damage, *Mutat. Res. - Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 700 (2010) 86–94. doi:10.1016/j.mrgentox.2010.05.014.
- [297] A.P. Singh, N.K. Kaushik, A.K. Verma, R. Gupta, Synthesis, structure and anticancer activity of copper (II) complexes of N-benzyl-2-(diethylamino)acetamide and 2-(diethylamino)-N-phenylethylacetamide, *INDIAN J. Chem.* 50A (2011) 474–483.
- [298] B.Y. You, Y.H. Wang, M.L. Kuo, Role of reactive oxygen species in cupric 8-quinolinoxide-induced genotoxic effect., *Mutat. Res.* 491 (2001) 45–56.
- [299] S. Munira Haidad Ali, Y.-K. Yan, P.P.F. Lee, K.Z.X. Khong, M. Alam Sk, K.H. Lim, B. Klejevska, R. Vilar, Copper(II) complexes of substituted salicylaldehyde dibenzyl semicarbazones: synthesis, cytotoxicity and interaction with quadruplex DNA., *Dalton Trans.* 43 (2014) 1449–59. doi:10.1039/c3dt52297k.
- [300] B.-L. Fei, W.-S. Xu, H.-W. Tao, W. Li, Y. Zhang, J.-Y. Long, Q.-B. Liu, B. Xia, W.-Y. Sun, Effects of copper ions on DNA binding and cytotoxic activity of a chiral salicylidene Schiff base., *J. Photochem. Photobiol. B.* 132 (2014) 36–44. doi:10.1016/j.jphotobiol.2014.01.018.
- [301] C. Icel, V.T. Yilmaz, In vitro DNA binding studies of the sweetening agent saccharin and its copper(II) and zinc(II) complexes., *J. Photochem. Photobiol. B.* 130 (2014) 115–21. doi:10.1016/j.jphotobiol.2013.11.001.
- [302] K.A. Price, P.J. Crouch, I. Volitakis, B.M. Paterson, S. Lim, P.S. Donnelly, A.R. White, Mechanisms controlling the cellular accumulation of copper bis(thiosemicarbazonato) complexes, *Inorg. Chem.* 50 (2011) 9594–9605. doi:10.1021/ic201334q.
- [303] C. Shobha Devi, P. Nagababu, S. Natarajan, N. Deepika, P. Venkat Reddy, N. Veerababu, S.S. Singh, S. Satyanarayana, Cellular uptake, cytotoxicity, apoptosis and DNA-binding investigations of Ru(II) complexes, *Eur. J. Med. Chem.* 72 (2014) 160–169. doi:10.1016/j.ejmech.2013.11.005.
- [304] Organización Mundial de la salud, Evaluation of certain food additives and contaminants: sixty-first report of the joint FAO/WHO expert committee on food

- additives, 2012.
- [305] C. Villa-Pérez, I.C. Ortega, A.M. Payán-Aristizábal, G. Echeverría, G.C. Valencia-Uribe, D.B. Soria, Synthesis, crystal structure and physicochemical characterization of a Hg(II) complex with 6-methoxyquinoline as ligand, *Zeitschrift für Naturforsch. B.* 70 (2015) 719–725. doi:10.1515/znb-2015-0069.
- [306] C.R. Munteanu, K. Suntharalingam, Advances in cobalt complexes as anticancer agents, *Dalt. Trans.* 44 (2015) 13796–13808. doi:10.1039/C5DT02101D.
- [307] N.J. Ernest, C.W. Habela, H. Sontheimer, Cytoplasmic condensation is both necessary and sufficient to induce apoptotic cell death, *J. Cell Sci.* 121 (2008) 290–297. doi:10.1242/jcs.017343.
- [308] I.E. León, V. Porro, S. Astrada, M.G. Egusquiza, C.I. Cabello, M. Bollati-Fogolin, S.B. Etcheverry, Polyoxometalates as antitumor agents: Bioactivity of a new polyoxometalate with copper on a human osteosarcoma model, *Chem. Biol. Interact.* 222 (2014) 87–96. doi:10.1016/j.cbi.2014.10.012.
- [309] a. L. Di Virgilio, I.E. León, C. a. Franca, I. Henao, G. Tobón, S.B. Etcheverry, Cu(Nor)2·5H<sub>2</sub>O, a complex of Cu(II) with Norfloxacin: Theoretic approach and biological studies. Cytotoxicity and genotoxicity in cell cultures, *Mol. Cell. Biochem.* 376 (2013) 53–61. doi:10.1007/s11010-012-1548-8.
- [310] M.L. Turski, D.J. Thiele, New roles for copper metabolism in cell proliferation, signaling, and disease, *J. Biol. Chem.* 284 (2009) 717–721. doi:10.1074/jbc.R800055200.
- [311] D. Trachootham, J. Alexandre, P. Huang, Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach?, *Nat. Rev. Drug Discov.* 8 (2009) 579–591. doi:10.1038/nrd2803.
- [312] L. Denzoin, A.L. Soraci, M.O. Tapia, Homeostasis del glutatión, *Acta Bioquímica Clínica Latinoam.* 47 (2013) 529–39.
- [313] Y.-H. Lin, S.-H. Yang, C.-M. Chien, X.-W. Hu, Y.-H. Huang, C.-M. Lu, Y.-L. Chen, S.-R. Lin, Induction of G2/M phase arrest and apoptosis by a novel indoloquinoline derivative, IQDMA, in K562 cells, *Drug Dev. Res.* 67 (2006) 743–751. doi:10.1002/ddr.20113.
- [314] Y. Xu, G. Wang, Q. Chen, T. Lin, Z. Zeng, Q. Luo, J. Liu, C. Sun, Intrinsic apoptotic pathway and G2/M cell cycle arrest involved in tubeimoside I-induced EC109 cell death, *Chin. J. Cancer Res.* 25 (2013) 312–321. doi:10.3978/j.issn.1000-9604.2013.06.03.
- [315] W.A. Cliby, K.A. Lewis, K.K. Lilly, S.H. Kaufmann, S phase and G2 arrests induced by topoisomerase I poisons are dependent on ATR kinase function, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 1599–1606. doi:10.1074/jbc.M106287200.
- [316] K.C. Chen, T.Y. Yang, C.C. Wu, C.C. Cheng, S.L. Hsu, H.W. Hung, J.W. Chen, G.C. Chang, Pemetrexed induces S-phase arrest and apoptosis via a deregulated activation of Akt signaling pathway, *PLoS One.* 9 (2014).

- doi:10.1371/journal.pone.0097888.
- [317] H. Zhu, L. Zhang, S. Wu, F. Teraishi, J.J. Davis, D. Jacob, B. Fang, Induction of S-phase arrest and p21 overexpression by a small molecule 2[[3-(2,3-dichlorophenoxy)propyl] amino]ethanol in correlation with activation of ERK, *Oncogene*. 23 (2004) 4984–4992. doi:10.1038/sj.onc.1207645.
- [318] Z. Xu, F. Zhang, C. Bai, C. Yao, H. Zhong, C. Zou, X. Chen, Sophoridine induces apoptosis and S phase arrest via ROS-dependent JNK and ERK activation in human pancreatic cancer cells, *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 36 (2017) 1–10. doi:10.1186/s13046-017-0590-5.
- [319] C.X. Zhang, S.J. Lippard, New metal complexes as potential therapeutics, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 7 (2003) 481–489. doi:10.1016/S1367-5931(03)00081-4.
- [320] K. Laws, K. Suntharalingam, The Next Generation of Anticancer Metallopharmaceuticals: Cancer Stem Cell-Active Inorganics, *ChemBioChem*. 19 (2018) 2246–2253. doi:10.1002/cbic.201800358.
- [321] S. Kushwaha, A. Vikram, P.P. Trivedi, G.B. Jena, Alkaline, Endo III and FPG modified comet assay as biomarkers for the detection of oxidative DNA damage in rats with experimentally induced diabetes, *Mutat. Res. - Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 726 (2011) 242–250. doi:10.1016/j.mrgentox.2011.10.004.
- [322] M.Z. Vasquez, Combining the in vivo comet and micronucleus assays: A practical approach to genotoxicity testing and data interpretation, *Mutagenesis*. 25 (2010) 187–199. doi:10.1093/mutage/geb060.
- [323] O.F. Khabour, N.N. Saleh, K.H. Alzoubi, S. Hisaindee, D. Al-Fyad, L. Al-Kaabi, A. Dodeen, F.T. Esmadi, Genotoxicity of structurally related copper and zinc containing Schiff base complexes., *Drug Chem. Toxicol.* 36 (2013) 435–42. doi:10.3109/01480545.2013.776577.
- [324] M.B. Sowa, W.B. Chrisler, K.D. Zens, E.J. Ashjian, L.K. Opresko, Three-dimensional culture conditions lead to decreased radiation induced cytotoxicity in human mammary epithelial cells, *Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* 687 (2010) 78–83. doi:10.1016/j.mrfmmm.2010.03.004.
- [325] I. Eke, N. Cordes, Radiobiology goes 3D: How ECM and cell morphology impact on cell survival after irradiation, *Radiother. Oncol.* 99 (2011) 271–278. doi:10.1016/j.radonc.2011.06.007.
- [326] D.W. Mcmillin, J.M. Negri, C.S. Mitsiades, The role of tumour-stromal interactions in modifying drug response: Challenges and opportunities, *Nat. Rev. Drug Discov.* 12 (2013) 217–228. doi:10.1038/nrd3870.
- [327] M.I. Toral, N. Lara, A.E. Tapia, C. Torres, P. Richter, Estudio espectral y determinación simultanea de sulfametoxazol y trimetoprim por espectrofotometría derivada digital., *Boletín la Soc. Chil. Química.* 47 (2002) 241–251. doi:10.4067/S0366-16442002000300007.
- [328] J.-B. Tommasino, F.N.R.R. Renaud, D. Luneau, G. Pilet, Multi-biofunctional

- complexes combining antiseptic copper(II) with antibiotic sulfonamide ligands: Structural, redox and antibacterial study, *Polyhedron*. 30 (2011) 1663–1670. doi:10.1016/j.poly.2011.03.033.
- [329] B.F. Ali, K. Al-Sou'od, N. Al-Ja'ar, A. Nassar, M.H. Zaghal, Z. Judeh, R. Al-Far, M. Al-Refai, M. Ibrahim, K. Mansi, K.H. Al-Obaidi, Interconversion of copper(II) to copper(I): synthesis, characterization of copper(II) and copper(I) 2,2'-biquinoline complexes and their microbiological activity, *J. Coord. Chem.* 59 (2006) 229–241. doi:10.1080/00958970500329855.
- [330] E. Schutte, P. Sullivan, A LUMINESCENT COMPLEX OF Re(I): fac-[Re(CO)<sub>3</sub>(BPY)(PY)](CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>) (BPY=2,2'-BIPYRIDINE; PY=PYRIDINE), en: *Inorg. Synth.*, 2002: pp. 171–245. doi:10.1002/0471224502.ch4.
- [331] J.D. Knoll, C. Turro, Control and utilization of ruthenium and rhodium metal complex excited states for photoactivated cancer therapy, *Coord. Chem. Rev.* 282–283 (2015) 110–126. doi:10.1016/j.ccr.2014.05.018.
- [332] J.D. Knoll, B.A. Albani, C. Turro, New Ru(II) Complexes for Dual Photoreactivity: Ligand Exchange and <sup>1</sup>O<sub>2</sub> Generation, *Acc. Chem. Res.* 48 (2015) 2280–2287. doi:10.1021/acs.accounts.5b00227.
- [333] M. Wehbe, M. Anantha, I. Backstrom, A. Leung, K. Chen, A. Malhotra, K. Edwards, M.B. Bally, Nanoscale reaction vessels designed for synthesis of copper-drug complexes suitable for preclinical development, *PLoS One*. 11 (2016) 1–16. doi:10.1371/journal.pone.0153416.
- [334] D. Mahendiran, S. Amuthakala, N.S.P. Bhuvanesh, R.S. Kumar, A.K. Rahiman, Copper complexes as prospective anticancer agents: in vitro and in vivo evaluation, selective targeting of cancer cells by DNA damage and S phase arrest, *RSC Adv.* 8 (2018) 16973–16990. doi:10.1039/c8ra00954f.
- [335] S. Rajalakshmi, M.S. Kiran, B.U. Nair, DNA condensation by copper(II) complexes and their anti-proliferative effect on cancerous and normal fibroblast cells, *Eur. J. Med. Chem.* 80 (2014) 393–406. doi:10.1016/j.ejmech.2014.04.064.
- [336] S. Rajalakshmi, T. Weyhermüller, M. Dinesh, B.U. Nair, Copper(II) complexes of terpyridine derivatives: A footstep towards development of antiproliferative agent for breast cancer, *J. Inorg. Biochem.* 117 (2012) 48–59. doi:10.1016/j.jinorgbio.2012.08.010.
- [337] S. Tardito, L. Marchio, Copper Compounds in Anticancer Strategies, *Curr. Med. Chem.* 16 (2009) 1325–1348. doi:10.2174/092986709787846532.
- [338] T. S.J., Y. Y.K., L. P.P.F., L. K.H., Copper, gold and silver compounds as potential new anti-tumor metallodrugs, *Future Med. Chem.* 2 (2010) 1591–1608. doi:10.4155/fmc.10.234.
- [339] A. Pompella, A. Visvikis, A. Paolicchi, V. De Tata, A.F. Casini, The changing faces of glutathione, a cellular protagonist, *Biochem. Pharmacol.* 66 (2003) 1499–1503. doi:10.1016/S0006-2952(03)00504-5.



- [340] J.M. Estrela, J. Carretero, A. Ortega, Glutathione, Sulfur Amino Acids, and Cancer, en: *Glutathione Sulfur Amin. Acids Hum. Heal. Dis.*, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, 2009: pp. 471–500. doi:10.1002/9780470475973.ch19.
- [341] H. Sies, Glutathione and its role in cellular functions, *Free Radic. Biol. Med.* 27 (1999) 916–921. doi:10.1016/S0891-5849(99)00177-X.
- [342] C.C. Ling, R.S.L. Wong, R.D. Basas, Glutathione depletion and cytotoxicity of buthionine sulfoximine and SR2508 in rodent and human cells, *Int. J. Radiat. Oncol.* 18 (1990) 325–330. doi:10.1016/0360-3016(90)90097-4.
- [343] O.W. Griffith, Mechanism of action, metabolism, and toxicity of buthionine sulfoximine and its higher homologs, potent inhibitors of glutathione synthesis, *J. Biol. Chem.* 257 (1982) 13704–13712.
- [344] L.L. Marostica, I.T. Silva, J.M. Kratz, L. Persich, F.C. Geller, K.L. Lang, M.S.B. Caro, F.J. Durán, E.P. Schenkel, C.M.O. Simões, Synergistic Antiproliferative Effects of a New Cucurbitacin B Derivative and Chemotherapy Drugs on Lung Cancer Cell Line A549, *Chem. Res. Toxicol.* 28 (2015) 1949–1960. doi:10.1021/acs.chemrestox.5b00153.
- [345] A. Ota, M. Wahiduzzaman, Y. Hosokawa, Arsenic-Based Anticancer-Combined Therapy: Novel Mechanism Inducing Apoptosis of Cancer Cells, en: *Curr. Underst. Apoptosis - Program. Cell Death*, InTech, 2018: p. 64. doi:10.5772/intechopen.74824.
- [346] D.J. Stewart, W.K. Evans, Non-chemotherapeutic agents that potentiate chemotherapy efficacy, *Cancer Treat. Rev.* 16 (1989) 1–40. doi:10.1016/0305-7372(89)90002-9.
- [347] Y.H. Han, W.H. Park, The effects of N-acetyl cysteine, buthionine sulfoximine, diethyldithiocarbamate or 3-amino-1,2,4-triazole on antimycin A-treated Calu-6 lung cells in relation to cell growth, reactive oxygen species and glutathione., *Oncol. Rep.* 22 (2009) 385–91. doi:10.3892/or\_00000449.
- [348] J. Rivadeneira, A.L. Di Virgilio, D.A. Barrio, C.I. Muglia, L. Bruzzone, S.B. Etcheverry, A.L. Di Virgilio, D.A. Barrio, C.I. Muglia, L. Bruzzone, S.B. Etcheverry, Cytotoxicity of a vanadyl(IV) complex with a multidentate oxygen donor in osteoblast cell lines in culture., *Med. Chem.* 6 (2010) 9–23.
- [349] M. Ciocoiu, M. Badescu, I. Paduraru, Protecting antioxidative effects of vitamins E and C in experimental physical stress, *J. Physiol. Biochem.* 63 (2007) 187–194. doi:10.1007/BF03165781.
- [350] T. Patrice, B. Rozec, A. Sidoroff, Y. Blanloeil, P. Despins, C. Perrigaud, Influence of Vitamins on Secondary Reactive Oxygen Species Production in Sera of Patients with Resectable NSCLC., *Dis. (Basel, Switzerland)*. 4 (2016) 25. doi:10.3390/diseases4030025.
- [351] B.R. You, W.H. Park, Auranofin induces mesothelioma cell death through oxidative stress and GSH depletion, *Oncol. Rep.* 35 (2016) 546–551. doi:10.3892/or.2015.4382.

- [352] A. Marín-Hernández, I. Gracia-Mora, L. Ruiz-Ramírez, R. Moreno-Sánchez, Toxic effects of copper-based antineoplastic drugs (Casiopeinas®) on mitochondrial functions, *Biochem. Pharmacol.* 65 (2003) 1979–1989. doi:10.1016/S0006-2952(03)00212-0.
- [353] D.P. Jones, J.L. Carlson, V.C. Mody, J. Cai, M.J. Lynn, P. Sternberg, Redox state of glutathione in human plasma., *Free Radic. Biol. Med.* 28 (2000) 625–35.
- [354] L. Flohé, The fairytale of the GSSG/GSH redox potential, *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 1830 (2013) 3139–3142. doi:10.1016/j.bbagen.2012.10.020.
- [355] F.Q. Schafer, G.R. Buettner, Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple, *Free Radic. Biol. Med.* 30 (2001) 1191–1212. doi:10.1016/S0891-5849(01)00480-4.
- [356] R. Galindo-Murillo, J.C. García-Ramos, L. Ruiz-Azuara, T.E. Cheatham, F. Cortés-Guzmán, Intercalation processes of copper complexes in DNA., *Nucleic Acids Res.* 43 (2015) 5364–76. doi:10.1093/nar/gkv467.
- [357] V. Uma, M. Kanthimathi, T. Weyhermuller, B.U. Nair, Oxidative DNA cleavage mediated by a new copper (II) terpyridine complex: Crystal structure and DNA binding studies, *J. Inorg. Biochem.* 99 (2005) 2299–2307. doi:10.1016/j.jinorgbio.2005.08.011.
- [358] W. Wang, Y.A. Lee, G. Kim, S.K. Kim, G.Y. Lee, J. Kim, Y. Kim, G.J. Park, C. Kim, Oxidative DNA cleavage by Cu(II) complexes: Effect of periphery substituent groups, *J. Inorg. Biochem.* 153 (2015) 143–149. doi:10.1016/j.jinorgbio.2015.07.015.
- [359] J. Deng, P. Yu, Z. Zhang, J. Wang, J. Cai, N. Wu, H. Sun, H. Liang, F. Yang, Designing anticancer copper(II) complexes by optimizing 2-pyridine-thiosemicarbazone ligands, *Eur. J. Med. Chem.* 158 (2018) 442–452. doi:10.1016/j.ejmech.2018.09.020.
- [360] A.R. Trzeciak, J.G. Mohanty, K.D. Jacob, J. Barnes, N. Ejiogu, A. Lohani, A.B. Zonderman, J.M. Rifkind, M.K. Evans, Oxidative damage to DNA and single strand break repair capacity: Relationship to other measures of oxidative stress in a population cohort, *Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* 736 (2012) 93–103. doi:10.1016/j.mrfmmm.2012.01.002.
- [361] A. Barzilai, K.I. Yamamoto, DNA damage responses to oxidative stress, *DNA Repair (Amst)*. 3 (2004) 1109–1115. doi:10.1016/j.dnarep.2004.03.002.
- [362] S.J. Storr, C.M. Woolston, Y. Zhang, S.G. Martin, Redox Environment, Free Radical, and Oxidative DNA Damage, *Antioxid. Redox Signal.* 18 (2012) 2399–2408. doi:10.1089/ars.2012.4920.
- [363] T. a. Brown, *Essential Molecular Biology: A Practical Approach*, (2000) 268.
- [364] M. Hajrezaie, M. Paydar, S.Z. Moghadamtousi, P. Hassandarvish, N.S. Gwaram, M. Zahedifard, E. Rouhollahi, H. Karimian, C.Y. Looi, H.M. Ali, N. Abdul Majid, M.A. Abdulla, A Schiff base-derived copper (II) complex is a potent inducer of apoptosis in colon cancer cells by activating the intrinsic pathway., *ScientificWorldJournal*. 2014 (2014) 540463. doi:10.1155/2014/540463.

- [365] B.Q. Zou, X. Lu, Q.P. Qin, Y.X. Bai, Y. Zhang, M. Wang, Y.C. Liu, Z.F. Chen, H. Liang, Three novel transition metal complexes of 6-methyl-2-oxo-quinoline-3-carbaldehyde thiosemicarbazone: synthesis, crystal structure, cytotoxicity, and mechanism of action, *RSC Adv.* 7 (2017) 17923–17933. doi:10.1039/c7ra00826k.
- [366] R. Trondl, P. Heffeter, C.R. Kowol, M. a. Jakupec, W. Berger, B.K. Keppler, NKP-1339, the first ruthenium-based anticancer drug on the edge to clinical application, *Chem. Sci.* 5 (2014) 2925–2932. doi:10.1039/C3SC53243G.
- [367] C. Steinkühler, J.Z. Pedersen, U. Weser, G. Rotilio, Oxidative stress induced by a di-schiff base copper complex is both mediated and modulated by glutathione, *Biochem. Pharmacol.* 42 (1991) 1821–1827. doi:10.1016/0006-2952(91)90521-6.
- [368] E. Hatem, N. El Banna, M.-E. Huang, Multifaceted Roles of Glutathione and Glutathione-Based Systems in Carcinogenesis and Anticancer Drug Resistance, *Antioxid. Redox Signal.* 27 (2017) 1217–1234. doi:10.1089/ars.2017.7134.
- [369] X.-Q. Zhou, Y. Li, D.-Y. Zhang, Y. Nie, Z.-J. Li, W. Gu, X. Liu, J.-L. Tian, S.-P. Yan, Copper complexes based on chiral Schiff-base ligands: DNA/BSA binding ability, DNA cleavage activity, cytotoxicity and mechanism of apoptosis., *Eur. J. Med. Chem.* 114 (2016) 244–256. doi:10.1016/j.ejmech.2016.02.055.
- [370] T. Lombardo, V. Cavaliere, S.N. Costantino, L. Kornblihtt, E.M. Alvarez, G.A. Blanco, Synergism between arsenite and proteasome inhibitor MG132 over cell death in myeloid leukaemic cells U937 and the induction of low levels of intracellular superoxide anion, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 258 (2012) 351–366. doi:10.1016/j.taap.2011.11.018.
- [371] K.A. Skov, Modification of Radiation Response by Metal Complexes: A Review with Emphasis of Nonplatinum Studies, *Radiat. Res.* 112 (1987) 217. doi:10.2307/3577253.
- [372] N. Farrell, *Uses of inorganic chemistry in medicine*, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, 1999.
- [373] I. Kirschner, N. Citri, A. Levitzki, M. Anbar, The Effect of Copper on the Radiosensitivity of Bacteria, *Int. J. Radiat. Biol. Relat. Stud. Physics, Chem. Med.* 17 (1970) 81–85. doi:10.1080/09553007014550081.
- [374] C. Liu, J. Zhou, Q. Li, L. Wang, Z. Liao, H. Xu, Dna damage by copper(II) complexes: Coordination-structural dependence of reactivities, *J. Inorg. Biochem.* 75 (1999) 233–240. doi:10.1016/S0162-0134(99)00037-9.
- [375] D. de Oliveira Silva, W.A. Alves, S.O. Rogero, Á.S. Cruz, A.C. Valderrama-Negrón, Synthesis, spectroscopic characterization and radiosensitizing properties of acetato-bridged copper(II) complexes with 5-nitroimidazole drugs, *Inorganica Chim. Acta.* 367 (2010) 85–92. doi:10.1016/j.ica.2010.12.006.
- [376] B. Desoize, J.-C. Jardillier, Multicellular resistance: a paradigm for clinical resistance?, *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 36 (2000) 193–207. doi:10.1016/S1040-8428(00)00086-X.

- [377] E.C. Costa, A.F. Moreira, D. de Melo-Diogo, V.M. Gaspar, M.P. Carvalho, I.J. Correia, 3D tumor spheroids: an overview on the tools and techniques used for their analysis, *Biotechnol. Adv.* 34 (2016) 1427–1441. doi:10.1016/j.biotechadv.2016.11.002.
- [378] A.R. Timerbaev, Advances in developing tris(8-quinolinolato)gallium(iii) as an anticancer drug: critical appraisal and prospects., *Metallomics.* 1 (2009) 193–8. doi:10.1039/b902861g.
- [379] B. Kubista, T. Schoefl, L. Mayr, S. van Schoonhoven, P. Heffeter, R. Windhager, B.K. Keppler, W. Berger, Distinct activity of the bone-targeted gallium compound KP46 against osteosarcoma cells - synergism with autophagy inhibition, *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 36 (2017) 52. doi:10.1186/s13046-017-0527-z.
- [380] M. Hanif, C.G. Hartinger, Anticancer metallodrugs: Where is the next cisplatin?, *Future Med. Chem.* 10 (2018). doi:10.4155/fmc-2017-0317.
- [381] V.F.S. Pape, N.V. May, G.T. Gál, I. Szatmári, F. Szeri, F. Fulop, G. Szakács, E.A. Enyedy, Impact of copper and iron binding properties on the anticancer activity of 8-hydroxyquinoline derived Mannich bases, *Dalt. Trans.* (2018) 17032–17045. doi:10.1039/C8DT03088J.
- [382] S.P. Oldfield, M.D. Hall, J.A. Platts, Calculation of lipophilicity of a large, diverse dataset of anticancer platinum complexes and the relation to cellular uptake, *J. Med. Chem.* 50 (2007) 5227–5237. doi:10.1021/jm0708275.
- [383] M. Rudnik, E. Chrobak, M. Maslankiewicz, Lipophilicity indexes of some 3-alkylthio and 3-alkylsulfinyl 4 (1H)-quinolones, *Acta Chromatogr.* 4 (2003) 243–247.
- [384] F. Giannini, J. Furrer, A.F. Ibao, G. Süß-Fink, B. Therrien, O. Zava, M. Baquie, P.J. Dyson, P. Štěpnička, Highly cytotoxic trithiophenolatodiruthenium complexes of the type  $[(\eta^6\text{-p-MeC}_6\text{H}_4\text{Pr i})_2\text{Ru}_2(\text{SC}_6\text{H}_4\text{-p-X})_3]^+$ : Synthesis, molecular structure, electrochemistry, cytotoxicity, and glutathione oxidation potential, *J. Biol. Inorg. Chem.* 17 (2012) 951–960. doi:10.1007/s00775-012-0911-2.
- [385] X. Shi, Z. Chen, Y. Wang, Z. Guo, X. Wang, Hypotoxic copper complexes with potent anti-metastatic and anti-angiogenic activities against cancer cells, *Dalt. Trans.* 47 (2018) 5049–5054. doi:10.1039/c8dt00794b.
- [386] X. Mao, X. Li, R. Sprangers, X. Wang, A. Venugopal, T. Wood, Y. Zhang, D.A. Kuntz, E. Coe, S. Trudel, D. Rose, R.A. Batey, L.E. Kay, A.D. Schimmer, Clioquinol inhibits the proteasome and displays preclinical activity in leukemia and myeloma, *Leukemia.* 23 (2009) 585–590. doi:10.1038/leu.2008.232.
- [387] A.-Y. SHEN, S.-N. WU, C.-T. CHIU, Synthesis and Cytotoxicity Evaluation of Some 8-Hydroxyquinoline Derivatives, *J. Pharm. Pharmacol.* 51 (2003) 543–548. doi:10.1211/0022357991772826.
- [388] S.H. Chan, C.H. Chui, S.W. Chan, S.H.L. Kok, D. Chan, M.Y.T. Tsoi, P.H.M. Leung, A.K.Y. Lam, A.S.C. Chan, K.H. Lam, J.C.O. Tang, Synthesis of 8-hydroxyquinoline derivatives as novel antitumor agents, *ACS Med. Chem. Lett.* 4 (2013) 170–174. doi:10.1021/ml300238z.

- [389] A. Barilli, C. Atzeri, I. Bassanetti, F. Ingoglia, V. Dall'Asta, O. Bussolati, M. Maffini, C. Mucchino, L. Marchiò, Oxidative stress induced by copper and iron complexes with 8-hydroxyquinoline derivatives causes paraptotic death of HeLa cancer cells, *Mol. Pharm.* 11 (2014) 1151–1163. doi:10.1021/mp400592n.
- [390] H.L. Gao, S.X. Jiang, Y.M. Hu, F.F. Li, Q.Q. Zhang, X.Y. Shi, J.Z. Cui, Syntheses, structures and luminescent properties of the metal complexes based on Zn(II) or Cd(II) with 5-nitro-8-hydroxyquinoline, *Inorg. Chem. Commun.* 44 (2014) 58–62. doi:10.1016/j.inoche.2014.02.041.
- [391] C.-F. Leung, K.K.-K. Lau, Y. Liang, Q. Tang, Y.-W. Lam, W.-X. Ni, T.-C. Lau, G.-J. Liu, W.-Y. Wong, W.-L. Man, S.-M. Peng, Synthesis and antitumor activity of a series of osmium(vi) nitrido complexes bearing quinolinolato ligands, *Chem. Commun.* 49 (2013) 9980. doi:10.1039/c3cc42250j.
- [392] H. Liang, Y.-C. Liu, Y.-N. Liu, Q.-P. Qin, Z.-F. Chen, H.-R. Zhang, T. Meng, Synthesis, Structure Characterization and Antitumor Activity Study of a New Iron(III) Complex of 5-Nitro-8-hydroxylquinoline (HNOQ), *Chem. Pharm. Bull. Pharm. Bull.* 64 (2016) 1208–1217. doi:10.1248/bpb.c16-00330.
- [393] F.T. Martins, R. Bonfilio, M.B. De Araújo, J. Ellena, Lamivudine Salts with Improved Solubilities, *J. Pharm. Sci.* 101 (2012) 2143–2154. doi:10.1002/jps.23117.
- [394] F.T. Martins, R.S. Corrêa, A.A. Batista, J. Ellena, Quasi-enantiomeric single-nucleoside and quasi-racemic two-nucleoside hydrochloride salts and ruthenium complexes of cytidine and 2',3'- dideoxycytidine analogs unveiling the negligible structure-driving role of the 2',3'-moieties, *CrystEngComm.* 16 (2014) 7013–7022. doi:10.1039/c4ce00678j.